



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE AMOXICILINA E
METRONIDAZOL ASSOCIADA À TERAPIA PERIODONTAL
NÃO-CIRÚRGICA MELHORADA NA MICROBIOTA
SUBGENGIVAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE
AGRESSIVA GENERALIZADA**

Débora Heller

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE AMOXICILINA E
METRONIDAZOL ASSOCIADA À TERAPIA PERIODONTAL
NÃO-CIRÚRGICA MELHORADA NA MICROBIOTA
SUBGENGIVAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE
AGRESSIVA GENERALIZADA**

Débora Heller

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Vieira Colombo

Rio de Janeiro

Abril/2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE AMOXICILINA E METRONIDAZOL ASSOCIADA À TERAPIA PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICA MELHORADA NA MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA

Débora Heller

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Vieira Colombo

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Periodontia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovada por:

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Vieira Colombo, DMSc, Prof.^a Adjunta UFRJ (orientadora)

Prof.^a Dr.^a Heloisa Carla Dell Santo Gusman, DSc, Prof.^a Adjunta UFRJ (titular interno)

Prof.^a Dr.^a Magda Feres, DMSc, Prof.^a Titular UnG (titular externo)

Prof.Dr. Milton de Uzeda, DC, Prof. Adjunto UNESA (titular externo)

Rio de Janeiro

Abril/2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Heller, Débora.

Efeito da administração de amoxicilina e metronidazol associada à terapia periodontal não-cirúrgica melhorada na microbiota subgengival de pacientes com periodontite agressiva generalizada / Débora Heller – Rio de Janeiro: UFRJ/ Faculdade de Odontologia, 2010.

xxii, 116f.:il.; 31 cm.

Orientadora: Ana Paula Vieira Colombo

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia (Periodontia), 2010.

Referências bibliográficas: f. 81-99.

1. Periodontite 2. Periodontite Agressiva 3. Tratamento. 4. Microbiota subgengival 5. Antimicrobianos. 6. Patógenos periodontais I. Colombo, Ana Paula Vieira. II. UFRJ, Faculdade de Odontologia, Mestrado em Odontologia (Periodontia). III. Título

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Oral, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e na Faculdade de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Vieira Colombo.

“O conhecimento essencial à partir da mente do ser humano controla o reinado do coração que muitas vezes fica selvagem. Esse conhecimento está ligado ao nosso olho interno, que percebe o processo de renovação da Criação do mundo à cada momento, vindo da Fonte de ‘Todo o Bem’.”

A partir do pensamento do Rebe de Lubavitch.

Dedico este trabalho à minha família:

Aos meus pais, Jacques e Silvia,
às minhas irmãs, Daniela e Manita,
e à minha avó, Geny.

Obrigada por tornarem esse sonho possível.

AGRADECIMENTOS

B”H

Gostaria de agradecer às seguintes pessoas que foram essenciais para a realização deste estudo:

Aos meus pais, Jacques e Silvia, pelo amor e apoio em todos os momentos. Obrigada por acreditarem em mim, entenderem a minha ausência e possibilitarem esse período de estudos no Rio de Janeiro.

Às minhas irmãs, Daniela e Manita, que sempre me incentivaram da sua maneira. As suas visitas foram essenciais para mim.

À minha avó, Geny, por todo seu carinho e palavras de sabedoria e proteção, sempre.

À minha professora orientadora, Dr.^a Ana Paula Vieira Colombo, obrigada pela tua dedicação e por compartilhar os teus conhecimentos comigo. Tu és um exemplo de competência, dedicação e amor ao ensino e a pesquisa científica. Obrigada pelo incentivo, confiança e carinho.

À Prof.^a Dr.^a Marisa Maltz, minha orientadora durante a graduação. Minha grande incentivadora na busca pelo conhecimento científico.

Ao Prof. Dr. Eduardo Jorge Feres Filho, obrigada por todas as discussões, conversas e orientações, muito importantes nessa minha formação.

À Dr.^a Renata Souto, tenho sorte em conviver com uma pessoa tão especial. Obrigada por toda a tua ajuda na realização dessa tese, e pela paciência em nos transmitir os teus conhecimentos. Obrigada pelo carinho e por ser minha amiga.

À Dr.^a Carina Maciel da Silva Boghossian, obrigada pelos teus ensinamentos, tão importantes para mim na pesquisa e como pessoa. Obrigada por estar sempre presente, pelo carinho e amizade.

Ao David e Maura Zuanazzi, sempre dispostos a ajudar e muito especiais. Obrigada pelo carinho, meus amigos.

Ao Fernando, nosso querido companheiro no laboratório. Obrigada por estar perto, além de nos ajudar na prática diária do laboratório, sempre nos animando.

Às alunas Thalita e Camilla, obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar. Obrigada pelo carinho meninas.

Aos colegas das turmas de Mestrado em Odontologia da UFRJ, em especial a Liana D. Fernandes, que sempre tinha palavras carinhosas e a Maria Nardelli que se tornou uma grande amiga e incentivadora.

Ao Ronnie, que foi um apoio constante, amigo e companheiro nessa jornada carioca.

Ao Rabino Chaim e Rebetzin Nechama Dina Broner e a Alizah Chekroun, responsáveis por um crescimento ainda maior.

Às minhas amigas do Lubavitch Girls Institute, as minhas amigas cariocas e gaúchas, em especial a minha querida amiga Clarice Dubin, que compartilhou comigo muitos momentos dessa jornada.

À equipe participante deste projeto, novamente aos Professores Ana Paula e Eduardo, por acreditarem nesse projeto, a Prof.^a Dr.^a Maria Cynésia e aos alunos Mayra e Vitor, do Mestrado e a aluna Débora Martino da graduação pela dedicação.

Ao Prof. Dr. Milton de Uzeda, pelo exemplo de pesquisador em microbiologia oral no Brasil.

Ao Prof. Dr. Carmelo Sansone, sempre disposto a ajudar na resolução de problemas burocráticos, essenciais para realização do estudo.

Aos professores e colaboradores do Mestrado de periodontia, Prof. Dr.^a Ana Thereza, Prof. Lucio, Prof. Ricardo Lima e Prof. Nilo, obrigada pelos ensinamentos e incentivo.

Aos professores da banca examinadora e da banca de qualificação do projeto e da tese.

Aos funcionários da Odontologia, obrigada pela ajuda ao longo do estudo.

Aos funcionários, alunos e professores do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, meus companheiros no dia-a-dia.

À CAPES/ UFRJ, pela bolsa de estudos, e em especial ao funcionário Mateus de Oliveira Lourenço da Pró- Reitoria de Pós- Graduação da UFRJ.

À FAPERJ e CNPq pelo apoio financeiro a projetos do Laboratório de Microbiologia Oral do qual participa o presente estudo.

E finalmente, aos pacientes desse estudo, que foram comprometidos e dedicados com o projeto e conosco. Vocês foram essenciais para essa busca de conhecimento.

RESUMO

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE AMOXICILINA E METRONIDAZOL ASSOCIADA À TERAPIA PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICA MELHORADA NA MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA

Débora Heller

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Vieira Colombo

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Objetivo: Avaliar os efeitos da administração sistêmica de amoxicilina (AMX) e metronidazol (MET) associada a uma terapia periodontal não-cirúrgica melhorada na microbiota subgengival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada (PAG). **Metodologia:** Um estudo clínico randomizado, controlado com placebo e duplo cego de 6 meses de acompanhamento foi realizado. Trinta e cinco indivíduos com PAG foram alocados randomicamente para o grupo controle (C, n=17) ou teste (T, n=18). Todos os pacientes receberam debridamento ultra-sônico supra e subgengival de todos os dentes, seguido de sessões de raspagem e alisamento radicular com irrigação subgengival, escovação de língua e bochecho com clorexidina a 0,2%. Após o debridamento, os indivíduos receberam AMX (500mg) e MET (250mg) sistêmicos, ou placebo, 3X por dia por 10 dias. Dados clínicos periodontais foram obtidos de 6 sítios/dente em todos os dentes por um único examinador. Amostras de biofilme subgengival foram coletadas de 14 sítios de cada paciente no início do estudo (pré-terapia), 3 e 6 meses após tratamento. A prevalência e níveis de 40 espécies orais e 39 “não-periodontais” foram determinados através do checkerboard. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas através dos testes Mann-Whitney, Qui-quadrado e Modelo Linear Geral para Medições Repetidas. **Resultados:** Para o presente estudo, análise *per-protocol* foi realizada com os 31 pacientes que tinham os dados microbiológicos completos. Melhoras clínicas

significativas foram obtidas em ambos os grupos ao longo do tempo (GLM, $p < 0.05$). Uma maior % média de sítios com redução na profundidade à sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), e ausência de bolsas residuais ($PS \geq 4\text{mm}$) foi observada nos indivíduos que receberam antibióticos (Mann-Whitney, $p < 0.05$). Apesar de existir grande variabilidade entre indivíduos na microbiota subgengival, o perfil microbiológico de ambos os grupos era similar na avaliação inicial (pré-terapia). Alta prevalência e níveis de patógenos periodontais clássicos, assim como espécies “não periodontais” foram observados. A maioria dos patógenos periodontais diminuiu significativamente ao longo do tempo (GLM, $p < 0.05$), enquanto bactérias “não-periodontais” apresentaram uma tendência a aumentar em ambos os grupos terapêuticos. Independente do protocolo utilizado, sítios que apresentaram perda de inserção e aumento de PS tinham maiores níveis de *D. pneumosintes*, *C. rectus* e *P. anaerobius* pré-terapia do que sítios que melhoraram aos 6 meses pós-tratamento (Mann-Whitney, $p < 0.05$). **Conclusão:** A terapia periodontal mecânica melhorada, com ou sem AMX e MET sistêmicos foi efetiva em reduzir a microbiota periodontopatogênica ao longo do tempo. No entanto, espécies não comumente associadas com PAG foram menos afetadas por essas terapias. Mais estudos que avaliem o papel dessas espécies na PAG e sua resposta a diferentes terapias são necessários.

Palavras-chave: periodontite agressiva, tratamento periodontal, microbiota subgengival, antimicrobianos, patógenos periodontais, checkerboard, sondas de DNA

Rio de Janeiro

Abril /2010

ABSTRACT

EFFECT OF SYSTEMIC AMOXICILLIN AND METRONIDAZOLE ASSOCIATED WITH NON-SURGICAL ENHANCED PERIODONTAL THERAPY ON THE SUBGINGIVAL MICROBIOTA OF AGGRESSIVE PERIODONTITIS PATIENTS

Débora Heller

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Vieira Colombo

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aim: To evaluate the effects of systemic amoxicillin (AMX) plus metronidazole (MET) associated with an enhanced mechanical therapy on the subgingival microbiota of generalized aggressive periodontitis (GAP). **Material and Methods:** The study was a 6-month randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. Thirty-five subjects with GAP were randomly assigned to control (C, n=17) or test group (T, n=18). All patients received a full-mouth supra- and subgingival ultra-sonic debridement followed by scaling and root planning associated with 0.2% chlorhexidine rinsing, brushing and irrigation. After full-mouth debridement, subjects received systemic AMX (500mg) plus MET (250mg) (T) or placebo (C), 3X per day for 10 days. Periodontal clinical measurements were recorded at 6 sites/tooth in all teeth by one calibrated examiner. Subgingival biofilm samples were collected from 14 sites of each patient at baseline, 3 and 6 months after treatment. Prevalence and levels of 40 oral and 38 “unusual” periodontal species were determined by checkerboard. Significant differences between groups were sought by Mann-Whitney, Chi-square and General Linear Model tests. **Results:** For the present study, *per-protocol* analysis was conducted for the 31 patients that had complete microbial data. Significant clinical improvement was obtained in both therapeutic groups over time (GLM, $p < 0.05$). A higher % of sites with PD and CAL reduction, and no residual pockets ($PD \geq 4\text{mm}$) were observed in subjects who received

antibiotics (Mann-Whitney, $p < 0.05$). Although a great inter-individual variability in the subgingival microbiota was seen, the baseline microbial profiles of both groups were similar. High prevalence and levels of periodontal pathogens, as well as “unusual” periodontal species were observed. Most of the periodontal pathogens decreased significantly over time (GLM, $p < 0.05$), whereas “unusual” bacteria tended to increase in both therapeutic groups. Regardless of the therapy employed, sites that showed attachment loss and PD increase harbored higher baseline levels of *D. pneumosintes*, *C. rectus* and *P. anaerobius* than sites that improved at 6 months (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Conclusions: The enhanced mechanical periodontal therapy with or without systemic AMX plus MET was effective in suppressing the periodontal pathogenic microbiota over time. However, species not commonly associated with GAP were less affected by these therapies. Further investigation of the role of these species in GAP and their response to different periodontal therapies are needed.

Key- words: Periodontitis, Aggressive periodontitis, Treatment, Subgingival Microbiota, Antimicrobials, Periodontal pathogens

Rio de Janeiro

Abril/2010

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius/ Celsius <i>degree</i>
AP	<i>Aggressive periodontitis</i>
AAP	<i>American Academy of Periodontology</i> /Academia Americana de Periodontia
AL	<i>Attachment loss or level</i>
AMX	<i>Amoxicillin</i> / Amoxicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BOP	<i>Bleeding on probing</i>
CAL	<i>Clinical attachment loss or level</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CHX	Clorexidina/ <i>chlorhexidine</i>
CI	<i>Confidence interval</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
cm	Centímetro/ <i>centimeter</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CP	<i>Chronic periodontitis</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> /Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
ECF	<i>Enhanced ChemiFluorescence</i>
EFI	Ensino fundamental incompleto
EFC	Ensino fundamental completo
EMI	Ensino média incompleto
EMC	Ensino médio completo
ESI	Ensino superior incompleto
ESC	Ensino superior completo
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> /ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	e outros
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
h	<i>Hour (s)</i> /Hora (s)
IC	Intervalo de confiança
ICC	Índice de Correlação Intraclasse/ <i>Intraclass correlation coefficient</i>

IESC	Instituto de Estudos em Saúde Coletiva
IHO	Instrução de Higiene Oral
IPV	Índice de Placa Visível
ISG	Índice de Sangramento Gengival
GAP	<i>Generalized Aggressive Periodontitis</i>
GLM	<i>General Linear Model/</i> Modelo Linear Geral para Medições Repetidas
g	<i>Gram/Grama</i>
JP2	<i>Highly Leukotoxic Strain of A. actinomycetemcomitans</i>
µl	Microlitro/ <i>microliter</i>
M	Molar
MET	<i>Metronidazole/</i> Metronidazol
mM	Milimolar/ <i>millimolar</i>
mg	Miligrama/ <i>milligram</i>
min	Minuto/ <i>minute</i>
ml	Mililitro/ <i>milliliter</i>
mm	Milímetro/ <i>millimeter</i>
NCI	Nível clínico de inserção
ng	Nanograma/ <i>nanogram</i>
<i>Nim</i>	Gene <i>nim</i>
%	Porcentagem/ <i>percentage</i>
OR	<i>Odds Ratio/</i> Razão de chances
<i>p</i>	Probabilidade
PA	Periodontite Agressiva
PAG	Periodontite Agressiva Generalizada
PAL	Periodontite Agressiva Localizada
PC	Periodontite Crônica
PD	<i>Probing depth</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Profundidade de sondagem
χ^2	Qui-quadrado/ <i>Chi-square</i>
RAR	Raspagem e Alisamento Radicular
RCT	<i>Randomized Controlled Trial</i>

Rho	Coeficiente de Spearman
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> /Ácido ribonucleico
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic acid</i> /Ácido ribonucleico ribossômico
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> / Lauryl Sulfato de Sódio
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SAS	Sangramento à sondagem
SRP	<i>Scaling and Root Planing</i>
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i> / citrato de salina sódica
SUP	<i>Suppuration</i> / supuração
TE	Tampão tris-EDTA
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1S. Oral bacterial taxa used for development of whole genomic DNA probes tested against subgingival biofilm samples.....52

Table 2S. Non-periodontal bacterial taxa used for development of whole genomic DNA probes tested against subgingival biofilm samples.....53

Table 1. Full-mouth clinical data (mean \pm SEM) of the study population at baseline, 3 and 6 months after periodontal treatment.....54

Table 2. Periodontal clinical parameters (mean \pm SEM) of the sites sampled for microbiological analysis of subjects in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months after therapy.....55

Anexos

Tabela 1A. Características demográficas dos 39 indivíduos nos dois grupos clínicos no exame inicial.....105

Tabela 2A. Características clínicas periodontais (média \pm DP) de todos os sítios examinados dos 39 pacientes no exame inicial.....106

Tabela 3A. Parâmetros clínicos periodontais (média \pm DP) dos sítios selecionados para análise microbiológica dos 39 pacientes no exame inicial.....107

Tabela 4A. Associações significativas entre prevalência e níveis de espécies bacterianas e parâmetros demográficos da população estudada (n=39).....108

Tabela 5A. Associações significativas entre prevalência e níveis de espécies bacterianas e parâmetros clínicos periodontais da população estudada (n=39)..... 109

LISTA DE FIGURAS

Corpo da Tese

Figura 1. Desenho esquemático do protocolo terapêutico do estudo, contendo os exames clínicos e microbiológicos.....18

Artigo

Figure 1. Flow chart of the study design.....58

Figure 2. Mean (\pm SD) percentage of the sampled sites that showed (A) increase or reduction in PD, and (B) attachment loss or gain at 6 months post-therapy in the 2 groups. Only sites that reduced PD and gained attachment but did not present residual pockets (PD \geq 4 mm) at 6 months were considered. Likewise, only sites that increased PD and lost attachment and presented residual PD \geq 4 mm at 6 months were considered. Significant differences between groups were tested by Mann-Whitney test, * $p < 0.05$59

Figure 3. Inter-individual variability in the prevalence of (A) *A. actinomycetemcomitans* (Aa), (B) *P. gingivalis*, (C) *T. forsythia* and (D) *T. denticola* in the control (n=15) and test (n=16) clinical groups at baseline. Each circle represents the frequency of a bacterial species in the 14 sites sampled from each individual for microbial analysis.....60

Figure 4. Changes in mean (\pm SEM) prevalence (%) of oral species in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months post-therapy. The % of sites colonized by each species was determined for each subject and then average across subjects in each group for each time point separately. The species were ordered according to the complexes described by Socransky et al. (1998). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ refer to significant differences between groups at baseline (Mann-Whitney test). # $p < 0.05$ refers to significant differences between the groups over time and † $p < 0.05$ refers to significant differences in the groups over time (GLM test).....61

Figure 5. Changes in mean (\pm SEM) levels ($\times 10^5$ cells) of oral species in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months post-therapy. The mean counts of each species were computed for each individual, and then averaged across subjects in each group at each time point. The species were ordered according to the complexes described by Socransky et al. (1998). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ refer to significant differences between groups at baseline (Mann-Whitney test). # $p < 0.05$ refers to significant differences between the groups over time and † $p < 0.05$ refers to significant differences in the groups over time (GLM test).....62

Figure 6. Changes in mean (\pm SEM) prevalence (%) of “non-periodontal” species in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months post-therapy. The % of sites colonized by each species was determined for each subject and then average across subjects in each group for each time point separately. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ refer to significant differences between groups at baseline (Mann-Whitney test). # $p < 0.05$ refers to significant differences between the groups over time and † $p < 0.05$ refers to significant differences in the groups over time (GLM test).....63

Figure 7. Changes in mean (\pm SEM) levels ($\times 10^5$ cells) of “non-periodontal” species in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months post-therapy. The mean counts of each species were computed for each individual, and then averaged across subjects in each group at each time point. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ refer to significant differences between groups at baseline (Mann-Whitney test). # $p < 0.05$ refers to significant differences between the groups over time and † $p < 0.05$ refers to significant differences in the groups over time (GLM test).....64

Figure 8. Bacterial species that differed significantly in prevalence at baseline (upper bars) and at 6 months (lower bars) between sites that gained or lost clinical attachment after therapy in the control (placebo) and test (systemic antibiotics) groups (* $p < 0.05$; Chi-square test).....65

Figure 9. Bacterial species that differed significantly in mean levels ($\times 10^5$ cells) at baseline (upper bars) and at 6 months (lower bars) between sites that gained or lost clinical attachment after therapy in the control (placebo) and test (systemic antibiotics) groups (* $p < 0.05$; Mann-Whitney test).....66

Anexos

- Figura 2A.** Média da prevalência das espécies orais nas amostras de biofilme subgingival dos 39 pacientes com periodontite agressiva generalizada nos dois grupos clínicos, no início do estudo. *Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$, teste de Mann-Whitney).....110
- Figura 3A.** Média dos níveis ($\times 10^5$ células) das espécies orais nas amostras de biofilme subgingival dos 39 pacientes com periodontite agressiva generalizada nos dois grupos clínicos, no início do estudo. *Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$, teste de Mann-Whitney).....111
- Figura 4A.** Média da prevalência das espécies “não-periodontais” nas amostras de biofilme subgingival dos 39 pacientes com periodontite agressiva generalizada nos dois grupos clínicos, no início do estudo. *Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$, teste de Mann-Whitney).....112
- Figura 5A.** Média dos níveis ($\times 10^5$ células) das espécies “não-periodontais” nas amostras de biofilme subgingival dos 39 pacientes com periodontite agressiva generalizada nos dois grupos clínicos, no início do estudo. *Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$, teste de Mann-Whitney).....113
- Figura 6A.** Relações inversas na prevalência de *Streptococcus sanguinis* e as espécies “não-periodontais” *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* nos 39 indivíduos com PAG no início do estudo.....114
- Figura 7A.** Relações inversas na prevalência dos patógenos periodontais *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* e *Dialister pneumosintes* nos 39 indivíduos com PAG no início do estudo.....115
- Figura 8A.** Perfil radiográfico e clínico das condições periodontais de diferentes pacientes do estudo.....116

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
<i>ABSTRACT</i>	xiii
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. PROPOSIÇÃO.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Amostra Populacional do Estudo.....	14
3.2. Exame Clínico Periodontal.....	14
3.3. Cálculo do Tamanho Amostral.....	15
3.4. Randomização e Alocação dos Pacientes.....	15
3.5. Protocolo Terapêutico.....	16
3.6. Análises Microbiológicas.....	19
3.6.1. Determinação da microbiota subgengival pela técnica do “Checkerboard DNA-DNA hybridization”	19
3.6.2. Hibridização das membranas com as sondas de DNA.....	19
3.6.3. Detecção das espécies bacterianas.....	20
3.7. Análise Estatística.....	21
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÃO.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8. ANEXOS.....	100

1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias crônicas, de natureza multifatorial, que resultam na destruição dos tecidos de proteção e sustentação dos dentes, bem como em perdas dentárias precoces. Os danos aos tecidos periodontais causam evidente repercussão negativa na qualidade de vida do indivíduo, pois comprometem aspectos funcionais e estéticos, frequentemente afetando a auto-estima pessoal (Cunha-Cruz et al. 2007). A ocorrência e progressão dessas doenças envolvem uma complexa interação entre bactérias periodontopatogênicas, componentes do sistema imune do hospedeiro, assim como fatores de risco ambientais, genéticos e sistêmicos (Page et al. 1997). As doenças periodontais podem ter manifestações clínicas variadas e, atualmente, admite-se que essas representem patologias distintas. Assim, cada uma dessas entidades clínicas poderá apresentar uma etiopatogenia específica, e requerer abordagens terapêuticas e prognósticos distintos (Tonetti & Mombelli 1999).

Diversos sistemas classificatórios das doenças periodontais já foram estabelecidos, sendo o mais recente elaborado pela Academia Americana de Periodontia em 1999 (Armitage 1999). Um novo termo, Periodontite Agressiva (PA), foi criado para descrever um conjunto de doenças com múltiplas subformas e um fenótipo clínico comum. Essas doenças foram divididas em Periodontite Agressiva Localizada (PAL) e Periodontite Agressiva Generalizada (PAG). Suas características mais frequentes, porém não universalmente presentes, são: ausência de condições sistêmicas de saúde ou doença; rápida progressão na perda de inserção e destruição óssea; proporções elevadas de *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* e, em alguns casos, de *Porphyromonas gingivalis*; além de anormalidades nas funções fagocitárias (Armitage 1999). Outra característica peculiar destas doenças é a sua comum ocorrência entre membros da mesma família (Nibali et al. 2008a). A PAL é uma doença de acometimento circumpuberal, atingindo os primeiros molares e incisivos permanentes. Está frequentemente associada à presença do *A. actinomycetemcomitans* e a disfunções fagocitárias, sendo a resposta imune aos patógenos infectantes comumente detectada pela presença de altos títulos de anticorpos séricos para esses agentes (Nakagawa et al. 2001, Schenkein et al. 2007). Já a PAG acomete indivíduos abaixo dos 30 anos de idade, porém indivíduos acima dessa faixa etária também podem manifestar a doença. A PAG caracteriza-se por episódios pronunciados de destruição dos tecidos periodontais, incluindo a perda de inserção interproximal de no mínimo três dentes permanentes,

além dos primeiros molares e incisivos (Armitage 1999). Polimorfismos genéticos também podem influenciar a PAG de maneira complexa, atuando em conjunto com as variáveis genéticas e fatores ambientais (Brett et al. 2005, de Souza & Colombo 2006, Meng et al. 2007).

Essa rápida destruição característica das PAs parece possuir múltiplos fatores causais e ter uma marcante predisposição genética. Dentre estes fatores, a presença de microorganismos específicos, resposta imune inadequada à infecção (Alfant et al. 2008, Nibali et al. 2008a, Nibali et al 2008b), higiene oral deficiente e tabagismo têm um papel relevante e aumentam significativamente o risco da ocorrência e progressão dessas doenças. O risco de desenvolver PA também é maior em alguns grupos étnico-raciais, particularmente africanos e hispânicos (Albandar & Rams 2002). Esses aspectos da etiopatogênese das PAs ainda não estão completamente elucidados, mas podem ser úteis na identificação e diagnóstico de pacientes, assim como na escolha de condutas terapêuticas adequadas a estas condições (Kinane et al. 2001).

A prevalência da PA na população em geral é baixa (0,1-5%), sendo maior em países em desenvolvimento (Albandar & Tinoco 2002). São poucos os estudos existentes que sejam representativos da condição periodontal de indivíduos das Américas Central e do Sul (Gjerme et al. 2002). No Brasil, um estudo pioneiro registrou uma prevalência da periodontite juvenil localizada, atualmente denominada PAL, de 0,3% (Tinoco et al. 1997). Em outra comunidade brasileira, a prevalência de PAL foi de 1,66% e de PAG de 3,66% (Cortelli et al. 2002). Uma investigação epidemiológica mais recente reportou uma prevalência de 5,5% de PA, considerada alta à nível mundial (Susin & Albandar 2005).

O fator etiológico primário da periodontite é a presença do biofilme subgengival periodontopatogênico (Socransky & Haffajee 1992, Haffajee & Socransky 1994). Logo, o conhecimento da microbiota periodontal é muito importante para o diagnóstico dessas doenças. Entretanto, existem certas dificuldades em se definir os verdadeiros patógenos periodontais devido à complexidade da microbiota, à natureza episódica da doença e às limitações técnicas. Assim, critérios específicos para definição desses patógenos foram estabelecidos através da adaptação dos clássicos “postulados de Koch” (Socransky & Haffajee 1992). A partir desses critérios, observou-se que apenas um número limitado de espécies orais está associado às várias formas de doença periodontal. Dentre as diversas espécies do biofilme subgengival, o *A. actinomycetemcomitans* e a *P. gingivalis* são considerados patógenos periodontais putativos (Haffajee & Socransky

1994). Além disso, existe o conceito de que as infecções periodontais são na verdade doenças polimicrobianas e não doenças causadas por um único patógeno periodontal. Socransky et al. (1998) descreveram a presença de 5 complexos microbianos no biofilme subgengival, sendo eles: o complexo vermelho (*P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus* [atualmente *Tannerella forsythia*] e *Treponema denticola*); o complexo laranja (*Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* [atualmente *Parvimonas micra*], *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*); o complexo amarelo (*Streptococcus sanguis* [atualmente *Streptococcus sanguinis*], *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*); o complexo verde (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens*, *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a); o complexo roxo (*Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*). Posteriormente, foi descrito mais um complexo, o complexo azul, composto pelas espécies *Actinomyces gerensceriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* 1, *Actinomyces. naeslundii* 2 [anteriormente denominado *Actinomyces viscosus*] (Socransky & Haffajee 2002). O complexo vermelho e o complexo laranja correlacionam fortemente com sinais e sintomas de doença periodontal, enquanto os complexos amarelo, roxo e azul estão mais associados à saúde periodontal.

Em relação às PAs, estudos em populações distintas têm reportado uma grande variabilidade na composição da microbiota subgengival (Albandar et al. 1997, Mullally et al. 2000, Tan et al. 2001, Lee et al. 2003, Takeuchi et al. 2003, Gajardo et al. 2005, Picolos et al. 2005, Yang et al. 2005, Xajigeorgiou et al. 2006, Ximenez-Fyvie et al. 2006, Botero et al. 2007, Mayorga-Fayad et al. 2007, Faveri et al. 2008, 2009). Essas diferenças microbiológicas também podem justificar as variações na prevalência e gravidade das doenças periodontais em diferentes regiões do mundo (Albandar & Rams 2002, Albandar & Tinoco 2002, Gjermo et al. 2002, Susin & Albandar 2005). Mullally et al. (2000) sugeriram que as PAL e PAG são duas entidades clínicas diferentes que podem ser distinguidas com base no perfil microbiológico desses pacientes. O grupo formado por pacientes com alta frequência de *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* foi associado com a forma localizada da doença, enquanto o grupo composto por *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. nigrescens*, *T. denticola* estaria relacionado com a forma generalizada. A espécie *A. actinomycetemcomitans*, em

particular, é considerada o principal patógeno comumente associado à PA, principalmente à forma localizada da doença (Asikainen et al. 1986, Albandar et al. 1997, Lopez et al. 1996, Tinoco et al. 1997, Fine et al. 2007, Haubek et al. 2008). Alguns autores até sugerem que a sua detecção em indivíduos com saúde periodontal pode ser utilizada como marcador de risco para o desenvolvimento de PAL (Fine et al. 2007). No entanto, em estudos recentes, patógenos periodontais como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. notadum* e *P. nigrescens* foram mais associados com a PA do que o *A. actinomycetemcomitans* (Lee et al. 2003, Takeuchi et al. 2003, Gajardo et al. 2005, Ximenez-Fyvie et al. 2006, Botero et al. 2007, Mayorga-Fayad et al. 2007, Faveri et al. 2009). Estudos nas populações japonesa e grega também verificaram uma maior associação de *P. gingivalis* e outros patógenos comumente encontrados na Periodontite Crônica (PC) com a PA (Takeuchi et al. 2003, Kamma et al. 2004)

O conceito de infecção clonal também vem sendo bastante discutido na etiologia das doenças periodontais (Socransky & Haffajee 1992, Haffajee & Socransky 1994). Assim, estudos têm associado tipos genéticos virulentos específicos de alguns patógenos com a doença agressiva. Por exemplo, a espécie *A. actinomycetemcomitans* produz uma leucotoxina potente capaz de destruir diversas células imunológicas do hospedeiro, incluindo neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos. Algumas cepas (JP2) apresentam um genótipo altamente leucotóxico, ou seja, produzem de 10 a 20 vezes mais dessa leucotoxina em relação a cepas minimamente leucotóxicas (652) (Brogan et al. 1994). Vários autores observaram uma forte associação entre essas cepas altamente leucotóxicas e a presença de PAL (Haraszthy et al. 2000, Mombelli et al. 2002, Haubek et al. 2004), bem como a um risco maior de perda de inserção periodontal (Haubek et al. 2008). Além disso, foi observado que Afro-Americanos e Hispânicos apresentavam uma maior prevalência dessas cepas altamente leucotóxicas do que Caucasianos, sugerindo uma relação desse tipo clonal com a etnia dos indivíduos (Haubek et al. 2004). Mais recentemente, Schacher et al. (2007) verificaram que a detecção apenas da espécie *A. actinomycetemcomitans*, sem diferenciação de genótipos, não é um método diagnóstico sensível nem específico para as PAs.

Dentre os estudos já realizados em paciente brasileiros, também se observou uma forte associação do *A. actinomycetemcomitans* com a PAL (Tinoco et al. 1997). Por outro lado, Trevilatto et al. (2002) avaliaram o perfil microbiológico de uma família brasileira de 14 indivíduos com PA e demonstraram que as bactérias mais frequentes eram *T. forsythia* e *T. denticola*. Ao avaliar a prevalência de periodontopatógenos em

brasileiros com PC e PA, Cortelli et al. (2005) observaram uma alta prevalência de *P. gingivalis* em pacientes com PA. Ao contrário de outros estudos na América Latina, esses autores também observaram uma alta prevalência de *A. Actinomycetemcomitans*, em particular do tipo altamente leucotóxico nesses pacientes brasileiros com PA, relação que eles sugerem ser devido à alta proporção de ancestrais africanos no Brasil (Cortelli et al. 2003, 2005). Mais recentemente, Faveri e colaboradores (2009) avaliaram a microbiota de indivíduos brasileiros com PC, PAG, PAL e saúde periodontal e observaram uma alta prevalência dos três patógenos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*), assim como patógenos do complexo laranja nos pacientes com periodontite em comparação aos saudáveis. As espécies mais prevalentes na PAL foram *T. forsythia* e *P. gingivalis*. *A. actinomycetemcomitans* estava presente, mas em menores quantidades, ainda assim sendo mais observado na forma localizada de PA. *F. nuc. polymorphum* e *P. gingivalis* foram detectados em alta frequência em pacientes com PAG. Esses dados reforçam os estudos atuais sobre a diversidade da microbiota de indivíduos com PA de populações latino-americanas. Colombo et al. (2002) realizaram um estudo para determinar a microbiota subgingival de pacientes com PC não tratada e constataram uma alta prevalência de *A. actinomycetemcomitans* tanto em indivíduos doentes (41% dos sítios), como saudáveis (25% sítios). Este mesmo grupo verificou que apesar da alta frequência do *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos com periodontite crônica, muito poucos apresentaram o genótipo altamente leucotóxico (Rosalem et al. 2006b). Por outro lado, cepas altamente leucotóxicas foram detectadas em 57,1% de pacientes com PAG. Nenhuma cepa altamente leucotóxica foi detectada em pacientes com saúde periodontal (Rosalem et al. 2006a). Esses estudos especulam que o *A. actinomycetemcomitans* parece ser um membro da microbiota endógena de indivíduos brasileiros, e sua prevalência é mais elevada nessa população, particularmente na PC e PA (Jardim et al. 2006).

Além desses periodontopatógenos, outros microorganismos também podem estar associados à etiopatogenia das PAs, e a compreensão desses outros fatores causais também é importante. O papel dos treponemas orais, como por exemplo o *Treponema socranskii* vem sendo sendo investigado em pacientes com diferentes formas de doenças periodontais (Moter et al. 2006). Espécies não comumente associadas à microbiota da cavidade oral, como *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* também

tem sido detectados em maiores prevalências e níveis em sítios com lesões periodontais do que em sítios sem doença (Souto et al. 2006, Fritschi et al. 2008, Souto & Colombo 2008a,b). Alguns estudos também sugerem que a presença do Herpes Vírus em sítios periodontais pode ser importante na etiopatogênese da periodontite através da alteração da resposta local do hospedeiro (Slots & Contreras 2000). A presença desse e/ou de outros vírus leva a uma imunossupressão local, o que pode contribuir para a destruição acentuada dos tecidos periodontais de suporte presente nas PAs (Kamma & Slots 2003, Watanabe et al. 2007).

Essas diferenças geográficas encontradas na composição da microbiota subgingival de indivíduos de populações distintas (Haffajee et al. 2004), mas com níveis semelhantes de doença, podem influenciar a escolha da terapia, bem como a resposta terapêutica a regimes de tratamento universais (Beikler et al. 2004). Baseando-se na etiologia microbiana das infecções periodontais, o tratamento dessas doenças tem como principal objetivo o controle dos microorganismos patogênicos do biofilme subgingival e o restabelecimento de um microambiente compatível com saúde (Teles et al. 2006). Além disso, o fato de que esses microorganismos não estão dispostos de maneira planctônica, e sim na forma de biofilme, é essencial para a escolha da terapia, assim como para a avaliação da resposta terapêutica. Os microorganismos dispostos em biofilmes são mais resistentes a antimicrobianos e à resposta imune do hospedeiro (Costerton et al. 1995, Marsh 2005). Assim, é necessária a desorganização mecânica deste biofilme para o sucesso de qualquer terapia periodontal. A melhor terapia para cada indivíduo é aquela que gera uma comunidade clímax estável e oferece estabilidade periodontal a longo prazo. Ou seja, uma terapia capaz de reduzir ou eliminar os periodontopatógenos, e manter uma microbiota compatível com o hospedeiro (Socransky & Haffajee 2005, Teles et al. 2006).

O tratamento das periodontites, especialmente das formas agressivas, tem sido um desafio para o clínico devido à ausência de um protocolo terapêutico bem estabelecido, resultado das dificuldades em se definir a sua etiopatogenia. Apesar disso, estudos têm demonstrado os efeitos clínicos benéficos das terapias não-cirúrgicas (Badersten 1984) e cirúrgicas (Serino et al. 2001) em pacientes com doença periodontal avançada. Ambas as terapias mostraram-se capazes de estabelecer condições de saúde periodontal na maioria dos sítios, passíveis de serem mantidas a longo prazo. No entanto, nem todos os pacientes apresentam respostas favoráveis ao tratamento mecânico. Diversos estudos ressaltam a existência de um grupo de indivíduos (10 a 15%

dos indivíduos com doença periodontal) que não responde à terapia periodontal convencional, classificados como “refratários”. Esses pacientes continuam a perder inserção periodontal mesmo após meticoloso tratamento e inclusão em programas de manutenção (Colombo et al. 1998a, Colombo et al. 1998b, Colombo et al. 1998c, Colombo et al. 1999). Esses autores demonstraram que pacientes com periodontite refratária são bastante heterogêneos em relação a características clínicas, microbiológicas, imunológicas e genéticas (Colombo et al. 1998a, Colombo et al. 1998b, Colombo et al. 1998c, Colombo et al. 1999, Socransky et al. 2002). Nesses casos recidivantes e nos casos de doenças agressivas, tem se preconizado o uso da terapia antimicrobiana associada à terapia mecânica (AAP 2004, van Winkelhoff 2005). Esses agentes podem afetar a microbiota supra e subgengival, e suprimir ou erradicar patógenos periodontais (Trombelli et al. 2003). O seu uso tem o potencial de afetar os periodontopatógenos via saliva e fluido crevicular gengival em vários sítios da cavidade oral, e também nos sítios subgengivais que foram manipulados de maneira insuficiente somente pela instrumentação mecânica do biofilme (Ehmke et al. 2005). Logo, as informações microbiológicas são essenciais para o uso racional de antimicrobianos locais e/ou sistêmicos nesses pacientes (van Winkelhoff 2003). Duas revisões sistemáticas da literatura reafirmam os benefícios clínicos e microbiológicos do uso de antibióticos sistêmicos associados à terapia mecânica periodontal (Herrera et al. 2002, Haffajee et al. 2003). Esses autores concluíram que pacientes com PA seriam aqueles que mais se beneficiariam do uso de antimicrobianos sistêmicos. Entretanto, os autores indicam que ainda não há dados suficientes para se indicar um antimicrobiano específico como adjunto à terapia mecânica, e sugerem que mais estudos clínicos randomizados sejam realizados sobre esse tema.

Dentre os possíveis regimes terapêuticos com antimicrobianos, a combinação de amoxicilina (AMX) e metronidazol (MET) tem sido sugerida devido ao seu amplo espectro de ação e efeito sinérgico sobre o *A. actinomycetemcomitans* (Pavicic et al. 1991). Alguns estudos inclusive observaram a supressão desse microorganismo por um longo período de tempo em pacientes com doença periodontal avançada tratados com essa combinação (van Winkelhoff et al. 1992, Pavicic et al. 1994b). Estudos clínicos randomizados também relatam melhoras clínicas e microbiológicas em pacientes com PC tratados com esses antimicrobianos (Berglundh et al. 1998, Flemming et al. 1998a,b, Winkel et al. 2001, Rooney et al. 2002, Cionca et al. 2009, Ribeiro Edel et al. 2009). Essas alterações microbiológicas (redução de patógenos periodontais) parecem resultar

das mudanças que ocorrem naquele nicho ecológico após terapia (Rhemrev et al. 2006, Teles et al. 2006).

Devido à ocorrência menos freqüente das PAs, poucos estudos relatam os efeitos clínicos e microbiológicos a longo prazo da terapia periodontal sobre esses pacientes. Em um desses estudos, raspagem e alisamento radicular (RAR), AMX+MET, MET e doxiciclina foram testados no tratamento de PAG. A associação de AMX e MET associada à terapia mecânica foi o único protocolo terapêutico capaz de reduzir os níveis de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* até 6 meses pós-terapia (Xajigeorgiou et al. 2006). Yek et al. (2010) observaram uma redução na freqüência de espécies do complexo vermelho 6 meses após terapia com ou sem AMX+MET em indivíduos com PAG. No entanto, a redução de *T. forsythia* a níveis indetectáveis após terapia foi observada somente com a associação de AMX+MET. O uso de AMX+MET associado à RAR mostrou melhores resultados do que RAR e placebo em uma avaliação de 3 meses após tratamento de indivíduos com PAG. Essa combinação foi capaz de reduzir os níveis de diversos periodontopatógenos, especialmente em sítios com bolsas periodontais mais profundas (Mestnik et al. 2010). Os efeitos benéficos do MET (Sigusch et al. 2001) e da sua associação com AMX (Guerrero et al. 2005, Xajigeorgiou et al. 2006, Kaner et al. 2007a, Moreira & Feres-Filho 2007, Machtei et al. 2008, Buchmann et al. 2010, Mestnik et al. 2010, Yek et al. 2010) sobre os parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos da PA também foram reportados em outros estudos que utilizaram diferentes condutas terapêuticas. Dois desses estudos (Guerrero et al. 2005, Moreira & Feres-Filho 2007) utilizaram uma proposta terapêutica conhecida como “*full-mouth disinfection*” que envolve o tratamento periodontal mecânico e antimicrobiano completo em um período de até 24h (Quirynen et al. 1995, 1996, 1999, 2006, Bollen et al. 1996, 1998). Essa terapia teria como vantagem retardar ou evitar a re-infecção de sítios periodontais já tratados, antes que um novo e compatível ecossistema tenha se estabelecido, o que ocorreria na terapia mecânica convencional (Quirynen et al. 1995, 1996, 1999, 2006, Bollen et al. 1996, 1998). Isso se justifica na constatação de que os microorganismos periodontopatogênicos também são capazes de colonizar outros sítios intra-orais além da bolsa periodontal, como tonsilas, língua e outras mucosas orais (Asikainen et al 1991, Danser et al. 1994). Além disso, alguns estudos demonstram a possibilidade de ocorrer translocação intra-oral desses periodontopatógenos do sítio periodontal para outros locais da boca e vice-versa (Quirynen et al. 1996, Pawlowski et al. 2005). No

entanto, essa conduta terapêutica também apresenta desvantagens. Dentre essas, o pouco contato estabelecido entre o paciente e o profissional pelo curto intervalo de tempo em que o tratamento se estabelece pode acarretar um controle de higiene oral menos eficiente (Vandekerckhove et al. 1996). Especialmente nos casos mais graves de doença periodontal, é importante o monitoramento do paciente pelo profissional para aperfeiçoar a higiene oral e consolidar a relação paciente-profissional (Apatzidou 2006). Além disso, episódios como febre, desconforto e aparecimento de lesões bucais também são frequentes após essa terapia (Apatzidou & Kinane 2004, Quirynen et al. 2000).

A terapia “*full-mouth disinfection*” também envolve o amplo uso tópico de digluconato de clorexidina (CHX) na forma de bochechos (0,12%), escovação de língua com gel e irrigação subgengival (2%), associado ao tratamento mecânico e administração sistêmica de antibióticos (Oosterwaal et al. 1991). A CHX é o anti-séptico considerado “padrão-ouro” no controle químico do biofilme oral (Jones 1997). Esse anti-séptico quando associado à higiene bucal apresenta maiores benefícios no controle de biofilme supragengival e na inflamação marginal do que somente a higiene bucal com instrumentos mecânicos (van Strydonck et al. 2008). A importância do controle de placa na terapia periodontal foi avaliada em diversos estudos. Os melhores resultados terapêuticos periodontais ocorreram naqueles indivíduos com os melhores padrões de higiene oral (Axelsson et al. 1991, Westfelt et al. 1998, Ximenez-Fyvie et al. 2000, Checchi et al. 2002). Assim, estudos mais recentes na literatura têm indicado o uso desse anti-séptico como auxiliar à raspagem mecânica no tratamento de pacientes com doença periodontal avançada. Em um ensaio clínico randomizado, Favari et al. (2006) e posteriormente Feres et al. (2009) relataram um efeito benéfico do digluconato de CHX na forma de bochecho a 0,12%, nos parâmetros clínicos e microbiológicos pós-terapia periodontal de pacientes com PC. Pacientes do grupo teste apresentaram melhores padrões de higiene oral e, conseqüentemente, uma melhor resposta clínica. A microbiota subgengival também obteve benefícios com o uso dessa conduta, apresentando uma menor detecção de periodontopatógenos do complexo vermelho pós-terapia. Ao contrário do “*full-mouth disinfection*”, esse protocolo terapêutico possibilita um contato mais prolongado do profissional com o paciente periodontal. No entanto, faz amplo uso do digluconato de CHX como sugerido no tratamento de 24 horas.

Ainda em relação ao tratamento periodontal com antimicrobianos, alguns autores têm observado que as mudanças clínicas e microbiológicas benéficas que ocorrem após terapia periodontal são mais significativas em indivíduos que nunca

receberam tratamento prévio (Teles et al. 2006). Esse fato reforça ainda mais a relevância do tratamento periodontal em pacientes brasileiros, cuja população ainda tem pouco acesso a serviços de saúde bucal. Além disso, existe uma grande necessidade em se desenvolver terapias que sejam efetivas e de bom custo-benefício para controlar a doença periodontal em populações como esta (Slots 2002, Slots & Jorgensen 2002).

Apesar do efeito adjuvante da terapia com antibióticos, esta não deve ser usada em larga escala e de maneira indiscriminada devido aos seus possíveis efeitos adversos, tais como diminuição do fluxo salivar, aumento de infecções oportunistas (por exemplo, candidíase oral), lesões liquenóides na mucosa oral, inflamação e pigmentação do tecido gengival (Ciancio 2002, Roberts 2002, Seymour & Hogg 2008). Além disso, o uso abusivo e empírico de agentes antibacterianos tem levado ao crescente número de microrganismos resistentes a esses medicamentos. A resistência microbiana tem se tornado um problema mundial de âmbitos médico, econômico e de saúde pública, embora não atinja todos os países da mesma maneira (van Winkelhoff et al. 2005). No Brasil, o uso de remédios em geral cresce cada vez mais devido aos hábitos de automedicação da população, estando o antibiótico entre os medicamentos mais consumidos pelos brasileiros (Berquo et al. 2004, Vilarino et al. 1998). A cooperação do paciente ao regime terapêutico é outro fator relevante na questão da resistência, visto que o período ou frequência da ingestão do medicamento é dificilmente controlado pelo profissional. A falta de aderência ao tratamento periodontal com antimicrobianos sistêmicos também pode justificar alguns resultados clínicos menos favoráveis observados em alguns estudos (Guerrero et al. 2007).

A resistência microbiana ocorre basicamente devido a três mecanismos: intrínseca, mutante e por meio de aquisição horizontal de material genético de outra bactéria (Walker 1996). Apesar de ser efetiva contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, a AMX é altamente suscetível às betalactamases, enzimas estas relativamente comuns nas bolsas periodontais. O crescente número de bactérias produtoras de betalactamases, especialmente cepas dos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* (van Winkelhoff et al. 1997, Bernal et al. 1998, Matto et al. 1999, Aldridge et al. 2001), tem sido observado, o que pode limitar o uso desse antimicrobiano na terapia periodontal. Já o MET apresenta excelente atividade contra bacilos anaeróbios Gram-negativos e espiroquetas, sendo a maioria dessas bactérias suscetíveis a este agente (Seymour & Hogg 2008). A resistência ao MET é incomum, e muitas vezes pode resultar de erros metodológicos laboratoriais como, por exemplo,

técnica de anaerobiose deficiente (Diniz et al. 2004). No entanto, biofilmes associados à *P. gingivalis* mostraram-se resistentes a esse antimicrobiano, em concentrações usualmente atingidas no seu uso sistêmico (Wright et al. 1997). Por exemplo, Eick et al. (2004) demonstraram um aumento de 100 vezes na concentração inibitória mínima do MET contra *P. gingivalis* quando este era cultivado sob a forma de biofilme. Quatro genes, *nimA*, *nimB*, *nimC* e *nimD* foram descritos como capazes de conferir resistência ao MET em colônias de *Bacteroides* spp. (Trinh et al. 1996). Estes genes podem ser encontrados em cromossomos ou em plasmídeos, e podem ser transmitidos por conjugação para microorganismos orais, incluindo *P. gingivalis* ou *P. intermedia*. Apesar disso, a resistência ao MET parece ser de rara ocorrência, e geralmente a falha no tratamento com essa droga não é devido à resistência bacteriana (Roberts 2002). Em relação à CHX, estudos clínicos demonstram que o uso prolongado desse anti-séptico não causa resistência microbiana ou surgimento de microorganismos oportunistas (Schiott et al. 1976a,b, Løe 2000). Isso pode ser resultado do seu amplo espectro de ação, ao contrário dos antibióticos sistêmicos que possuem espectros mais limitados (Sreenivasan & Gaffar 2002).

Devido às várias mudanças ecológicas na cavidade oral que ocorrem com o uso de antimicrobianos sistêmicos, é de grande importância que reavaliações microbiológicas sejam feitas de periodicamente após a terapia para se verificar a supressão ou eliminação de periodontopatógenos e a presença de possíveis microorganismos superinfectantes (AAP 2004). Logo, um aspecto fundamental se refere ao emprego de metodologias adequadas de diagnóstico microbiológico. Estima-se que existam mais de 700 espécies diferentes na cavidade oral, sendo 400 destas detectadas no biofilme subgingival. Dentre estas espécies, aproximadamente metade não é cultivável *in vitro*, o que torna necessária a utilização de técnicas de biologia molecular, tais como as baseadas na clonagem e seqüenciamento do gene do 16S rRNA, hibridização com sondas de DNA (por ex., *checkerboard DNA-DNA hybridization*) e, mais recentemente, a técnica de *microarrays* (Paster et al. 2001, 2006, Colombo et al. 2009). Essas técnicas apresentam uma grande variabilidade de resultados, muitas vezes observada nos diversos estudos microbiológicos. Por exemplo, Papapanou et al. (1997) demonstraram uma razoável concordância entre o método do *Checkerboard* e a cultura na identificação de bactérias presentes no biofilme subgingival, porém o método molecular apresentou uma maior sensibilidade, principalmente para espécies fastidiosas e de difícil cultivo. Considerando a complexidade da microbiota periodontal e sua

variabilidade de um sítio e/ou indivíduo para outro, métodos que permitam a avaliação de um grande número de amostras e espécies microbianas simultaneamente são atualmente os mais indicados.

Independentemente da técnica de identificação microbiana usada, alguns aspectos relevantes que devem ser considerados nos estudos de microbiologia periodontal incluem: o método de coleta da amostra, o tipo de amostra (saliva, biofilme ou fluido gengival) e o número de sítios analisados (Mombelli et al. 2000, Teles et al. 2008). Teles et al. (2008) demonstraram uma boa reprodutibilidade da utilização de curetas periodontais para coleta de biofilme subgengival. Em relação ao número de sítios ou dentes a serem avaliados, deve ser lembrado que um grande número de amostras é necessário para a detecção de espécies menos prevalentes, como o *A. actinomycetemcomitans* (Haffajee & Socransky 1992). Alguns autores têm sugerido a utilização da saliva como um método não invasivo, fácil e de baixo custo para a análise microbiológica de patógenos periodontais (Asikainen et al. 1991, Rosalem et al. 2006b), porém o tipo de amostra pode variar dependendo da espécie que está sendo avaliada. Logo, o método mais adequado para a análise microbiológica periodontal deverá considerar a prevalência e os níveis da espécie investigada, a sensibilidade do método, e a praticidade no processamento de várias amostras e espécies simultaneamente (Atieh 2008).

Enfim, a PAG é uma forma de doença periodontal grave, com uma prevalência relativamente alta na população brasileira de adultos jovens. O tratamento desta doença tem sido um desafio para o clínico e ainda não há protocolos terapêuticos estabelecidos para nossa população. Apesar disso, existem evidências do benefício do uso da associação de AMX e MET combinada à terapia básica sobre os parâmetros clínicos e microbiológicos da PA, bem como do uso da CHX no controle da higiene oral de pacientes com doença periodontal avançada. Desse modo, é de extrema relevância que estudos clínicos randomizados avaliando os efeitos clínicos e microbiológicos de novos protocolos terapêuticos sejam realizados na população brasileira com o intuito de se desenvolver estratégias terapêuticas eficazes e mais específicas para nossa população.

2. PROPOSIÇÃO

2.1. Objetivo Geral:

A proposta do presente estudo foi avaliar o efeito coadjuvante da administração sistêmica de AMX e MET, associada à terapia periodontal não-cirúrgica melhorada e metuculoso controle de higiene bucal suplementado com CHX sobre a composição da microbiota subgengival de indivíduos com PAG.

2.2. Objetivos Específicos:

- 1) Correlacionar os parâmetros clínicos e microbiológicos com os diferentes parâmetros demográficos e epidemiológicos dessa amostra de indivíduos com PAG;
- 2) Definir o perfil microbiológico de indivíduos com PAG que procuram atendimento na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO-UFRJ).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostra Populacional do Estudo

O presente trabalho descreve um estudo clínico de intervenção, randomizado, duplo cego e controlado com placebo. A amostra de conveniência consistiu de indivíduos que procuraram tratamento dentário na Faculdade de Odontologia (FO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), durante o período de Março 2008 a Julho 2009. Para participar do estudo, os indivíduos tiveram que ler, compreender e consentir com os termos do estudo (Anexo 1), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva (IESC) da UFRJ (Anexo 2). Foram incluídos no estudo indivíduos que tinham no mínimo 18 e no máximo 39 anos de idade, e a presença de pelo menos 4 dentes com pelo menos 1 sítio cada apresentando profundidade à sondagem (PS) ≥ 6 mm, e nível clínico de inserção (NCI) ≥ 5 mm. Três desses dentes deveriam ser diferentes de incisivos centrais e primeiros molares. Além disso, esses indivíduos apresentavam evidências radiográficas de perda óssea avançada (mais de 50% do suporte alveolar dos dentes afetados). Foram excluídos do estudo aqueles indivíduos que apresentaram os seguintes achados: menos de 16 dentes; necessidade de uso profilático de antibióticos para procedimentos terapêuticos; história de uso de antibióticos nos últimos 3 meses ou tratamento periodontal nos últimos 6 meses; uso prolongado de drogas antiinflamatórias nos últimos 3 meses; alergia à AMX, MET ou CHX; gravidez ou lactação; não consentimento em participar ou desacordo com os termos do protocolo de procedimentos do presente estudo.

3.2. Exame Clínico Periodontal

Os exames clínicos foram realizados nas instalações da Disciplina de Periodontia do Departamento de Clínica Odontológica da FO-UFRJ e incluíram anamnese médica e odontológica (Anexos 3 e 4). As medidas clínicas periodontais foram realizadas utilizando-se espelho plano número 5 e sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA). Todos os exames foram executados por um único examinador treinado e calibrado (D.H.). A calibração envolveu o exame de indivíduos (aproximadamente 10% do número total da amostra populacional) com condições clínicas semelhantes às dos indivíduos com PAG. Esses indivíduos não fizeram parte do estudo principal. Pares de exames (PS e NCI) foram

realizados em cada indivíduo com uma hora de intervalo entre eles. O coeficiente de correlação intraclassa (ICC) do examinador foi de $>0,90$ para os dois parâmetros clínicos. Os parâmetros clínicos periodontais avaliados incluíram a presença ou ausência de placa supragengival visível (IPV), sangramento gengival (ISG), sangramento à sondagem (SAS) e supuração (SUP), além das medidas de PS e o NCI (mm). Essas medições foram realizadas em 6 sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), de todos os dentes, com exceção dos terceiros molares (Anexo 4). Os exames clínicos foram realizados no início do estudo (pré-terapia), 3 e 6 meses após o tratamento.

3.3. Cálculo do Tamanho Amostral

Tendo como base um amplo banco de dados de mais de 400 indivíduos da nossa amostra populacional, avaliados nos últimos 8 anos, o cálculo do tamanho amostral para análise microbiológica foi realizado considerando-se uma diferença de 15% na redução média de bactérias do “complexo vermelho” (*P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*) entre os grupos, após tratamento, e um desvio padrão de 11%. Uma amostra de 14 indivíduos em cada grupo foi estimada com um erro alfa de 5% e uma potência de 80%.

3.4. Randomização e Alocação dos Pacientes

Os indivíduos selecionados foram alocados no grupo teste ou placebo de maneira aleatória, utilizando-se para tal uma tabela de números aleatórios. A alocação foi conduzida por um pesquisador senior (M.C.B.T.) que não estava diretamente envolvido nas etapas de exame e tratamento do estudo, e os códigos dos grupos somente revelados após as análises estatísticas concluídas. Os comprimidos de antibióticos e placebos foram acondicionados em recipientes apropriados idênticos e numerados de acordo com os grupos pela Farmácia de Faculdade de Farmácia da UFRJ. Estes foram distribuídos entre os indivíduos no momento adequado e de acordo com a tabela de alocação.

O fluxograma referente à participação dos indivíduos no estudo está ilustrada na *Figure 1* do artigo científico. Duzentos e cinquenta indivíduos foram avaliados segundo os critérios de inclusão e exclusão, durante o período de recrutamento, que durou de Março de 2008 até Julho de 2009. Destes indivíduos, quarenta e um possuíam o diagnóstico de PAG. Seis pacientes não retornaram para a primeira consulta de

tratamento na qual os pacientes foram alocados nos dois grupos terapêuticos. Dos 35 pacientes tratados, 2 indivíduos do grupo teste perderam a avaliação de 3 meses, mas retornaram para visita aos 6 meses. No grupo placebo, um paciente perdeu a visita de 3 meses e retornou em 6 meses e outro perdeu a visita de 6 meses. Para o presente estudo, análise *per-protocol* foi realizada com os 31 pacientes que tinham os dados microbiológicos completos.

3.5. Protocolo Terapêutico

O tratamento periodontal foi realizado por um só pesquisador especialista em Periodontia (V.M.V.). Antes do início da terapia ativa, os pacientes foram submetidos a 2 sessões semanais de instrução de higiene oral, uma sessão de profilaxia supragengival e remoção de fatores retentivos tais como cálculo supragengival, restaurações irregulares e restos radiculares, com instrumentação ultra-sônica, antes do início da terapia periodontal melhorada (Figura 1). Ao final destas 2 semanas, foi realizado um exame clínico parcial para avaliar a higiene bucal dos pacientes. A fim de seguir para a próxima fase da terapia, todos os pacientes deveriam apresentar IPV e ISG em menos de 20% dos sítios examinados. O tratamento foi dividido em duas fases. Fase I consistiu em 2 sessões, realizadas em até 24 horas e de aproximadamente 1 h de duração cada, de instrumentação ultra-sônica supra e subgengival de todos os sítios, sob anestesia local, complementada por irrigação sub-gengival com um gel comercial de CHX a 0,2 % (Perioxidin gel, Gross S.A., Rio de Janeiro, Brasil). Adicionalmente, todos os pacientes foram instruídos a fazer uso diário de solução de digluconato de CHX a 0,12% através de bochechos e gargarejos (2 vezes ao dia, durante 1 min cada) (Perioxidin rinse, Gross S.A.), bem como escovação da língua com gel de digluconato de CHX a 0,12%, 2X ao dia, começando também na primeira sessão da Fase I. O uso de digluconato de CHX foi prolongando por 2 semanas após a última sessão da Fase II (aproximadamente 45 dias). Ao final da última sessão da Fase I, os indivíduos foram alocados em dois grupos terapêuticos. O grupo teste fez uso sistêmico dos antibióticos AMX (500 mg) e MET (250 mg), 3 vezes ao dia, durante 10 dias. O grupo controle foi submetido ao mesmo protocolo terapêutico, sendo os antibióticos substituídos por dois comprimidos placebos, idênticos aos do grupo teste. As sessões seguintes (Fase II), também de aproximadamente 1 h de duração cada, consistiram de RAR com instrumentos manuais (curetas Gracey números 7/8, 11/12, 13/14, 15/16 e 17/18 Hu-Friedy), sob bloqueio anestésico regional. As RARs foram realizadas por quadrantes/sextantes, em 4 a 6

sessões por um período de até 6 semanas, com intervalo máximo de uma semana entre as sessões. Nesta fase, um investigador senior (E.J.F-F) avaliou a qualidade da RAR realizada.

Os pacientes foram intruídos a retornar os frascos vazios e a preencher um questionário com informações relevantes para avaliar aderência ao tratamento e possíveis efeitos adversos. Os mesmos foram recolhidos pelo pesquisador sênior responsável pela tabela de alocação. Nas visitas de acompanhamento, os pacientes receberam reforço de higiene oral, remoção de placa e cálculo supragengival. Além disso, sítios com PS >4 mm e SAS foram re-instrumentados sob anestesia local.

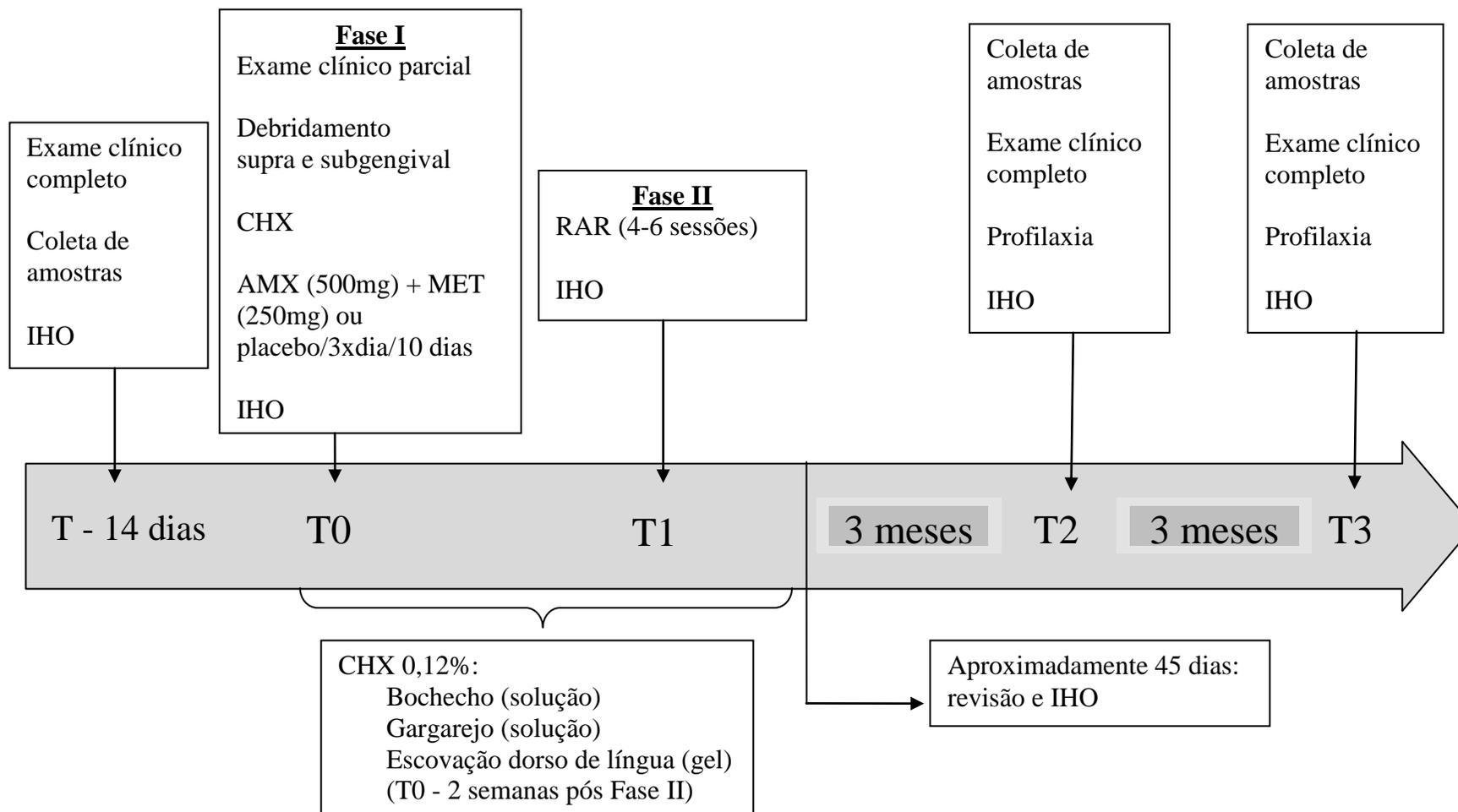


Figura 1. Desenho esquemático do protocolo terapêutico do estudo, contendo os exames clínicos e microbiológicos. AMX (amoxicilina), MET (metronidazol), CHX (clorexidina), RAR (raspagem e alisamento radicular), IHO (Instrução de Higiene Oral). T (início do estudo), T0 (fase I), T1 (fase II), T2 (3 meses pós-terapia) e T3 (6 meses pós-terapia).

3.6. Análises microbiológicas

Amostras de biofilme subgengival foram coletadas pelo mesmo examinador, previamente às medições clínicas, no início do estudo, 3 (T2) e 6 (T3) meses após a terapia (Figura 1). O biofilme subgengival foi obtido individualmente de 14 sítios periodontais, sendo estes: 4 sítios em 4 dentes distintos, localizados preferencialmente em quadrantes diferentes, e que apresentassem as bolsas periodontais mais profundas com SAS (sítios profundos), 4 sítios com PS entre 4-6 mm e SAS (sítios moderados), e 4 sítios com PS \leq 3 mm (sítios rasos) sem SAS. Depósitos de biofilme supragengival foram removidos previamente com gaze estéril. As amostras de biofilme subgengival foram retiradas com curetas Gracey estéreis individuais para cada sítio e colocadas em tubos tipo Eppendorf contendo 150 μ l de tampão TE (10 mM de Tris HCl, 1 mM de EDTA, pH 7,6) para análise pelo método do checkerboard.

3.6.1. Determinação da microbiota subgengival pela técnica do “Checkerboard DNA-DNA hybridization”

O método para identificação dos microrganismos subgengivais foi realizado através da técnica descrita por Socransky et al. (1994), com modificações por Colombo et al. (2002, 2005). A cada tubo de Eppendorf contendo biofilme subgengival foram adicionados 0,15 ml de 0,5 M NaOH. As suspensões foram fervidas em banho-maria por 5 min, e em seguida neutralizadas pela adição de 0,8 ml de 5 M de acetato de amônia. Com isso, as células bacterianas são lisadas e o DNA liberado na solução. Cada suspensão contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “Minislot” (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e o DNA concentrado numa membrana de nylon (15 X 15 cm) carregada positivamente (Hybond-N+, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). A membrana foi removida do aparato e o DNA depositado na membrana fixado através da exposição à temperatura de 120°C por 20 min em forno (Fanem Ltda., São Paulo, SP). As quatro últimas canaletas do “Minislot” são reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas. Foram confeccionados controles para as espécies orais e para as espécies “não-periodontais”.

3.6.2. Hibridização das membranas com as sondas de DNA

Após fixação do DNA nas membranas, estas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1 h numa solução de 50% formamida, 1% caseína, 5 x SSC, 25 mM de fosfato de sódio

(pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “Miniblotter 45” (Immunetics) com as linhas contendo o DNA fixado perpendicularmente às canaletas do “Miniblotter 45”. O “Miniblotter 45” contém 45 canaletas que servem cada uma para a colocação de uma sonda de DNA. Em cada canaleta foram colocados 135 µl de cada sonda específica diluída em solução de hibridização (45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 ng/ml de cada sonda de DNA específica). As sondas foram hibridizadas perpendicularmente às linhas das amostras de biofilme no aparato “MiniBlotter 45”. O aparato foi, então, incubado a 42°C por no mínimo 16 h para hibridização. Um total de 69 sondas genômicas para 40 espécies bacterianas orais e 39 espécies “não-periodontais” (*Tables 1S e 2S* do artigo científico) foram confeccionadas através do “Random Primer Digoxigenin Labeling Kit” (Roche Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Para a espécie *A. actinomycetemcomitans*, os sorotipos “a”, “b” e “c” foram compilados em uma sonda. O mesmo ocorreu para a espécie *Propionibacterium acnes*, sorotipos I e II. As espécies *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, e *Klebsiella pneumonia* foram combinadas em uma sonda para entéricos, enquanto os DNAs de *Neisseria subflava*, *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria lactamica* foram combinados em uma sonda *Neisseria* spp.

3.6.3. Detecção das espécies bacterianas

Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do “Miniblotter” e lavadas durante 40 min, a 68°C, numa solução adstringente (0,1 X SSC, 0,1% SDS), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas em solução bloqueadora (0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0) por 1 h e por 30 min na mesma solução contendo o anticorpo Anti-Digoxigenin-AP (Roche Brasil, São Paulo, SP, Brasil), numa diluição de 1/25.000 (Engler- Blum et al. 1993). As membranas foram, então, lavadas em solução tampão (0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0) 2 vezes por 15 min, e uma vez por 5 min em uma solução contendo 0,2 M Dietanolamina (pH 9,5) e 2 mM MgCl₂. Em seguida, a solução detectora contendo um substrato fluorescente (ECF, GE Healthcare Life Sciences) foi adicionada às membranas. Finalmente, as membranas foram escaneadas e as imagens captadas pelo

Sistema de Imagens Storm TM 860 (Molecular Dynamics/ Amersham Bioscience, Buckinghamshire, Inglaterra). Membranas foram primeiro hibridizadas com as sondas para espécies “não-periodontais”. Após detecção e captura da imagem (ImageQuant versão 5.2, Molecular Dynamics), as sondas foram removidas através da lavagem das membranas com uma solução de *stripping* 2X por 15 min cada a 65°C (0,2 M NaOH, 3,5 mM SDS) e por 5 min em 2X SSC (pH 7.0). Membranas foram então hibridizadas com as sondas para espécies orais como descrito previamente.

Os sinais emitidos foram avaliados visualmente por comparação com os controles de 10^5 e 10^6 células bacterianas para as espécies testes na mesma membrana. Foram registradas como: 0 não detectado; 1 = $<10^5$ células; 2 = $\sim 10^5$ células; 3 = 10^5 - 10^6 células; 4 = $\sim 10^6$ células; e 5 = $>10^6$ células. A sensibilidade desse teste foi ajustada para permitir a detecção de 10^4 células de uma determinada espécie, através do ajuste de cada sonda de DNA. Este procedimento foi realizado com objetivo de obter a mesma sensibilidade de detecção para cada espécie. Ausência de detecção foi computado como zero, no entanto níveis entre 1-1.000 poderiam estar presentes.

3.7. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”) versão 17.0 (SPSS Brasil, São Paulo, SP, Brasil). A frequência de sítios com SAS, SG, SUP e IPV, bem como a média da PS e NCI foram calculadas para cada paciente, e posteriormente em cada um dos grupos estudados, tanto para todos os sítios examinados como para os sítios selecionados para análise microbiológica, nos diferentes tempos. Para as medidas que incluíram todos os sítios examinados, os parâmetros de PS e NCI também foram categorizados em: 0-3 mm (sítios rasos), 4-6 mm (sítios médios) e >6 mm (sítios profundos) e a frequência calculada por paciente e nos grupos. Os dados microbiológicos foram expressos através da média da percentagem de sítios colonizada (prevalência) e média dos níveis de colonização ($\times 10^5$ células bacterianas), calculados para cada espécie em cada paciente, e posteriormente em cada grupo. Na análise de prevalência, foi considerada somente ausência ou presença do microrganismo. A frequência (prevalência) de cada espécie nos 14 sítios foi computada para cada paciente, e então feita uma média para cada grupo. Os níveis de colonização das diferentes espécies foram determinados através da transformação dos registros de 0 – 5 em número de células bacterianas. A média dos

níveis foi analisada para cada paciente e após para cada grupo.

Dados demográficos, média de idade, frequência de sexo e frequência de não fumantes e fumantes foram computados para cada grupo. Diferenças significativas nas características demográficas, clínicas e microbiológicas entre os grupos experimentais no início do estudo foram avaliadas através dos testes de Mann-Whitney e Qui-quadrado. Diferenças clínicas e microbiológicas significativas entre os grupos ao longo do tempo foram testadas através do Modelo Linear Geral para Medições Repetidas (*General Linear Model for Repeated Measures* - GLM). A percentagem de sítios que tiveram aumento ou diminuição de PS, assim como ganho ou perda de inserção aos 6 meses após tratamento foi computada para cada grupo e diferenças significativas foram testadas através do teste Mann-Whitney. A média de frequência e níveis de cada espécie na linha base e aos 6 meses nesses sítios foi analisada para cada grupo e diferenças avaliadas pelo teste de Mann-Whitney.

Associações entre parâmetros clínicos e microbiológicos foram testadas através de correlação bivariada e coeficiente de Spearman. Correlações entre dados microbiológicos e sexo, fumo e idade foram analisadas pelos testes Mann-Whitney e Qui-quadrado. O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5%.

4. RESULTADOS

ARTIGO CIENTÍFICO

Impact of an enhanced systemic antimicrobial therapy on the subgingival microbiota of aggressive periodontitis: a 6-month RCT.

Débora Heller*, Vitor Varella*, Mayra Xavier e Silva-Senem*, Cynesia M.B. Torres*, Eduardo Jorge Feres-Filho*, Ana Paula Vieira Colombo**

*Department of Dental Clinic, Periodontics, Dental School, Federal University of Rio de Janeiro; **Department of Medical Microbiology, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Running Title: Enhanced antimicrobial therapy in aggressive periodontitis

Key words: RCT, aggressive periodontitis, periodontal therapy, antimicrobials, subgingival microbiota, checkerboard, DNA probes.

Corresponding author: Ana Paula V. Colombo, R. Gal. Dionísio, 60/604, Humaitá, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 22271050, Phone/ Fax: 55 21 25376815, apcolombo@micro.ufrj.br

Conflict of interest and source of funding: The authors declare that they have no conflict of interests. This work was supported in part by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brasilia, Brazil; and Foundation for Research Financial Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Rio de Janeiro, Brazil.

Clinical relevance

Scientific rationale for the study: Studies have reported the clinical benefits of the full-mouth disinfection, as well as systemic amoxicillin (AMX) plus metronidazole (MET)

combined to scaling and root planing in the treatment of generalized aggressive periodontitis (GAP). However, little is known about their effects on the subgingival microbiota over time. Conceivably, a combination of both protocols in an enhanced mechanical antimicrobial therapy should provide better and long-lasting clinical and microbiological outcomes.

Principal findings: The enhanced periodontal therapy with or without systemic AMX+MET resulted in significant full-mouth clinical improvement at 6-month follow up. Systemic antibiotics had a more pronounced effect on the reduction of sites with moderate PD at baseline. Both therapies were able to decrease the prevalence and levels of most periodontal pathogens, but species not usually considered as periodontal microorganisms tended to increase. Species such as *D. pneumosintes*, *P. anaerobius* and *C. rectus* were related to sites that lost attachment after both therapies.

Practical implications: Although GAP patients may benefit clinically from an enhanced therapy associate to systemic AMX+MET, no additional effects of these antibiotics on the suppression of the pathogenic periodontal microbiota were observed over time. The high microbial diversity and that fact that species not usually associated with periodontal diseases may play a role in treatment failure indicate the need for determining the microbial profiles of GAP previously to treatment.

Abstract

Aim: To evaluate the effects of an enhanced antimicrobial and mechanical therapy associated with systemic amoxicillin (AMX) plus metronidazole (MET) on the subgingival microbiota of generalized aggressive periodontitis (GAP).

Material and Methods: The study was a 6-month randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. Thirty-one subjects received full-mouth ultra-sonic debridement followed by scaling and root planning with chlorhexidine rinsing, brushing and irrigation. During mechanical therapy, subjects received systemic AMX (500mg) + MET (250mg) or placebo, 3X per day for 10 days. Fourteen subgingival samples were obtained from each patient and analyzed for their composition by checkerboard at baseline, 3 and 6 months post-therapy.

Results: Significant clinical improvement was obtained in both groups over time ($p < 0.05$). A higher % of sites with PD and CAL reduction, and no residual pockets were observed in the antibiotic group ($p < 0.05$). High prevalence and levels of periodontal pathogens, as well as “unusual” periodontal species were observed. Most of the periodontal pathogens decreased significantly over time ($p < 0.05$), whereas “unusual” periodontal bacteria tended to increase in both groups. Sites that showed attachment loss and PD increase harbored higher baseline levels of *D. pneumosintes*, *C. rectus* and *P. anaerobius* than sites that improved after both therapies ($p < 0.05$).

Conclusions: Systemic AMX+MET associated to an enhanced mechanical therapy provided additional clinical benefit in reducing PD, CAL and residual periodontal pockets in GAP. Both treatments were effective in suppressing periodontal pathogens; however, species not commonly associated with GAP were less affected by these therapies.

Introduction

The major goals of periodontal therapy are to suppress bacterial infection, modulate the host response and heal/regenerate periodontal tissues in order to provide a healthy periodontium favorable to the re-establishment of a long-lasting host-compatible periodontal microbiota (Haffajee et al. 2006, Teles et al. 2006). Mechanical periodontal therapy is the most common and probably the most effective treatment for achieving periodontal health for the vast majority of periodontal diseases (Badersten 1984; Cobb 1996, Serino et al. 2001). However, the adjunctive use of systemic and/or local antimicrobials has been indicated for the treatment of more aggressive forms of the disease (Herrera et al. 2002, Haffajee et al. 2003, 2006). In particular, the combined administration of amoxicillin (AMX) and metronidazole (MET) seems to provide a significant clinical benefit in terms of periodontal attachment “gain” post-therapy (Guerrero et al. 2005, Xajigeorgiou et al. 2006, Kaner et al. 2007, Moreira & Feres-Filho 2007, Machtei & Younis 2008, Buchmann et al. 2010, Mestnik et al. 2010, Yek et al. 2010). These agents have also been shown to present a synergic effect on the reduction of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, a major pathogen associated with aggressive periodontitis (Pavicic et al. 1994a,b). Although the additional use of antimicrobials may be justifiable for treating aggressive periodontitis, there are several issues that should be addressed regarding the indication of antibiotics as “the” therapeutic protocol for these diseases. First of all, the success of any periodontal therapy relies on the establishment of an optimal plaque control (Axelsson et al. 1991, Westfelt et al. 1998, Ximenez-Fyvie et al. 2000, Checchi et al. 2002, Rhemrev et al. 2006). This may be achieved by the continued education on self-performed mechanical oral hygiene practices, as well as the use of chemical agents such as chlorhexidine(CHX) (Mandel 1988, Feres et al. 2009, Escribano et al. 2010). Second, when one thinks of systemic administration of antibiotics, one should take into account the pharmacological characteristics of the drug, the host general health, the target microorganisms, the adverse effects and the costs (Roberts 2002, Slots & Jorgensen 2002, Seymour & Hogg 2008). Most of the antibiotic regimens employed in the treatment of periodontal diseases are based on guidelines for antibiotic usage in medical practice. Thus, are the dosages of antibiotics commonly employed for treating periodontitis adequate? Considering that periodontal infections are site-specific, biofilm-related infections, would the bactericidal concentration of antibiotics reach all diseased sites equally? Moreover, would the ideal concentration reach the

microorganisms within the biofilm? To make it more complicated, periodontal infections are polymicrobial (Haffajee & Socransky 1994, Socransky & Haffajee 2002, 2005) and multifactorial in nature (Page et al. 1997). The subgingival microbiota and the host response to infection may vary widely among subjects presenting the same periodontal diagnosis (Haffajee et al. 2004). Consequently, knowledge of the microbial profiles that predominate in different types of periodontal diseases should lead to better therapeutic choices. The truth, however, is that data from studies of the effects of periodontal therapy on the subgingival microbiota are confusing. Differences in study design, periodontal diagnosis, and subject populations may account for those conflicting results (Teles et al. 2006). Regarding generalized aggressive periodontitis (GAP), few studies have evaluated the microbiological changes that occur over time, particularly with the systemic use of AMX plus MET. These investigations have usually targeted few bacterial species, and have focused on short-term therapeutic evaluations (van Winkelhoff et al. 1992, Pavicic et al. 1994a, Flemming et al. 1998; Guerrero et al. 2005, Xajigeorgiou et al. 2006, Buchmann et al. 2010, Mestnik et al. 2010, Yek et al. 2010). A successful periodontal therapy results in significant and long-lasting improvement on clinical parameters. However, what is a successful therapy in microbiological terms? There is a consensus that the microbial benefit of a periodontal therapy is related to the suppression and/or “elimination” of periodontal pathogens (van Winkelhoff et al. 1992, Pavicic et al. 1994a, Muller et al. 1998, Winkel et al. 1998). Although this is a reasonable therapeutic aim, it is important to understand that the subgingival microbiota is highly diverse, comprising even unknown or uncultivable species that may or may not play a role in disease (Paster et al. 2001, Colombo et al. 2009). Antibiotics may have distinct effects on different segments of this microbiota (Haffajee et al. 1996). Furthermore, “elimination” should be read “undetectable”, since no complete eradication of oral species from the mouth does in fact occur (or it is necessary) after periodontal therapy, even after full-mouth tooth extraction (van Assche et al. 2009). Consequently, a successful antimicrobial therapy should lead to a shift in proportions or levels from a pathogenic to a host-compatible periodontal microbiota. In addition, these microbial changes should be sustained for prolonged periods of time (Rhemrev et al. 2006, Teles et al. 2006). In an attempt to address some of those issues, our group initiated in 2007 a randomized controlled trial to evaluate the impact of an enhanced anti-infective non-surgical therapy associated with systemic AMX plus MET on clinical and microbiological parameters of subjects with GAP. The enhanced treatment

combined full-mouth disinfection principles and weekly scaling and root planning (SRP) with or without systemic antibiotics. In addition, we analyzed the effects of treatment on a large range of bacterial taxa, including species not commonly associated with periodontitis. The present paper focused primarily on the 6-month follow-up microbiological data.

Material and Methods

This study was a randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, 6-month clinical trial. The study population, experimental design and treatment protocol are described in detail in an accompanying paper (manuscript attached) presenting the clinical data. Research was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki on experimentation involving human subjects. The study protocol was approved by the Ethics in Human Research Committee of the Institute of Public Health at the Federal University of Rio de Janeiro (approval #96/2007; process #45/2007). To be enrolled, all patients were individually informed about the nature of the proposed treatment, its risks and benefits, and signed informed consent forms. Additionally, every patient was granted the right to drop out the study, at any time, without jeopardizing the continuity of his/her periodontal treatment.

Subject population

Based on a large microbiological database of over 400 individuals in our population evaluated over 8 years, sample size calculation for microbial data was performed considering a difference of 15% in the reduction of the mean prevalence of the “red complex” (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*) between groups after treatment, and a standard deviation of 11%. A number of 14 individuals was estimated for each group with an alpha error of 5% and a power of 80%.

Generalized aggressive periodontitis (GAP) subjects aged 18-39 years were selected from March 2008 to July 2009 from a pool of patients referred to the Division of Graduate Periodontics of the School of Dentistry at the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil. Each patient had at least 16 teeth and 4 sites on different teeth (3 of them other than central incisors or first molars) with a probing depth (PD) ≥ 6 mm and clinical attachment level (CAL) ≥ 5 mm, and bleeding on probing (BOP). Radiographic evidence of severe bone loss ($\geq \frac{1}{2}$ the root length) was seen on the most

diseased teeth. Exclusion criteria included: reported allergy to penicillin, MET or CHX; systemic conditions that could modify the progression or treatment of periodontal diseases, including diabetes and immunodeficiencies; need of antibiotic coverage for periodontal procedures; long term use of anti-inflammatory medication; periodontal treatment and/or use of antibiotics in the last 6 months; pregnancy, and nursing.

Experimental Design

Clinical exams were performed at baseline, 3 and 6 months after treatment by only one trained and calibrated examiner (D.H.). Intra-examiner calibration was carried out in 4 patients not included in the main study but presenting similar periodontal conditions of the study population. Pairs of examinations (PD and CAL) were conducted in each individual with one hour interval between them. Intra-class correlation coefficients of >0.90 were obtained for both clinical parameters. Measurements were taken at 6 sites per tooth (mesio-buccal, buccal, disto-buccal, mesio-lingual, lingual and disto-lingual) in all teeth, except third molars, and included: PD and CAL, measured to the nearest millimeter with a periodontal probe (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), and presence or absence of BOP, supragingival visible plaque (PL), gingival marginal bleeding (GI), and suppuration (SUP).

Medication and placebo were prepared and encased in identical opaque coded bottles by the School of Pharmacy of the Centre of Health Sciences/UFRJ. Patients were randomized into 2 experimental groups according to a computer generated list. Allocation was implemented by a senior investigator (M.C.B.T.), not directly involved with the examination or treatment process, who also kept the identification code concealed from all other individuals until the statistical analyses were carried out.

Periodontal treatment was performed by a single experienced periodontist (V.M.V.). Before active treatment, all patients received oral hygiene instruction for 2 weeks in order to lower their plaque accumulation to less than 20% of dental surfaces. Treatment was divided in two phases. Phase I consisted of 2 one-hour sessions of full-mouth ultra-sonic debridement under local anesthesia complemented by irrigation of all pockets with a commercial gel containing 0.2% CHX (Perioxidin gel, Gross S.A., Rio de Janeiro, Brazil), within a 24h period. Additionally, patients were instructed to rinse and gargle 2X a day with a 0.12% CHX solution (Perioxidin rinse, Gross S.A.), and brush their tongs 2X a day with the same irrigation gel for the next 45 days. Phase II involved staged quadrant one-hour sessions of SRP with Gracey curettes (Hu-Friedy,

Chicago, IL, USA) completed within 4-6 weeks. Throughout this phase, a senior investigator (E.J.F-F) checked the smoothness of instrumented roots. After the last session of Phase I, patients were assigned to one of the following therapeutic groups: Test group (systemic administration of AMX 500mg plus MET 250mg) or Control group (2 different placebo tablets, each identical to the medication tablets). Antimicrobials or placebos were prescribed to be taken 3X a day for 10 days. Patients were instructed to return the empty bottles and their accompanying form filled with information for evaluating patients' adherence to the local and systemic antimicrobial scheme, and side effects. At the follow-up visits, patients received reinforcement in oral hygiene, full-mouth supragingival plaque and calculus removal. Furthermore, sites with PD>4 mm and BOP were re-instrumented under local anesthesia.

Microbiological Assessment

Microbial analyses were performed at baseline, 3 and 6 months post-therapy by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique (Socransky et al. 1994), with modifications. Individual subgingival plaque samples were taken from 14 non-adjacent sites per subject. Sites with different PD categories were sampled, including 4 sites with PD \leq 3 mm, 5 sites with PD= 4-6 mm and 5 sites with PD \geq 7 mm. The supragingival plaque was removed and subgingival samples were taken with individual sterile Gracey curettes (Hu-Friedy). The samples were placed in individual Eppendorf tubes containing 150 μ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6). Samples were lysed by adding 150 μ l of 0.5 M NaOH and boiling for 10 min. Denatured DNA was neutralized with 800 μ l of 5 M C₂H₃O₂NH₄ and fixed in individual lanes on a nylon membrane (Hybond-N+, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) using the Minislot 30 (Immunelect, Cambridge, MA). The Miniblotter 45 apparatus (Immunelect) was used to hybridize 42 oral (supplementary Table S1) and 27 "non-periodontal" (supplementary Table S2) whole genomic DNA probes for 79 species of microorganisms. The probes were labeled with digoxigenin using the "Random Primer Digoxigenin Labeling Kit" (Roche Molecular Systems, Alameda, CA, USA). DNA from serotypes a, b and c of *A. actinomycetemcomitans* was pooled in one probe, as well as *Propionibacterium acnes* serotypes I and II. For the "non-periodontal" species, DNA from *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae* was combined in an enteric probe, whereas DNA from *Neisseria subflava*,

Neisseria polysaccharea, *Neisseria meningitides*, and *Neisseria lactamica* was pooled in a *Neisseria* spp. probe.

Bound probes were detected using anti-digoxigenin phosphatase-conjugated antibody (Roche Molecular Systems) and fluorescence (ECF, GE Healthcare Life Sciences) by an imaging capture system (Storm TM 860, Molecular Dynamics, GE Healthcare Life Sciences). Membranes were first hybridized against the “non-oral” probes. After image detection and capture (ImageQuant version 5.2, Molecular Dynamics), probes were removed by washing the membranes 2X for 15 min at 65°C with a stripping solution (0.2 M NaOH, 3.5 mM SDS) and for 5 min with 2X SSC (0.3 M sodium chloride, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0). Membranes were then hybridized with the oral probes as previously described. Signals were evaluated visually by comparison with the standards at 10^5 and 10^6 cells for the test species on the same membrane. They were recorded as: 0= not detected; 1= $<10^5$ cells; 2= $\sim 10^5$; 3= 10^5 - 10^6 cells; 4= $\sim 10^6$; 5= $>10^6$ cells. The sensitivity of this assay was adjusted to permit detection of 10^4 cells of a given species by adjusting the concentration of each DNA probe. This procedure was carried out in order to provide the same sensitivity of detection for each species. Failure to detect a signal was recorded as zero, although conceivably, counts in the 1 to 1,000 range could have been present.

Statistical analysis

A statistical program (SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, version 17.0, Chicago, IL, USA) was used for all analyses. Full-mouth clinical data was averaged in each patient and within groups at each visit. In order to examine the extent of disease, PD and CAL were transformed into categories (shallow ≤ 3 mm, moderate 4-6 mm and deep ≥ 7 mm) and their frequencies computed for each patient and averaged within groups. Clinical parameters for the 14 sampled sites were also computed in each patient and averaged within groups. Microbial data was presented as mean prevalence (presence or absence) and mean levels ($\times 10^5$ bacterial cells) of the tested species. The frequency (prevalence) of each species in the 14 sites was computed for each subject and then averaged within groups. The levels of each species were calculated by transforming the scores 0 to 5 in counts. Mean counts were computed for each patient and within groups. Regarding demographic data, mean age, frequency of gender and frequency of never-smokers or smokers were computed for each group. Significant differences in demographic, clinical and microbiological parameters between

therapeutic groups at baseline were determined by Mann-Whitney and χ^2 tests. Differences in clinical and microbiological changes between groups over time were evaluated by General Linear Model for Repeated Measures (GLM). The primary clinical and microbiological outcome variables of the study were changes in mean PD and mean counts of the red complex species, respectively. Secondary outcome variables included differences between therapies for mean changes in CAL, % sites with PD and CAL reduction, for mean changes in prevalence of oral and “unusual” species, and for mean changes in prevalence and levels in sites that lost or gained attachment. The percent of sites that showed increase or decrease in PD, as well as gain or loss of attachment at 6 months after treatment was computed for each patient and within groups, and significant differences were tested by the Mann-Whitney test. The mean frequency and levels of each species at baseline and 6 months in those sites were computed for the groups and differences tested by Mann-Whitney test. Correlation analysis and spearman coefficient were used to seek for associations between microbiological and clinical parameters. Relationships between microbial data and gender, smoking or age were examined by Mann-Whitney and χ^2 tests. The level of significance for all analysis was 5%.

Results

Clinical features

The flow chart of the experimental design is presented in Figure 1. Forty-one individuals were eligible for the study and were examined for full-mouth periodontal clinical parameters and microbiological sampling. Six patients did not return for the first treatment visit, when patients were randomly allocated into the two groups. Of the 35 patients treated, 2 subjects in the test group missed the 3-month evaluation but returned for the 6 month visit. In the placebo group, one patient missed the 3-month visit and returned at 6 months, whereas the other patient missed the 6 month recall. For the clinical data study (manuscript attached), intention-to-treat analyses using the Next Observation Carried Backward (for 3-month missing data) or the Last Observation Carried Forward (for 6-month missing data) strategies were carried out for missing data from patients not attending all follow-up sessions. In the current investigation, per-protocol analysis was performed for microbiological data. The 31 subjects who finished the study reported full adherence to the prescribed course of the antibiotic/placebo and the CHX rinses. Adverse effects reported by individuals in both therapeutic groups

included headache (16%), metallic taste (13%), taste alterations (48%), nausea (16%), diarrhea (10%), dizziness (10%), mouth burning (32%) and teeth staining (32%). No differences between groups were observed for these side effects.

The mean age of subjects in the control (n=15) and test (n=16) groups were 32.4 ± 1.0 and 33.5 ± 1.1 years, respectively. Only 2 current smokers were present in each group. A higher proportion of males was found in the test (43%) than in the control (13.3%) group; however, no significant differences were observed between groups for these demographic parameters. The baseline full-mouth clinical data of both groups pre- and post-therapy are presented in table 1. All clinical parameters, except for SUP improved significantly after treatment in both groups ($p < 0.01$). A large reduction in the extent of disease; i.e. % of sites with PD or CAL ≥ 7 mm was observed. Major changes were seen from baseline to the 3-month visit. Nonetheless, no differences between groups were found. Since microbiological assessment was performed in only 14 periodontal sites per patient, the clinical parameters of these sites were evaluated (table 2). Significant reductions in mean PD, CAL, PL and BOP were observed in both groups over time ($p < 0.01$). Similarly to the full-mouth data, no significant differences between groups were detected for these clinical outcomes. Although the clinical analysis showed a significant reduction in mean PD and CAL in both groups, data presented as “means” may underestimate the impact of therapy on clinical and microbiological parameters. This is due mainly to the fact that many periodontally healthy sites are included in the analysis. Thus, differences in gain or loss of attachment were computed, and the mean prevalence of sites that improved or worsened after therapy was compared between groups (Figures 2A and 2B). Because some sites with very deep PD at baseline showed large reductions in PD but remained with moderate to deep pockets, we considered a site successfully treated when reduction in PD resulted in no residual PD ≥ 4 mm. Likewise, shallow sites at baseline showed attachment loss or PD increase after therapy, however they presented no pockets. Only sites that lost attachment or did not improve; i.e. presented PD ≥ 4 mm after treatment were considered as sites that did not respond to therapy. As depicted in figure 2, a significantly higher prevalence of sites that improved regarding PD reduction (A) and CAL gain (B) at 6 months was detected in the test compared to the placebo group ($p < 0.05$). No differences between groups were observed for increase in PD or loss of attachment after treatment. Similar results were observed at 3 months (data not shown).

It should be noted that these sites correspond to the 14 sampled sites for microbiological analysis.

Microbiological features

For microbiological analysis, sites with shallow, moderate and deep PD were selected from each GAP individual. Although no differences in the clinical characteristics of these sites were found between groups at baseline (table 2), a great heterogeneity in the subgingival microbiota was observed. Figure 3 (A-D) shows the baseline inter-variability in the prevalence of (A) *A. actinomycetemcomitans*, (B) *P. gingivalis*, (C) *T. forsythia* and (D) *T. denticola* in the 14 sampled sites from subjects of the 2 groups. The same variability was observed for mean levels of these species (data not shown). One can note, for instance, that some GAP patients presented detectable *A. actinomycetemcomitans* in almost all sites sampled, whereas other patients had lower prevalence of this pathogen. Despite this variability, the microbial profiles of both groups regarding were very similar at baseline (Figures 4-7). These GAP patients harbored quite high frequency and counts of classical periodontal pathogens such as *A. actinomycetemcomitans* and species of the red and orange complexes (Figures 4 and 6). Likewise, species not considered members of the periodontal microbiota were frequently detected (Figures 5 and 7). On average, *P. tanneriae*, *C. albicans*, *Neisseria* spp., enterics, *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa* and *D. pneumosintes* were present in >40% of the samples in both groups (Figure 5). High mean levels ($> 3 \times 10^5$ cells) were found for *P. tanneriae*, *C. albicans*, *Neisseria* spp., *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *A. parvulum*, *C. difficile* and *E. saphenum* (Figure 7). The species that differed significantly in frequency and/or counts between groups at baseline were *C. ochracea*, *P. nigrescens*, *E. faecalis*, *N. gonorrhoeae*, *F. alocis*, enterics ($p < 0.05$), *S. gordonii* and *N. mucosa* ($p < 0.01$, Mann-Whitney test).

Significant correlations between bacterial species and clinical or demographic data were observed at baseline. For instance, high prevalence and levels of *S. aureus* were associated with an increased frequency in SUP ($\rho = 0.625$) and GI ($\rho = 0.472$), whereas presence of BOP was related to a high frequency of *F. nuc nucleatum* ($\rho = 0.745$), *P. micra* ($\rho = 0.460$), *P. gingivalis* ($\rho = 0.497$), and *P. tanneriae* ($\rho = 0.478$, $p < 0.05$). CAL was associated with increasing levels of *S. anginosus* ($\rho = 0.549$) and *C. ochracea* ($\rho = 0.464$), while a strong correlation between SUP and high levels of *A. gerencseriae* ($\rho = 0.541$) was observed ($p < 0.05$). Negative

relationships were found between CAL and mean % of *A. israeli* ($\rho=-0.521$), BOP and mean % of *C. albicans* ($\rho=-0.492$), and PL and mean levels of *S. constellatus* ($\rho=-0.451$). Regarding gender, males harbored significantly greater levels of *V. parvula* ($1.6\pm 0.8 \times 10^5$) and prevalence of *O. uli* (40 ± 26) than females ($0.4\pm 0.5 \times 10^5$ and 18 ± 15 , respectively; $p<0.05$, Mann-Whitney test). Smokers presented significantly higher frequencies of *P. nigrescens* (80 ± 15), *S. noxia* (71 ± 21), *T. socranskii* (88 ± 9), and *E. saphenum* (75 ± 12), and higher levels of *E. nodatum* ($2.2\pm 1.5 \times 10^6$) compared to non-smokers (48 ± 26 , 43 ± 22 , 55 ± 25 , $0.5\pm 0.8 \times 10^6$, respectively). In contrast, non-smokers had higher prevalence of *O. uli* (27 ± 21) and *C. concisus* (26 ± 23) than smokers (7 ± 6 and 4 ± 7 , respectively, Chi-square, $p<0.05$).

After treatment, most of the species that constitute the periodontal microbiota decreased in both groups (Fig. 4 and 6). In contrast, approximately half of the “unusual” periodontal species tested showed a tendency to increase after therapy, mainly in the control group (Fig. 5 and 7). Regarding the prevalence of periodontal pathogens, significant reductions over time were observed for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* and species of the orange complex such as *C. rectus*, *F. nucleatum*, *F. nucleatum vincentii*, *P. micra*, *P. nigrescens* and *P. intermedia* ($p<0.05$, GLM); however, no differences between groups were seen (Fig. 4). Other species that reduced significantly in both groups were *L. buccalis*, *P. melaninogenica*, *A. gerencseriae*, *A. odontolyticus*, *A. naeslundii*, *A. israeli*, *P. aeruginosa*, *E. saphenum*, *C. difficile* and *S. liquefaciens*, whereas *R. dentocariosa*, *S. gordonii*, and *D. pneumosintes* increased over time ($p<0.05$, GLM, Fig. 4 and 5). *C. albicans*, *B. fragilis*, *F. necrophorum*, and *Neisseria* spp. showed a significant increase in frequency at 3 months but tended to reduce at the 6 month visit in both groups. In contrast, *F. alocis* and *H. pylori* reduced significantly at 3 months, rebounding to baseline values at 6 months (Fig. 5). Significant differences between groups after treatment were observed for *S. oralis*, *S. constellatus* and *E. faecalis* which had a more pronounced reduction in the control group, and *N. mucosa* which decreased in the control but increased in the test group over time ($p<0.05$, GLM, Fig. 4 and 5). *N. gonorrhoeae* and enterics presented a significant reduction in the test group over time, whereas they increased at 3 months and returned to baseline levels at 6 months in the control group ($p<0.05$, GLM, Fig. 5). In terms of mean levels, putative periodontal pathogens also showed a decrease over time and significant changes were observed for *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* and *P. gingivalis* (Fig. 6). Species such as *C. rectus*, *P. micra*, *P. anaerobius* and *E. saphenum*

reduced significantly, while *A. naeslundii*, *D. pneumosintes* and *L. acidophilus* did increase in both groups at 6 months post-therapy (Fig. 6 and 7). A marked increase in mean counts at 3 months is observed for *C. sputigena*, *A. meyeri*, *P. aeruginosa* and *G. vaginalis*, but these species showed a tendency to come back to baseline levels or lower. No significant differences in mean level changes between groups were found, except for *N. mucosa* which reduced in the control group and increased in the test group at 6 months after treatment (Fig. 6).

In order to compare the microbial composition of sites that gained or lost attachment in both clinical groups after therapy, the frequency and levels of each species at baseline and at 6-month visit were computed. Overall, the frequency distribution of the majority of the species tested was similar in sites that gained or lost attachment regardless of the treatment. In the control group (placebo), sites that lost attachment 6 months after therapy harbored significantly higher prevalence of *D. pneumosintes* at baseline than sites that gained attachment (Fig. 8). In contrast, *E. corrodens* and *S. sanguinis* were significantly more frequent in sites that improved over time (Fig. 8; $p < 0.05$, Chi-square test). *C. rectus*, *T. socranskii*, *H. aphrophilus* and *N. mucosa* were significantly more prevalent at baseline in sites that lost attachment after treatment with systemic antibiotics (Fig. 8; $p < 0.05$, Chi-square test). When the microbiota of those sites was compared at the 6-month follow up, no significant differences were observed in the test group. However, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. tannerea*, *E. saphenum*, *H. influenza* and *H. alvei* were detected significantly more often in sites that did not respond well to the enhanced therapy without systemic antibiotics, whereas *C. albicans* was prevalent in sites that improved after treatment (Fig. 8; $p < 0.05$, Chi-square test). More pronounced differences were observed regarding the mean levels of bacteria in sites that did or did not respond to treatment (Fig. 9). High mean levels of *D. pneumosintes*, *P. anaerobius* and *C. rectus* at baseline were related to sites that lost attachment after both therapies. Moreover, sites with high mean counts of *P. nigrescens*, *P. melaninogenica* and *T. socranskii* did not seem to respond well to treatment with systemic AMX and MET (Fig. 9, $p < 0.05$, Mann-Whitney test). At 6 months, *D. pneumosintes* was still present in significantly elevated mean counts in sites that did not improve after treatment in both groups. In the test group, sites that lost attachment maintained the high levels of *P. nigrescens*, *P. melaninogenica* and *T. socranskii* (Fig. 9, $p < 0.05$, Mann-Whitney test). Other species that were detected in significantly high counts in sites that did not improve

after treatment included *F. necrophorum*, *T. denticola*, *P. tannerea* and *E. saphenum* (Fig. 9, $p < 0.05$, Mann-Whitney test).

Discussion

The treatment of aggressive forms of periodontitis has been a challenge for clinicians due to the lack of a well established treatment protocol. Difficulties in determining the aetiology and diagnosis of these diseases (van der Velden 2005), the great variability in their microbial composition and clinical manifestations (Gajardo et al. 2005, Ximenez-Fyvie et al. 2006, Faveri et al. 2008, 2009), as well as the inexistence of guidelines for the use of systemically administered antibiotics (Shaddox & Walker 2009) have lead to conflicting decisions on the selection of different therapeutic approaches. The present randomized controlled trial evaluated the 6-month impact of an enhanced anti-infective non-surgical therapy associated with systemic AMX plus MET on a large number of bacterial taxa colonizing the subgingival microbiota of subjects with GAP. The rationale for this protocol would be that a thorough mechanical instrumentation associated with an effective topical chemical control of the bacterial load with CHX would provide significant microbiological improvement without the need for the use of systemic antibiotics. This GAP population was characterized by severe periodontal destruction and inflammation (table 1), corroborating the data reported by Susin & Albandar (2005). Differently from other GAP profiles, these patients presented large amounts of plaque and supra/subgingival calculus (data not shown). In addition, our patients' age ranged from 21 to 39 years. Although many studies have limited the inclusion of GAP subjects to a maximum of 35 years of age, we found that the majority of our patients had limited access to dental services, seeking for periodontal treatment in older ages. Despite that, older patients in our population reported having "gum problems" for while. The full-mouth clinical data showed that both therapeutic groups improved significantly over time for most of the periodontal parameters evaluated (table 1). The same analyses were performed on the 14 sites selected for microbiological assessment in each subject (table 2). Because most of these sites presented moderate and deep pockets (see material and methods), the baseline mean PD and CAL were higher as compared to the full-mouth data. Nevertheless, significant improvements on periodontal parameters were observed for both groups after treatment. As expected, changes were more pronounced during the first 3 months post-

therapy (Badersten et al. 1984, Pavicic et al. 1994a, Haffajee et al. 2006, Kaner et al. 2007, Mestnik et al. 2010). Although no significant differences between groups were found for “mean” changes in clinical parameters, striking differences were seen when the percentage of sites that improved or worsened were compared (fig. 2A and 2B). A successful therapy should not only provide periodontal attachment “gain” but also diminish the number of possible residual pockets. On average, over 50% of the sites from patients who were administered antibiotics presented a significant PD reduction and attachment gain with no residual pockets (≥ 4 mm) after treatment compared to approximately 33% in the placebo group. Of interest, the mean PD reduction in those sites was about 3.0 ± 2.0 mm (data not shown), suggesting that antibiotics may have a greater impact in sites with initially moderate PD (5-6 mm). However, when this analysis was performed in sites with PD >6 mm at baseline, no statistical difference in the percent of sites that improved was found between groups (control= $45 \pm 18\%$ and test= $59 \pm 30\%$, $p=0.108$). Likewise, Xajigeorgiou et al. (2006) and Yek et al. (2010) found no significant differences in mean CAL “gain” and PD reduction between control and test groups (AMX+MET) at 6 months. However, individuals who received antibiotics presented a significantly greater reduction in the proportion of sites with PD >6 mm. Using a full-mouth disinfection approach, Guerrero et al. (2005) reported a significantly greater reduction in mean PD in the antibiotic than in the placebo group. Major differences were observed in sites with deep PD (≥ 7 mm) at baseline. In comparing our data with those studies, one should take into account that experimental designs are quite different. Despite the differences, the full-mouth PD reduction for controls ranged from 0.7-1.0 mm, and for the AMX+MET group ranged from 1.2-1.5 mm for most of those investigations.

Regarding the microbiological features of our GAP population, a great inter-individual variability of bacterial species, particularly periodontal pathogens was observed in these patients (Fig 3). These findings corroborate data from other studies that showed that periodontal sites may differ significantly in microbial composition between subjects and within subjects with same clinical characteristics (Kolenbrander et al. 2006, Teles et al. 2006). Differences in the subgingival microbiota among subjects with same periodontal diagnosis but from distinct populations are also evident (Haffajee et al. 2004). Even in a small number of diseased patients, it is clear that some subjects are readily colonized by putative pathogens, whereas others harbor these species in very few sites. If the major microbial goal of periodontal therapy is to suppress periodontal

pathogens, then one could ask what the therapy for those in whom these pathogens are already suppressed would be. For instance, when we examined the changes in prevalence and levels of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in individuals from both groups with low numbers of these pathogens at baseline, we observed a slight decrease at 3 months but a rebound to baseline values at 6 months (data not shown). It is possible that patients with high proportions of classical periodontal pathogens may benefit more from therapies with systemic AMX plus MET than subjects with low levels of these species (Haffajee et al. 1996). Thus, if different antimicrobial agents are better suited for treatment of distinct subgingival profiles, the need for microbial analysis of GAP patients previously to treatment should be emphasized (van Winkelhoff & Winkel 2005). Despite the high microbial variability among subjects, the baseline microbial profiles of both groups were quite similar. On average, these GAP subjects presented high mean prevalence and counts of periodontal pathogens. For decades, *A. actinomycetemcomitans* has been considered a major worldwide pathogen of aggressive periodontitis, especially the localized form (Asikainen et al. 1986, Albandar et al. 1997, Lopez et al. 1996, Tinoco et al. 1997, Fine et al. 2007, Haubek et al. 2008). However, several recent microbiological studies have also shown strong associations between species of the red and orange complexes with aggressive periodontitis (Lee et al. 2003, Takeuchi et al. 2003, Gajardo et al. 2005, Ximenez-Fyvie et al. 2006, Mayorga-Fayad et al. 2007, Botero et al. 2007, Favari et al. 2008, 2009, Mestnik et al. 2010). Another interesting finding in our study was the high frequency and levels of species not usually related to aggressive periodontitis. The vast majority of these microorganisms are medically important pathogens associated with a variety of diseases in humans, as well as nosocomial infections, biofilm infections and antimicrobial multi-resistance (Costerton et al. 1999, Johnston & Bryce 2009, Gootz 2010). Although the role of these pathogens in the etiology of periodontitis has not been determined, species such as *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *A. baumannii*, *H. pylori*, *Neisseria* spp., enterococci, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. and *Candida* spp. have been frequently isolated from periodontal lesions (Slots et al. 1990, Rams et al. 1992, Smith et al. 2001, Colombo et al. 2002, Souto et al. 2006, Botero et al. 2007, Fritschi et al. 2008, Souto & Colombo 2008a,b, Persson et al. 2008, Colombo et al. 2009). Some of these species have also been strongly correlated with parameters of periodontal destruction and inflammation (Colombo et al. 2002, Souto et al. 2006, Souto & Colombo 2008a,b). We found, for example, that *S. aureus* had a strong association with suppuration and gingival bleeding.

In a recent investigation, Fritschi et al. (2008) reported that counts of *S. aureus* discriminate efficiently between sites of aggressive and chronic periodontitis. Studies have shown that antagonistic and synergistic interactions do occur between members of the oral microbiota and “non-oral” species in the periodontal biofilm (Kolenbrander et al. 2006). For instance, Andersen et al. (1998) reported that species of *Fusobacterium* coaggregate with *H. pylori*, whereas Okuda et al. (2003) found that *Streptococcus* spp., *A. naeslundii*, *P. intermedia* and *P. nigrescens* produce bacteriocin-like inhibitory proteins against *H. pylori*. More recently, Watanabe et al. (2009) demonstrated that a protein denominated the “new-antipseudomonal substance” from *S. sanguinis* can be bactericidal against *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. Actually, 78% and 87% of the GAP patients presented inverse relationships in the baseline prevalence of *S. sanguinis* and *A. baumannii* or *S. sanguinis* and *P. aeruginosa*, respectively (data not shown). We also found that some of our patients with the lowest prevalence of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* presented a high frequency of *D. pneumosintes* and vice-versa (data not shown). These data reinforce once more the very dynamic and complex relationships that take place in the periodontal microenvironment. Consequently, a better knowledge of the various periodontal microbial profiles is relevant for differentiating periodontal diseases and determining a more suitable therapy.

In terms of mean changes in prevalence and counts of bacterial species, our data suggested that both therapies were equally efficient in reducing most of the periodontal pathogenic species over time, including *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* and several species of the orange complex (*C. rectus*, *P. micra*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *F. nuc. nucleatum*, and *F. nuc. vincentii*). Species associated with periodontal health, such as *S. gordonii*, *C. sputigena*, *A. naeslundii* II and *R. dentocariosa* increased significantly in mean frequency and/or levels 6 months after both treatment protocols. Although the % of sites colonized by *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* decreased after therapy, these species were still detected in $\geq 30\%$ of the sites at 6 months in both groups (Fig. 4). In contrast, striking reductions in mean levels of these pathogens were observed (Fig. 5). The prevalence of periodontal species has been previously shown to be less affected by antimicrobial periodontal therapies than levels and proportions of these organisms (Haffajee et al. 2006, Teles et al. 2006). This may reflect the elastic “memory” of our subgingival microbiota which is very adapted to the periodontal microenvironment, and

thus, rapidly re-colonizes the sites after treatment (Socransky & Haffajee 2005). Only two studies that evaluated the 6-month effect of AMX+MET on the subgingival microbiota of GAP are reported. Xajigeorgiou et al. (2006) showed that the association of these antibiotics was the only protocol that reduced significantly the levels of all 4 periodontal pathogens examined (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola*). No significant changes in prevalence were observed within or among the four groups (SRP, AMX+MET, MET and doxycycline). Yek et al. (2010) reported a reduction in the frequency of the red complex at 6 months, but no differences were detected between groups. The authors concluded that AMX+MET was very effective in reducing *T. forsythia* to undetectable levels for up to 6 months. Although these studies indicate that systemic AMX+MET provide an additional benefit in terms of reducing periodontal pathogens, we feel there are issues concerning methodology and statistical analysis that need to be considered. Both investigations have examined only few bacterial species from a very complex microbiota. The number of samples per patient was small or pooled. The prevalence of a species was presented as positive individuals other than positive samples within an individual for that species. In Xajigeorgiou et al. (2006), a general linear model analysis would be more appropriate for comparisons between groups over time. Looking at the baseline levels of bacteria, for example, it is noticeable that the control group harbored lower levels of pathogens than the AMX+MET group. Therefore, greater reductions were observed in the antibiotic group. At 6 months, though, the control group had fewer patients positive for *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia* than the test group. The levels of these bacteria were also low. In the study by Yek et al. (2010), some species such as *A. actinomycetemcomitans* and *P. nigrescens* were not detected in the control group at baseline, making comparisons between groups after treatment difficult. More recently, a very well-designed RCT that evaluated the microbiological changes after treatment with SRP+AMX+MET or SRP+placebo was reported (Mestnik et al. 2010). Although the study examined a large number of bacterial species, it presented only short-term results (3-month follow up). The authors showed that the use of antibiotics lead to greater reductions in mean counts and proportions of periodontal pathogens, particularly species of the orange complex (Mestnik et al. 2010). In sites with initially deep PD, the mean counts of *A. actinomycetemcomitans* were significantly lower in the test group compared to the placebo group at 3 months. As reported by other authors, major changes in prevalence and counts of subgingival species after periodontal treatment

with or without antibiotics are usually more pronounced in the first 3 months after therapy (Feres et al. 2001, Colombo et al. 2005, Haffajee et al. 2006, Teles et al. 2006). We did find that reductions in periodontal pathogens were significantly greater at 3 months, but no differences between groups were seen (data not shown).

The impact of both treatments on microorganisms not considered periodontopathogenic was quite variable. Most of these species had an increase in mean frequency and levels after therapy, particularly in the placebo group. Antibiotics were more effective in reducing or keeping these microorganisms in lower prevalence and levels. Species usually resistant to a large number of antimicrobials such as *P. aeruginosa* and *A. baumannii* did increase in mean counts at 3 months, but returned to baseline levels at 6 months in both groups. Species commonly susceptible to metronidazole, including *B. fragilis*, *C. difficile* and *H. pylori* tended to reduce in levels in the test group. Surprisingly, the strictly anaerobic rod *D. pneumosintes* increased significantly in frequency and counts over time in both therapeutic groups. This species has been associated with primary and persistent endodontic infections (siqueira), as well as different forms of periodontitis (Contreras et al. 2000, Gomes et al. 2006, Ferraro et al. 2007, Colombo et al. 2009). Some authors have proposed that this organism should be considered as one of the putative periodontal pathogens (Contreras et al. 2000). In addition, sites that did not respond after treatment harbored significantly higher levels of *D. pneumosintes* at baseline and 6 months than sites that improved in both therapy groups. Recently, Colombo et al. (2009) reported that subjects and/or sites refractory to mechanical periodontal therapy combined to periodontal surgery and systemic AMOX plus MET harbored a high prevalence of this microorganism in the subgingival microbiota. Thus, it is possible that for sites or individuals with aggressive periodontitis and high levels of *D. pneumosintes* other therapeutic approaches would provide better clinical and microbiological outcomes. Likewise, the persistence of high levels of *T. denticola*, *T. socranskii*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens* and *P. tanneriae* after the enhanced therapy with systemic antibiotics was associated with attachment loss. In the placebo group, microorganisms associated with treatment failure included the pathogens *T. forsythia* and *P. intermedia*, as well as *F. necrophorum*, *P. tannerea*, and *E. saphenum*. These data indicate that, in addition to known periodontal pathogens, other species not usually investigated in microbiological studies may play a role in the etiopathogenesis of aggressive forms of periodontitis. Moreover, these species may not be affected by the routinely therapeutic approaches proposed for treating periodontal

diseases as the common periodontal pathogens are. Unfortunately, there are no data in the literature we could refer to about the effects of systemic antibiotics on “non-oral” species colonizing the subgingival microbiota of aggressive periodontitis individuals.

In summary, systemic AMX+MET associated to an enhanced non-surgical therapy provided additional clinical benefit in reducing PD and CAL, as well as the proportion of residual periodontal pockets in GAP for 6 months. The ongoing monitoring of these patients will allow us to determine whether this clinical stability will be sustained in both therapeutic groups. In contrast, no adjunctive effects of antibiotics on the reduction of mean prevalence and levels of classical periodontal pathogens were observed. Some species not commonly associated with aggressive periodontitis, such as *D. pneumosintes* were not affected by any therapy. This species, as well as *P. anaerobius*, *C. rectus*, *F. necrophorum* and *P. tannerea* were associated with treatment failure. Further longitudinal studies evaluating a large number of subjects and bacterial species are needed in order to prove the real clinical and microbiological benefits of systemic AMX+MET in the treatment of aggressive periodontitis.

Acknowledgments

This study was supported in part by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brasilia, Brazil; and Foundation for Research Financial Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Rio de Janeiro, Brazil.

References

- Albandar, J. M., Brown, L. J. & Loe, H. (1997) Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **68**, 973-981.
- Andersen, R.N., Ganeshkumar, N. & Kolenbrander, P.E. (1998) *Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium* spp. *Oral Microbiology and Immunology* **13**, 51-54.
- Asikainen, S., Jousimies-Somer, H., Kanervo, A. & Saxen, L. (1986) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and clinical periodontal status in Finnish juvenile periodontitis patients. *Journal of Periodontology* **57**, 91-93.

- Axelsson, P., Lindhe, J. & Nystrom, B. (1991) On the prevention of caries and periodontal disease. Results of a 15-year longitudinal study in adults. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 182-189.
- Badersten, A., Nilveus, R. & Egelberg, J. (1984) Effect of non surgical periodontal therapy. II. Severely advanced periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **11**, 63-76.
- Botero, J. E., Contreras, A., Lafaurie, G., Jaramillo, A., Betancourt, M. & Arce, R. M. (2007) Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *Journal of Clinical Periodontology* **78**, 696-704.
- Buchmann, R., Conrads, G. & Sculean, A. (2010) Short-term effects of systemic antibiotics during periodontal healing. *Quintessence International* **41**, 303-312.
- Checchi, L., Montevecchi, M., Gatto, M. R. & Trombelli, L. (2002) Retrospective study of tooth loss in 92 treated periodontal patients. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 651-656.
- Cobb, C. M. (1996) Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Annals of Periodontology* **1**, 443-490.
- Colombo, A. P., Teles, R. P., Torres, M. C., Souto, R., Rosalem, W. J., Mendes, M. C. & Uzeda, M. (2002) Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **73**, 360-369.
- Colombo, A. P., Teles, R. P., Torres, M. C., Rosalem, W. J., Mendes, M. C., Souto, R. & Uzeda, M. (2005) Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *Journal of Periodontology* **76**, 116-122.
- Colombo, A. P., Boches, S. K., Cotton, S. L., Goodson, J. M., Kent, R., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Hasturk, H., Van Dyke, T. E., Dewhirst, F. & Paster, B. J. (2009) Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *Journal of Periodontology* **80**, 1421-1432.
- Contreras, A., Doan, N., Chen, C., Rusitanonta, T., Flynn, M. J. & Slots, J. (2000) Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **15**, 269-272.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322

- Escibano, M., Herrera, D., Morante, S., Teughels, W., Quirynen, M. & Sanz, M. (2010) Efficacy of a low-concentration chlorhexidine mouthrinse in non-compliant periodontitis patients attending a supportive periodontal care programme: a randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 266–275.
- Faveri, M., Mayer, M. P., Feres, M., de Figueiredo, L. C., Dewhirst, F. E. & Paster, B. J. (2008) Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology* **23**, 112–118.
- Faveri, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Mestnik, M. J., Mayer, M. P. & Feres, M. (2009) Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 739-749.
- Feres, M., Haffajee, A. D., Allard, K. A., Som, S. & Socransky, S. S. (2001) Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically administered amoxicillin or metronidazole. *Journal of Clinical Periodontology* **28**: 597–609.
- Feres, M., Gursky, L.C., Faveri, M., Tsuzuki, C.O. and Figueiredo, L.C. (2009) Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 857-867.
- Ferraro, C. T., Gornic, C., Barbosa, A. S., Peixoto, R. J. & Colombo, A. P. (2007) Detection of *Dialister pneumosintes* in the subgingival biofilm of subjects with periodontal disease. *Anaerobe* **13**, 244-248.
- Fine, D. H., Markowitz, K., Furgang, D., Fairlie, K., Ferrandiz, J., Nasri, C., McKiernan, M. & Gunsolley, J. (2007) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 3859-3869.
- Flemmig, T. F., Milian, E., Kopp, C., Karch, H. & Klaiber, B. (1998) Differential effects of systemic metronidazole and amoxicillin on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in intraoral habitats. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 1-10.
- Fritschi, B. Z., Albert-Kiszely, A. & Persson, G. R. (2008) *Staphylococcus aureus* and other bacteria in untreated periodontitis. *Journal of Dental Research* **87**, 589-593.

- Gajardo, M., Silva, N., Gomez, L., Leon, R., Parra, B., Contreras, A. & Gamonal, J. (2005) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *Journal of Periodontology* **76**, 289-294.
- Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, et al. (2006). Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol* 77:1483-1490.
- Gootz, T. D. (2010) The global problem of antibiotic resistance. *Critical Reviews in Immunology* **30**, 79-93.
- Guerrero, A., Griffiths, G. S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D. R., Laurell, L. & Tonetti, M. S. (2005) Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1096-1107.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* **5**, 78–111.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Dibart, S. & Kent, R. L., Jr. (1996) Response to periodontal therapy in patients with high or low levels of *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *B. forsythus*. *Journal of Clinical Periodontology* **23**, 336-345.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003) Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Annals of Periodontology* **8**, 115-181.
- Haffajee, A. D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N. J. & Socransky, S. S. (2004) Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 996-1002.
- Haffajee, A. D., Teles, R. P. & Socransky, S. S. (2006) The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontology 2000* **42**, 219–258.
- Haubek, D., Ennibi, O. K., Poulsen, K., Vaeth, M., Poulsen, S. & Kilian, M. (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* **371**, 237-242.
- Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldan, S. (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root

- planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **29** Suppl 3, 136-159.
- Johnston, B. L. & Bryce, E. (2009) Hospital infection control strategies for vancomycin-resistant *Enterococcus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile*. *Canadian Medical Association Journal* **180**, 627-631.
- Kaner, D., Bernimoulin, J. P., Hopfenmuller, W., Kleber, B. M. & Friedmann, A. (2007) Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 880-891.
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I. & Diaz, P. I. (2006) Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000* **42**, 47-79.
- Lee, J., Choi, B., Yoo, Y., Choi, S., Cho, K., Chai, J. & Kim, C. (2003) Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **74**, 1329-1335.
- López, N. J., Mellado, J. C., Leighton, G. X. (1996) Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **23**, 101-105.
- Machtei, E. E. & Younis, M. N. (2008) The use of 2 antibiotic regimens in aggressive periodontitis: comparison of changes in clinical parameters and gingival crevicular fluid biomarkers. *Quintessence International* **39**, 811-819.
- Mandel, I. D. (1988) Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* **15**, 488-498.
- Mayorga-Fayad, I., Lafaurie, G. I., Contreras, A., Castillo, D. M., Baron, A. & Aya Mdel, R. (2007) [Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogota, Colombia: an epidemiological approach]. *Biomedica* **27**, 21-33.
- Mestnik, M.J., Feres, M., Figueiredo, L., Duarte, P.M., Lira, E.A.G. & Faveri, M. (2010) Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 353-365.

- Moreira, R. M. & Feres-Filho, E. J. (2007) Comparison between full-mouth scaling and root planing and quadrant-wise basic therapy of aggressive periodontitis: 6-month clinical results. *Journal of Periodontology* **78**, 1683-1688.
- Muller, H. P., Heinecke, A., Borneff, M., Kiencke, C., Knopf, A. & Pohl, S. (1998) Eradication of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from the oral cavity in adult periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **33**, 49-58.
- Okuda, K., Kimizuka, R., Katakura, A., Nakagawa, T. & Ishihara, K. (2003) Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in *Helicobacter pylori*-infected disease. *Journal of Periodontology* **74**, 123-128.
- Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J. & Kornman, K. S. (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* **14**, 216-48.
- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F. E. (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology* **183**, 3770-3783.
- Pavicic, M. J., van Winkelhoff, A. J., Douque, N. H., Steures, R. W. & de Graaff, J. (1994a) Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 107-112.
- Pavicic, M. J., van Winkelhoff, A. J., Pavicic-Temming, Y. A. & de Graaff, J. (1994b) Amoxycillin causes an enhanced uptake of metronidazole in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a mechanism of synergy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **34**, 1047-1050.
- Persson, G. R., Hitti, J., Paul, K., Hirschi, R., Weibel, M., Rothen, M. & Persson, R. E. (2008). *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in subgingival bacterial samples from parous women. *J Periodontol* **79**, 508-516.
- Rams, T. E., Feik, D., Young, V., Hammond, B. F. & Slots, J. (1992) Enterococci in humans periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 249-52.
- Rhemrev, G. E., Timmerman, M. F., Veldkamp, I., Van Winkelhoff, A. J. & Van der Velden, U. (2006) Immediate effect of instrumentation on the subgingival microflora in deep inflamed pockets under strict plaque control. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 42-48.

- Roberts, M. C. (2002) Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontology 2000* **28**, 280-297.
- Serino, G., Rosling, B., Ramberg, P., Socransky, S. S. & Lindhe, J. (2001). Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 910-916.
- Seymour, R. A. & Hogg, S. D. (2008) Antibiotics and chemoprophylaxis. *Periodontology 2000* **46**, 80-108.
- Shaddox, L. M. & Walker, C. (2009) Microbial testing in periodontics: value, limitations and future directions. *Periodontology 2000* **50**, 25-38.
- Slots, J. & Jorgensen, M. G. (2002) Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet? *Periodontology 2000* **28**, 298-312.
- Slots, J., Feik, D. & Rams, T. E. (1990) Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **5**, 149-154.
- Smith, A. J., Jackson, M. S. & Bagg, J. (2001) The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *Journal of Medical Microbiology* **50**, 940-946.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28**, 12-55.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**, 135-187.
- Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* **17**, 788-792.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134-144.
- Souto, R. & Colombo, A. P. (2008a) Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Archives of Oral Biology* **53**, 155-160.
- Souto, R. & Colombo, A. P. (2008b) Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *Journal of Periodontology* **79**, 97-103.

- Souto, R., de Andrade, A. F. B., Uzeda, M. & Colombo, A. P.V. (2006) Prevalence of “non-oral” pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**, 208–215
- Susin, C. & Albandar, J. M. (2005) Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. *Journal of Periodontology* **76**, 468-475.
- Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishizuka, M., Huang, Y. & Ishikawa, I. (2003) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *Journal of Periodontology* **74**, 1460–1469.
- Tinoco, E. M., Beldi, M. I., Loureiro, C. A., Lana, M., Campedelli, F., Tinoco, N. M., Gjermo, P. & Preus, H.R. (1997) Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. *European Journal of Oral Science* **105**, 9-14.
- Teles, R. P., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2006). Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000* **42**, 180-218.
- van Assche, N., van Essche, M., Pauwels, M., Teughels, W. & Quirynen, M. (2009) Do periodontopathogens disappear after full-mouth tooth extraction? *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 1043-1047.
- van der Velden, U. (2005) Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontology 2000* **39**, 13–21.
- van Winkelhoff, A. J., Tijhof, C. J. & de Graaff, J. (1992) Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Journal of Periodontology* **63**, 52-57.
- van Winkelhoff, A. J. & Winkel, E. G. (2005) Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontology 2000* **39**, 40–52.
- Xajigeorgiou, C., Sakellari, D., Slini, T., Baka, A. & Konstantinidis, A. (2006) Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 254-264.
- Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., Som, S., Thompson, M., Torresyap, G. & Socransky, S. S. (2000) The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 637-647.

- Ximenez-Fyvie, L. A., Almaguer-Flores, A., Jacobo-Soto, V., Lara-Cordoba, M., Moreno-Borjas, J. Y. & Alcantara-Maruri, E. (2006) Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 869-877.
- Yek, E. C., Cintan, S., Topcuoglu, N., Kulekci, G., Issever, H. & Kantarci, A. (2010) Efficacy of Amoxicillin and Metronidazole Combination for the Management of Generalized Aggressive Periodontitis. *Journal of Periodontology* (doi:10.1902/jop.2010.090522).
- Watanabe, K., Senba, M., Ichinose, A., Yamamoto, T., Ariyoshi, K. & Matsumoto, K. (2009) Bactericidal activity in filtrated supernatant of *Streptococcus sanguinis* against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **219**, 79-84.
- Westfelt, E., Rylander, H., Dahlen, G. & Lindhe, J. (1998) The effect of supragingival plaque control on the progression of advanced periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 536-541.
- Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J. & van der Velden, U. (1998) Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 857-864.

Table 1S. Oral bacterial taxa used for development of whole genomic DNA probes tested against subgingival biofilm samples.

Taxa	Strain*	Taxa	Strain*
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans a</i>	43718	<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans b</i>	29523	<i>Peptostreptococcus micra</i>	33270
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans c</i>	625**	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Actinomyces gerenscerviae</i>	23860	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104	<i>Propionibacterium acnes I</i>	11827
<i>Actinomyces naeslundii II (A.viscosus)</i>	43146	<i>Propionibacterium acnes II</i>	43541
<i>Actinomyces meyeri</i>	35568	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Rothia dentocariosa</i>	17931
<i>Capnocytophaga concisus</i>	484**	<i>Selenomonas noxia</i>	33359
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Campylobacter showae</i>	51146	<i>Streptococcus oralis</i>	35037
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum</i>	10953	<i>Tannerella forsythia</i>	43037
<i>Fusobacterium nucleatum ss. vincentii</i>	49256	<i>Treponema denticola</i>	B1**
<i>Fusobacterium nucleatum ss. nucleatum</i>	25586	<i>Treponema socranskii</i>	S1**
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	<i>Veillonella parvula</i>	10790
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201		

* ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)

** The Forsyth Institute, Boston, MA

Table 2S. Non-periodontal bacterial taxa used for development of whole genomic DNA probes tested against subgingival biofilm samples.

Taxa	Strain*	Taxa	Strain*
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	<i>Hafnia alvei</i>	11604
<i>Atopobium parvulum</i>	49626	<i>Helicobacter pylori</i>	43504
<i>Bacteroides fragilis</i>	25285	<i>Klebsiella oxytoca</i>	12833
<i>Candida albicans</i>	10231	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
<i>Clostridium difficile</i>	98689	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356
<i>Dialister pneumosintes</i>	33048	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	21824
<i>Enterobacter agglomerans</i>	27155	<i>Neisseria subflava</i>	49275
<i>Enterobacter cloacae</i>	10699	<i>Neisseria polysaccharea</i>	43768
<i>Enterobacter gergoviae</i>	33028	<i>Neisseria meningitides</i>	13077
<i>Enterobacter sakazakii</i>	12868	<i>Neisseria lactamica</i>	23970
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	<i>Neisseria sicca</i>	29256
<i>Escherichia coli</i>	10799	<i>Olsenella uli</i>	49627
<i>Enterococcus faecalis</i>	10100	<i>Prevotella tanneriae</i>	51259
<i>Eubacterium saphenum</i>	49989	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145
<i>Filifactor alocis</i>	35896	<i>Salmonella enterica sorv. typhi</i>	6539
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	25286	<i>Serratia liquefaciens</i>	11367
<i>Gardnerella vaginalis</i>	49145	<i>Serratia marcescens</i>	13477
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	33389	<i>Staphylococcus aureus ss aureus</i>	33591
<i>Haemophilus influenzae</i>	33533	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619

*ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)

Table 1. Full-mouth clinical data (mean \pm SEM) of the study population at baseline, 3 and 6 months after periodontal treatment.

Clinical Parameters †	Control (n = 15)			Test (n = 16)		
	Baseline	3 months	6 months	Baseline	3 months	6 months
Clinical Attachment Level (CAL) *	4.6 \pm 0.3	4.0 \pm 0.2	3.9 \pm 0.2	5.0 \pm 0.3	3.8 \pm 0.2	3.8 \pm 0.3
Probing Pocket Depth (PD) *	4.2 \pm 0.2	3.2 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1	4.4 \pm 0.2	2.9 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1
<i>% of sites with:</i>						
Supragingival Biofilm *	71 \pm 4.9	34 \pm 5.6	36 \pm 5	70 \pm 4.6	24 \pm 3.9	25 \pm 6
Bleeding on probing *	80.6 \pm 5.6	50 \pm 3.4	58 \pm 5	84.9 \pm 3.9	42 \pm 3.0	46 \pm 5
Gingival Bleeding *	27.4 \pm 3.1	23.5 \pm 4.0	26 \pm 5	28.4 \pm 3.6	11.4 \pm 2.2	14 \pm 2
Suppuration	0.3 \pm 0.1	0.16 \pm 0.12	0.04 \pm 0.04	0.8 \pm 0.5	0.05 \pm 0.05	0
PD \leq 3mm *	48 \pm 4.7	71 \pm 2.3	71 \pm 2.8	47 \pm 4.7	78 \pm 2.9	81 \pm 3.1
PD 4-6 mm *	39 \pm 4.4	25 \pm 2.3	25 \pm 2.7	37 \pm 3.3	20 \pm 2.8	18 \pm 3.1
PD \geq 7 mm *	13 \pm 2.1	4 \pm 0.9	4 \pm 0.9	16 \pm 2.3	2 \pm 0.6	1 \pm 0.4
CAL \leq 3 mm *	42 \pm 5.2	53 \pm 4.2	56 \pm 3.7	38 \pm 5.4	55 \pm 5.7	57 \pm 5.9
CAL 4-6 mm *	36 \pm 4.3	34 \pm 3.4	32 \pm 3.1	35 \pm 3.1	34 \pm 4.0	32 \pm 3.9
CAL \geq 7 mm *	22 \pm 3.0	13 \pm 2.5	12 \pm 2.2	27 \pm 4.0	11 \pm 2.3	11 \pm 2.6

* Refers to significant differences over time within the groups (GLM; $p < 0.01$); † No significant differences between groups over time were observed for these variables (GLM; $p < 0.05$).

Table 2. Periodontal clinical parameters (mean \pm SEM) of the sites sampled for microbiological analysis of subjects in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months after therapy.

Clinical Parameters ‡	Control (n = 15)			Test (n = 16)		
	Baseline	3 months	6 months	Baseline	3 months	6 months
Clinical Attachment Level *	5.2 \pm 0.2	4.4 \pm 0.2	4.4 \pm 0.2	5.6 \pm 0.3	4.1 \pm 0.2	4.1 \pm 0.3
Probing Pocket Depth *	4.9 \pm 0.2	3.5 \pm 0.2	3.5 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2	3.3 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1
<i>% of sites with:</i>						
Supragingival Biofilm *	69.6 \pm 6.2	26 \pm 6	26 \pm 4	64.2 \pm 6.4	24 \pm 4.5	26 \pm 2.6
Bleeding on probing *	83.6 \pm 4.4	54 \pm 6.4	69 \pm 5.3	85 \pm 3.1	45 \pm 3.7	60 \pm 4.7
Gingival Bleeding	19.5 \pm 3.1	21 \pm 4.4	20.3 \pm 6	17 \pm 3	9.7 \pm 2	14 \pm 4
Suppuration	0.9 \pm 0.6	0	0	1.7 \pm 1.2	0.4 \pm 0.4	0

* Refers to significant differences over time within the groups (GLM; $p < 0.01$); ‡ No significant differences between groups over time were observed for these variables (GLM; $p < 0.05$)

Figure Legends

Figure 1. Flow chart of the study design.

Figure 2. Mean (\pm SD) percentage of the sampled sites that showed (A) increase or reduction in PD, and (B) attachment loss or gain at 6 months post-therapy in the 2 groups. Only sites that reduced PD and gained attachment but did not present residual pockets (PD \geq 4 mm) at 6 months were considered. Likewise, only sites that increased PD and lost attachment and presented residual PD \geq 4 mm at 6 months were considered. Significant differences between groups were tested by Mann-Whitney test, * $p < 0.05$.

Figure 3. Inter-individual variability in the prevalence of (A) *A. actinomycetemcomitans* (Aa), (B) *P. gingivalis*, (C) *T. forsythia* and (D) *T. denticola* in the control (n=15) and test (n=16) clinical groups at baseline. Each circle represents the frequency of a bacterial species in the 14 sites sampled from each individual for microbial analysis.

Figure 4. Changes in mean (\pm SEM) prevalence (%) of oral species in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months post-therapy. The % of sites colonized by each species was determined for each subject and then average across subjects in each group for each time point separately. The species were ordered according to the complexes described by Socransky et al. (1998). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ refer to significant differences between groups at baseline (Mann-Whitney test). # $p < 0.05$ refers to significant differences between the groups over time and † $p < 0.05$ refers to significant differences in the groups over time (GLM test).

Figure 5. Changes in mean (\pm SEM) levels ($\times 10^5$ cells) of oral species in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months post-therapy. The mean counts of each species were computed for each individual, and then averaged across subjects in each group at each time point. The species were ordered according to the complexes described by Socransky et al. (1998). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ refer to significant differences between groups at baseline (Mann-Whitney test). # $p < 0.05$ refers to significant differences between the groups over time and † $p < 0.05$ refers to significant differences in the groups over time (GLM test).

Figure 6. Changes in mean (\pm SEM) prevalence (%) of “non-periodontal” species in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months post-therapy. The % of sites colonized by each species was determined for each subject and then average across subjects in each group for each time point separately. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ refer to significant differences between groups at baseline (Mann-Whitney test). # $p < 0.05$ refers to significant differences between the groups over time and † $p < 0.05$ refers to significant differences in the groups over time (GLM test).

Figure 7. Changes in mean (\pm SEM) levels ($\times 10^5$ cells) of “non-periodontal” species in the clinical groups at baseline, 3 and 6 months post-therapy. The mean counts of each species were computed for each individual, and then averaged across subjects in each group at each time point. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ refer to significant differences between groups at baseline (Mann-Whitney test). # $p < 0.05$ refers to significant differences between the groups over time and † $p < 0.05$ refers to significant differences in the groups over time (GLM test).

Figure 8. Bacterial species that differed significantly in prevalence at baseline (upper bars) and at 6 months (lower bars) between sites that gained or lost clinical attachment after therapy in the control (placebo) and test (systemic antibiotics) groups (* $p < 0.05$; Chi-square test).

Figure 9. Bacterial species that differed significantly in mean levels ($\times 10^5$ cells) at baseline (upper bars) and at 6 months (lower bars) between sites that gained or lost clinical attachment after therapy in the control (placebo) and test (systemic antibiotics) groups (* $p < 0.05$; Mann-Whitney test).

Figure 1

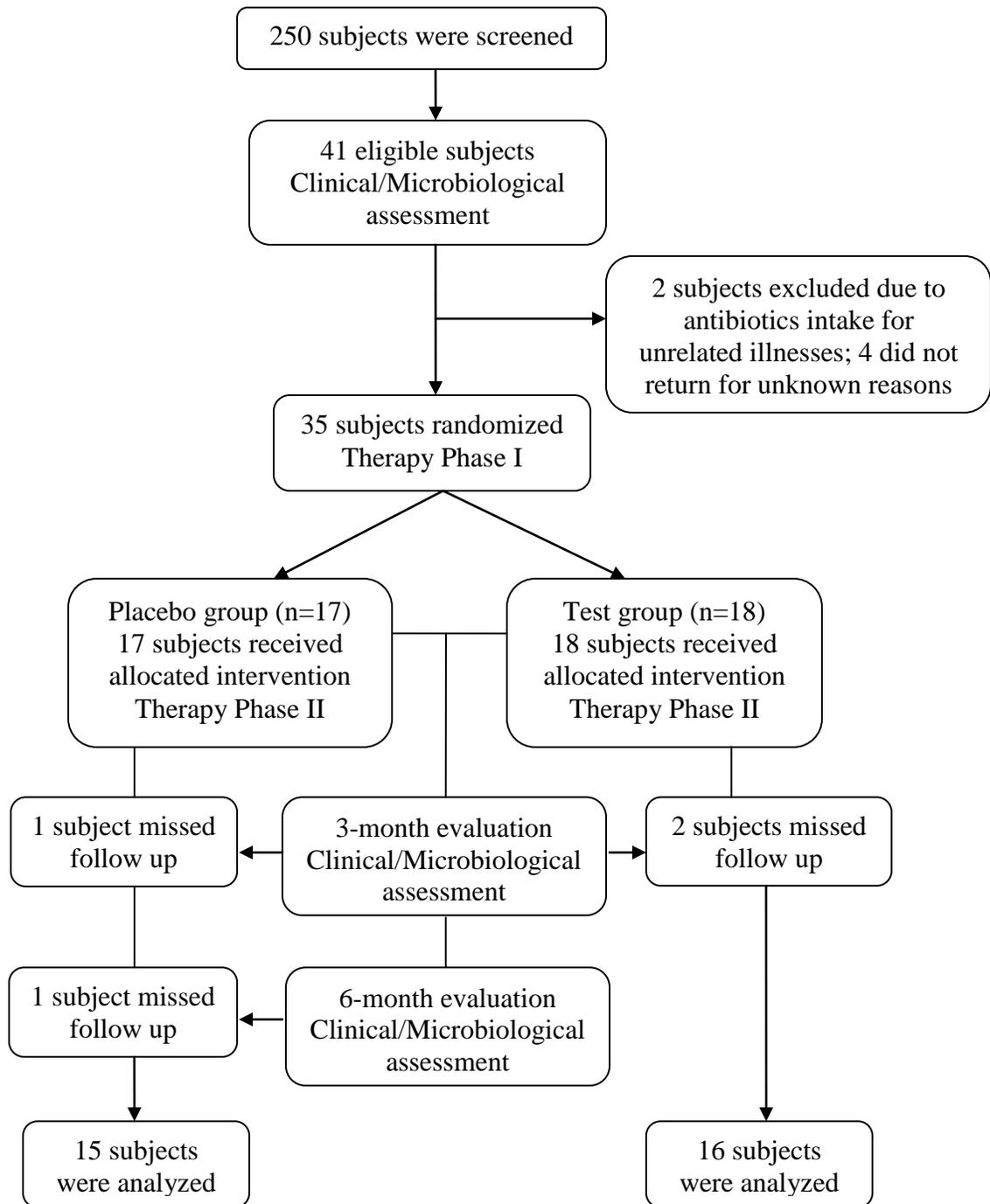


Figure 2.

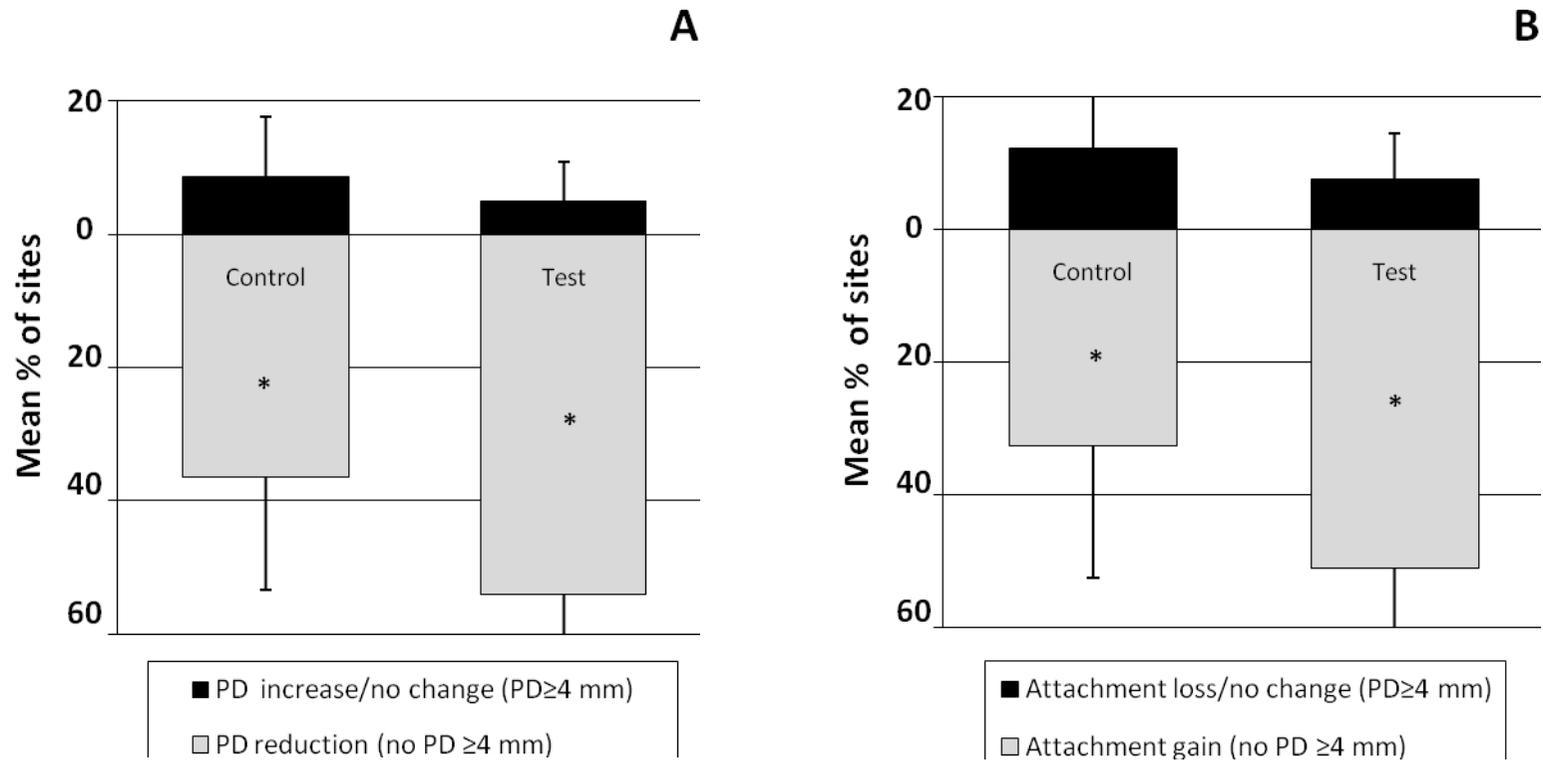
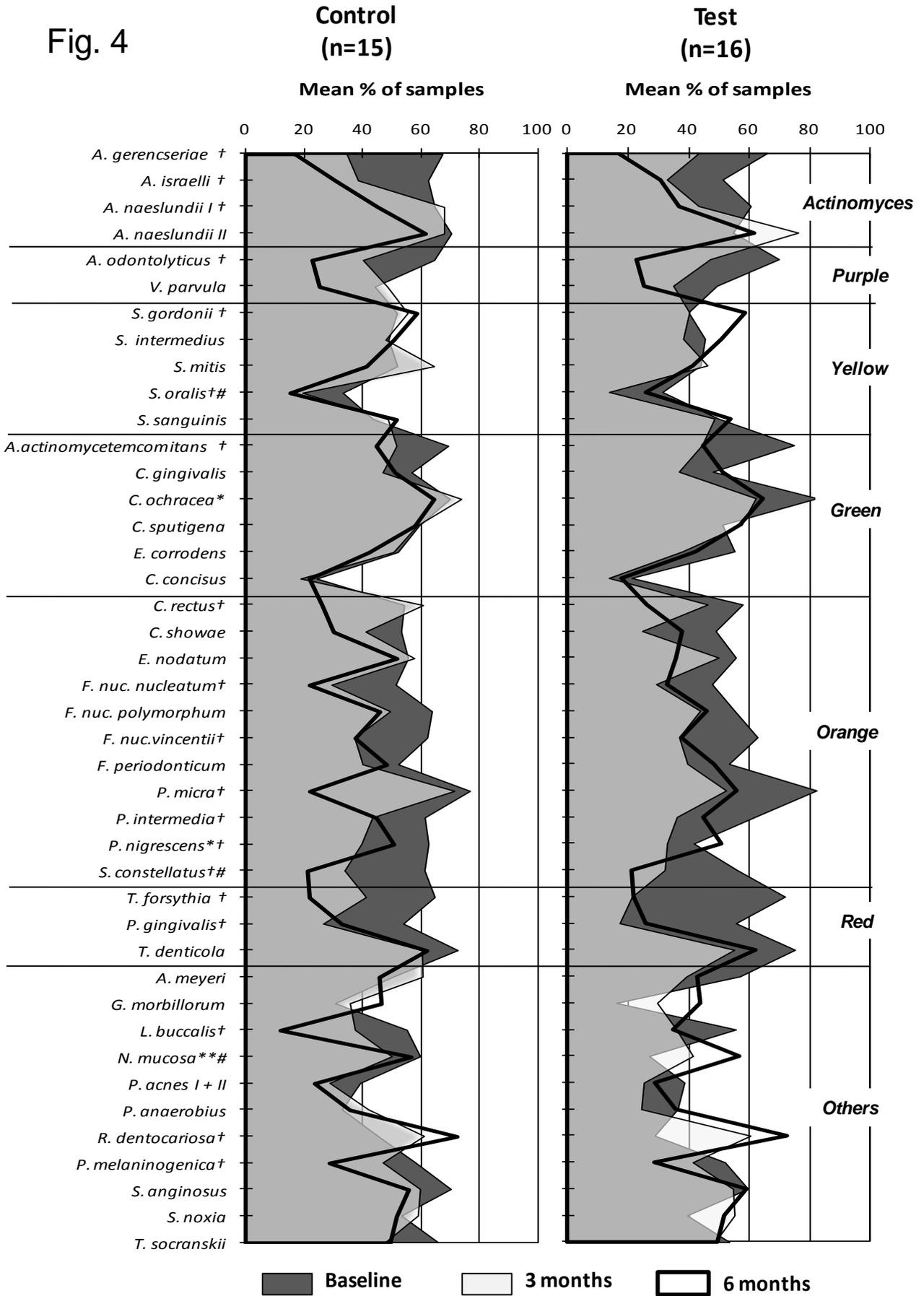


Fig. 4



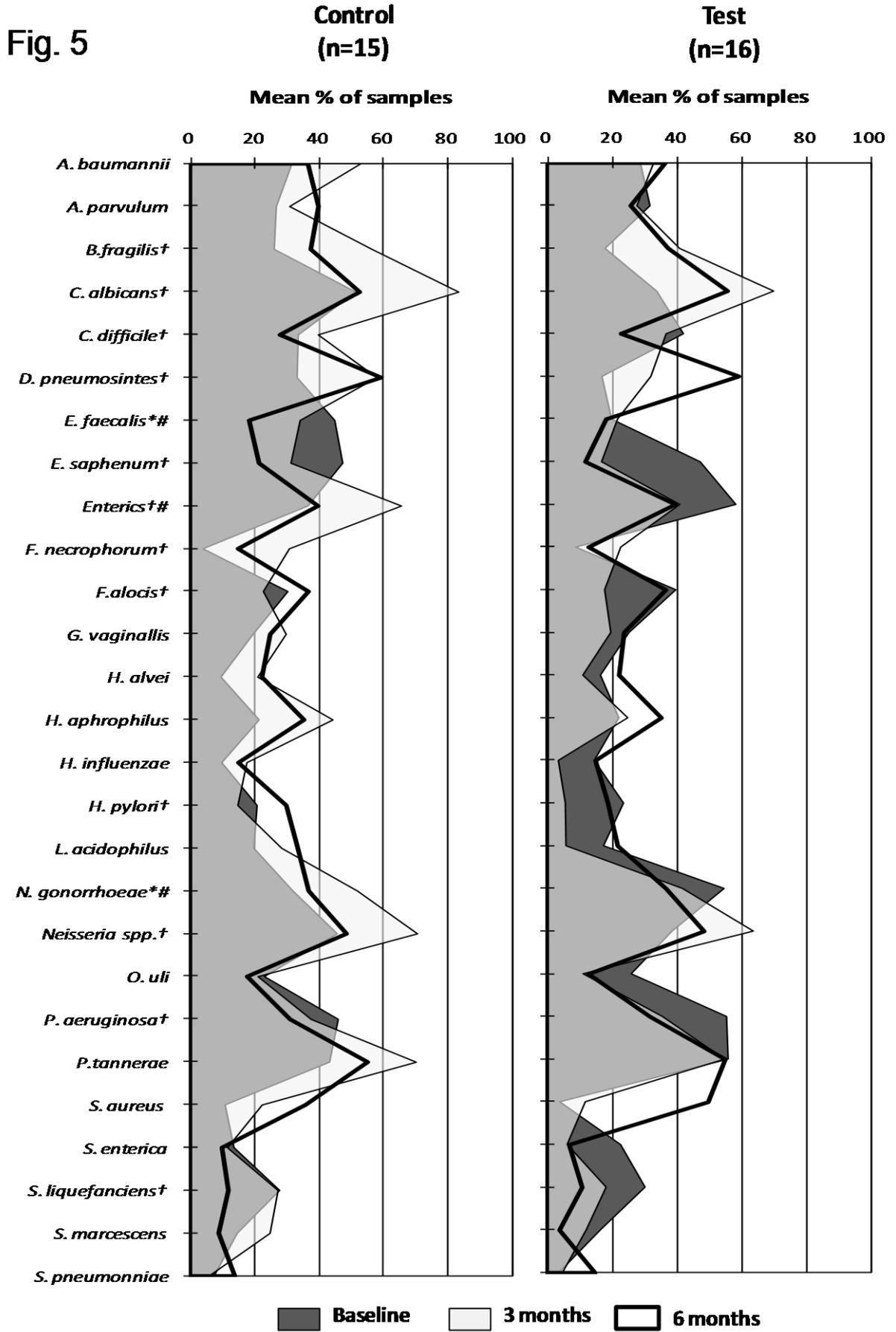


Fig. 6

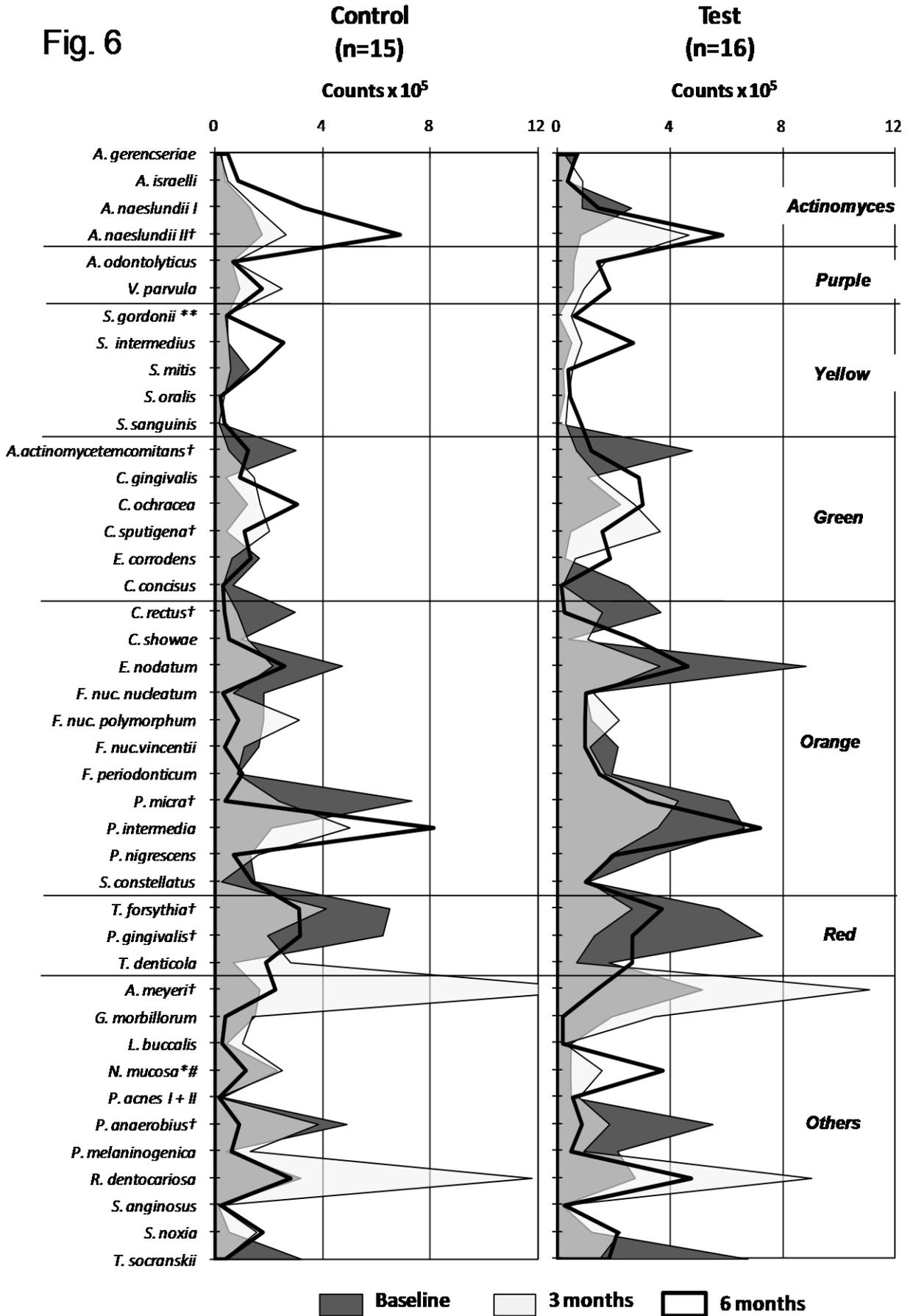


Fig. 7

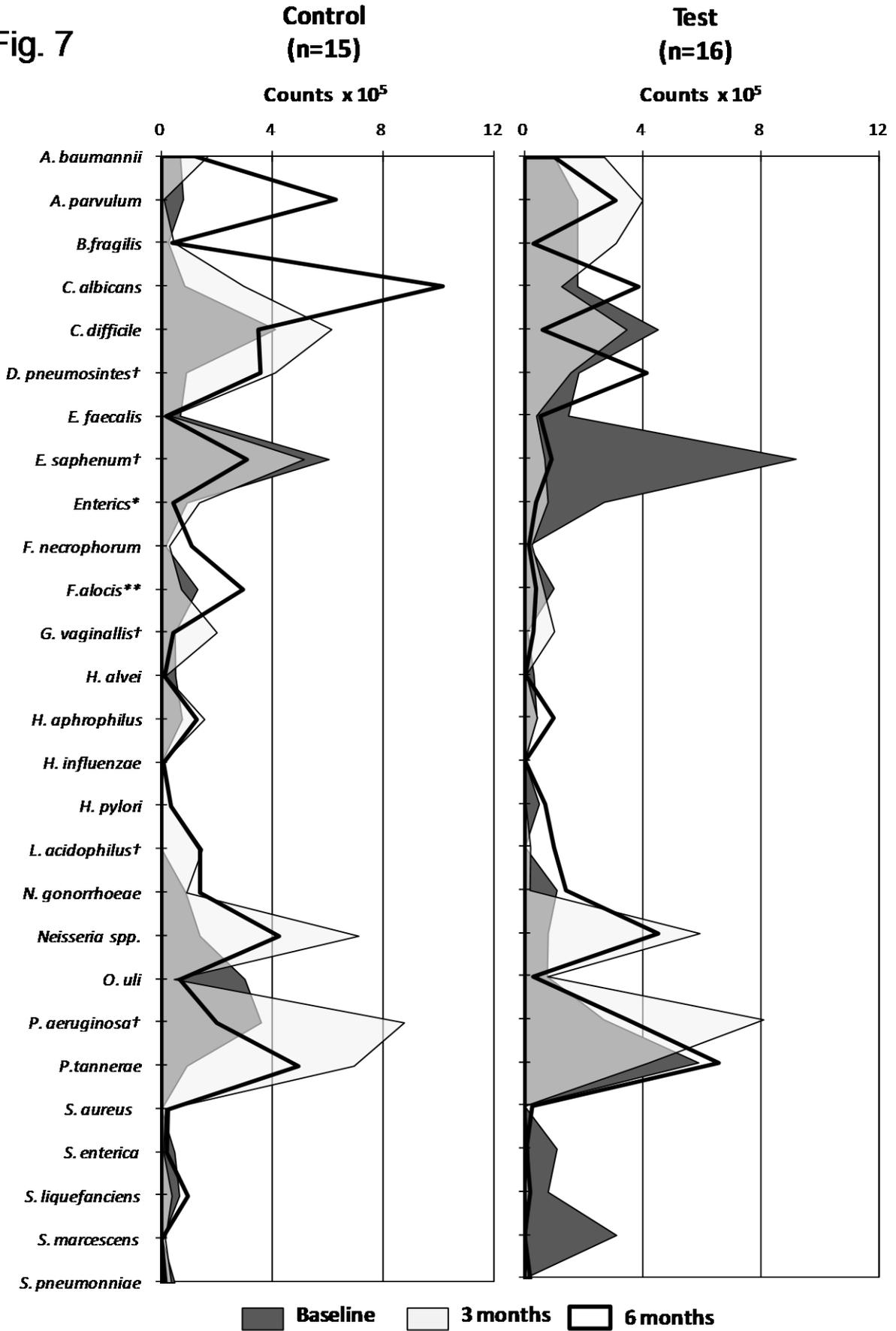
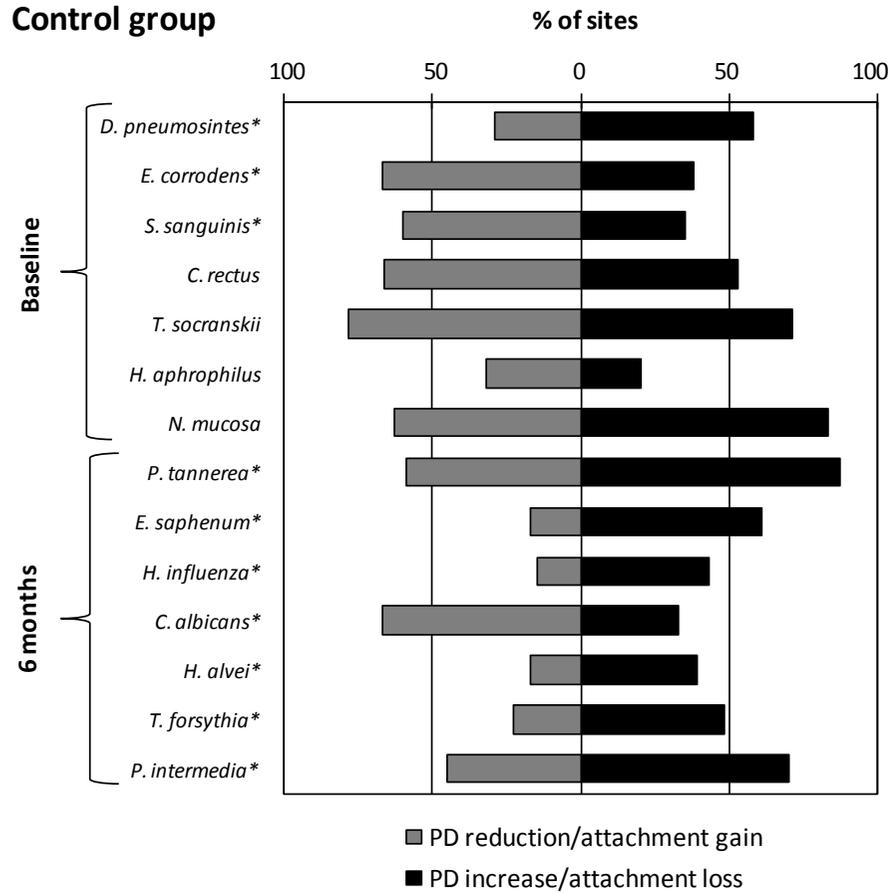


Figure 8.

Control group



Test group

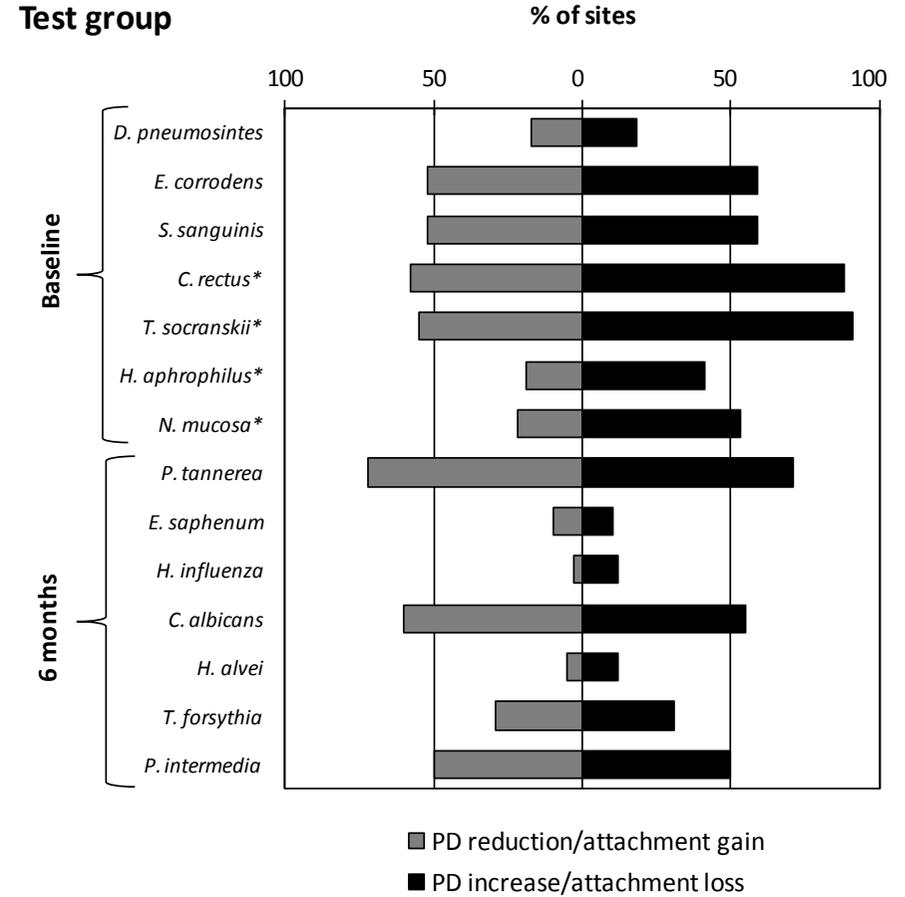
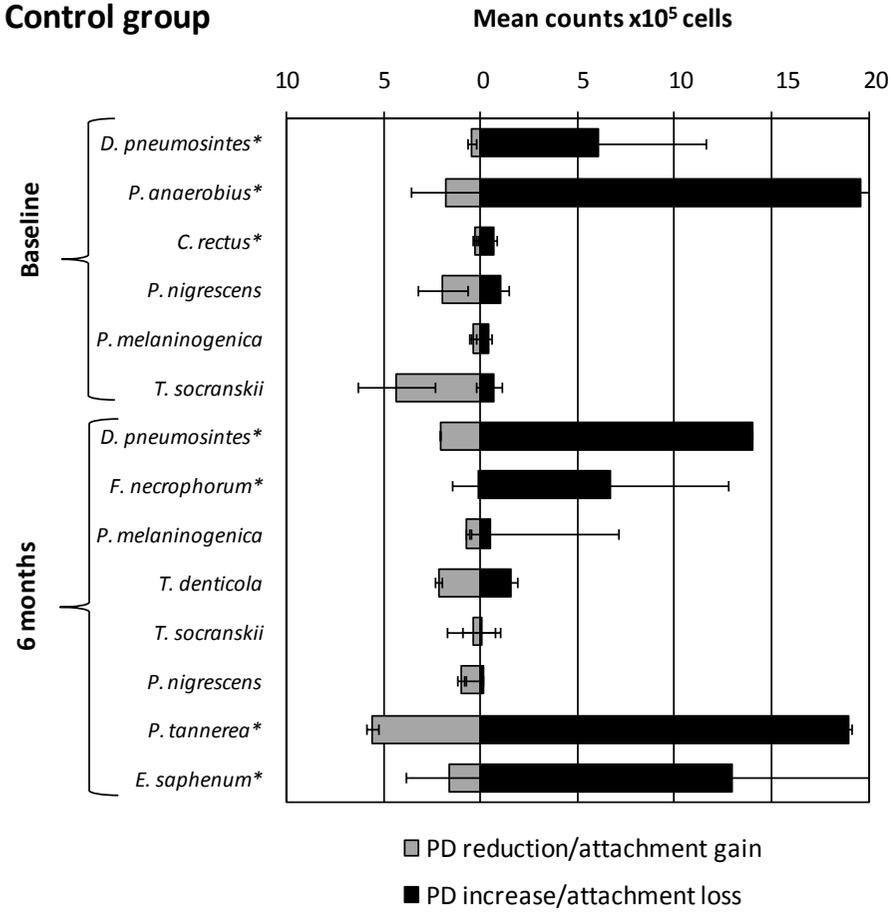
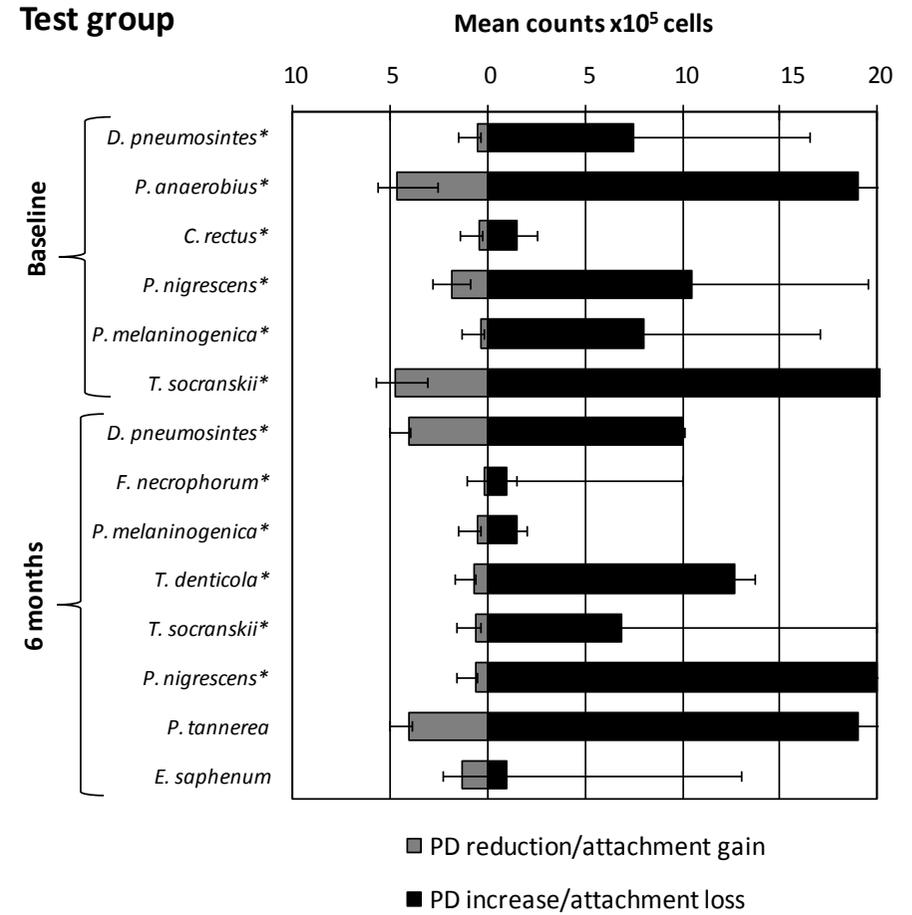


Figure 9.

Control group



Test group



5. DISCUSSÃO

Atualmente, duas principais formas de doença periodontal destrutiva são reconhecidas: PC e PA (Armitage 1999). No sistema classificatório atual, algumas características são descritas para diferenciar essas duas formas de doença. No entanto, a aplicabilidade desses critérios na clínica de periodontia tem apresentado muitas dificuldades. Essa problemática parece ser conseqüência da ausência de critérios claros e bem definidos que ajudem no diagnóstico clínico dessas doenças. Além disso, existe a falta de critérios biológicos, como por exemplo, padrões imunológicos ou características microbiológicas específicas (Picolos et al. 2005). A PA, apesar de apresentar características mais bem definidas, tais como rápida perda de inserção e perda óssea em indivíduos mais jovens e sistemicamente saudáveis, ainda constitui um grupo bastante heterogêneo. Atualmente, existe o conceito de que doenças periodontais são na verdade doenças sindrômicas e, portanto, deveriam ser diagnosticadas como tais (van der Velden 2005). Ou seja, um conjunto de dados clínicos e laboratoriais deve ser obtido para que um diagnóstico mais preciso seja feito. Se considerarmos ainda características subjetivas, como hábitos e costumes, aspectos culturais e condições sócio-econômicas de um determinado grupo populacional, o diagnóstico dessas doenças torna-se ainda mais difícil. Assim, pode-se especular que um diagnóstico universal para as doenças periodontais, como ocorre para diversas outras doenças em humanos, nunca seja alcançado (van der Velden 2005). Essa questão é de extrema importância, pois muitos estudos que se propõem a caracterizar uma determinada forma de periodontite em termos microbiológicos, imunológicos ou genéticos, o fazem em indivíduos agrupados apenas por características clínicas semelhantes. Isso pode explicar, muitas vezes, a grande controvérsia existente entre os dados reportados na literatura.

Apesar do reconhecimento das limitações no diagnóstico das PAs, no presente estudo utilizou-se o critério diagnóstico proposto pelo *Consensus Report* do Workshop Internacional para Classificação das Condições e Doenças Periodontais de 1999 (Armitage 1999). Neste sistema de classificação, a idade do paciente não é considerada no diagnóstico da PA. Entretanto, a grande maioria dos estudos ainda limita a idade da amostra populacional em até 35 anos a fim de se obter indivíduos mais jovens, mas com grande destruição periodontal (Susin & Albandar 2005, Guerrero et al. 2005, Mestnik et al., Yek et al. 2010). Em nosso critério de inclusão, uma faixa etária mais ampla foi permitida, incluindo indivíduos com até 39 anos de idade. A justificativa para essa

escolha baseou-se no fato de muitos indivíduos de nossa população não terem acesso ao tratamento dentário, principalmente no âmbito dos serviços públicos e Instituições de ensino. Logo, muitos acabam buscando por atendimento odontológico mais tardiamente (Susin & Albandar 2005, Susin et al. 2005, Silva-Boghossian et al. 2009). Ainda assim, pudemos detectar na anamnese que grande parte desses pacientes relatou a existência de “problemas” periodontais já há alguns anos. Isso indica que a doença iniciou-se provavelmente em uma idade mais baixa, característica comum das doenças agressivas.

Um outro dado demográfico importante dessa amostra foi o baixo nível sócio-econômico dos indivíduos. A renda da maioria dos pacientes com PAG, em ambos os grupos, estava entre R\$ 381,00- 600,00 ou R\$ 601,00- 1000,00 (Tabela 1A). Esses dados confirmam os achados apresentados em estudos prévios que associam a presença de níveis socioeconômicos mais baixos com a presença de grande destruição periodontal (Susin & Albandar 2005, Corraini et al. 2008b, Silva-Boghossian et al. 2009). Esses estudos identificaram o baixo nível socioeconômico como um possível fator de risco para perda de inserção periodontal. Por exemplo, pacientes com baixos e médios níveis socioeconômicos apresentaram uma razão de chance 4,5 vezes maior de ser diagnosticado com PA (Susin & Albandar 2005). Essa característica de subgrupos da população brasileira também tem reflexos nos parâmetros clínicos dos pacientes examinados. Esses indivíduos apresentaram altos índices de biofilme supragengival (*Table 1* do artigo científico; Tabela 2A) e cálculo (dado não apresentado), corroborando achados de outros no Brasil (Corraini et al. 2008a, Susin et al. 2005). Em relação ao perfil clínico geral, pode-se observar pelos parâmetros de destruição tecidual e inflamação que estes pacientes apresentavam realmente doença periodontal grave generalizada (*Table 1* do artigo científico; Tabela 2A; Figura 8A). Em média, 15% dos sítios apresentavam PS>6mm, enquanto SAS foi observado em mais de 80% dos sítios. Como para a análise microbiológica foram selecionados sítios representativos das arcadas dentárias, parâmetros clínicos periodontais desses sítios também foram avaliados (*Table 2* do artigo; Tabela 3A). Pelo fato da maioria desses sítios apresentarem bolsas periodontais moderadas e profundas, a média de PS e NCI foram relativamente maiores do que as medidas de PS e NCI realizadas em todos os sítios. De qualquer modo, pode-se observar uma grande extensão e gravidade da doença. Quando essas características clínicas foram comparadas entre os dois grupos terapêuticos, não foram observadas diferenças significativas entre os mesmos. Entretanto, é bastante interessante notar a grande heterogeneidade clínica entre os indivíduos nos dois grupos

(dados não apresentados). Isso nos leva a questionar se os critérios que usamos para definir PA são realmente eficientes e adequados. Por outro lado, é bem possível que essa diversidade na manifestação clínica da doença agressiva seja mesmo verdadeira. Por exemplo, Colombo et al. (1998a) demonstraram que pacientes com periodontite que se tornaram refratários à terapia periodontal apresentavam um perfil clínico, e também microbiológico, bastante heterogêneos, apesar de se enquadrarem em critérios bem específicos de diagnóstico.

Essa mesma variabilidade inter-individual também foi observada em relação ao perfil microbiológico dos pacientes desse estudo (*Figures 3A-D* do artigo). Assim, alguns pacientes apresentavam *A. actinomycetemcomitans* em todos os sítios coletados, enquanto outros tinham uma prevalência baixa desse microorganismo (*Figure 3A* do artigo). Esses dados estão de acordo com estudos que mostram diferenças microbiológicas entre indivíduos com o mesmo diagnóstico clínico, assim como diferenças entre sítios de um mesmo indivíduo, e entre indivíduos de populações distintas (Haffajee et al. 2004, Kolenbrander et al. 2006, Teles et al. 2006). Apesar dessa grande variabilidade microbiológica entre os indivíduos com PAG, os perfis microbiológicos de ambos os grupos eram similares no início do estudo (pré-terapia). Patógenos periodontais clássicos, tais como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*, e membros do complexo laranja foram detectados em alta frequência e níveis nas amostras de biofilme subgingival desses pacientes (*Figuras 3A e 4A, Figures 4 e 6* do artigo). Durante anos, o patógeno *A. actinomycetemcomitans* foi associado com formas agressivas de doença periodontal, mais especificamente com a PAL (Asikainen et al. 1986, Albandar et al. 1997, Lopez et al. 1996, Tinoco et al. 1997, Fine et al. 2007, Haubek et al. 2008). Em particular, o clone altamente leucotóxico JP2 foi identificado como fator de risco para perda de inserção periodontal (Haubek et al. 2008). No entanto, nos últimos anos estudos microbiológicos, muitos realizados em populações latino-americanas, têm mostrado uma forte associação de outros patógenos, além do *A. actinomycetemcomitans* com a PA. Dentre essas espécies estão patógenos dos complexos laranja e vermelho, comumente associados com a PC (Lee et al. 2003, Takeuchi et al. 2003, Gajardo et al. 2005, Ximenez-Fyvie et al. 2006, Mayorga-Fayad et al. 2007, Botero et al. 2007, Faveri et al. 2008, 2009). Estes dados juntamente com os achados do presente estudo sugerem que patógenos distintos podem predominar na PA em diferentes grupos populacionais.

Geralmente, estudos da microbiota periodontal limitam-se à avaliação de um número pequeno de microorganismos, visto que as dificuldades técnicas são uma limitação evidente. Logo, muita informação relacionada ao perfil microbiológico e ao impacto de diferentes terapias nessa microbiota é incompleta. Considerando-se a grande diversidade microbiana que existe na microbiota subgingival (Paster et al. 2001), parece razoável que outras espécies bacterianas não comumente relacionadas com doença periodontal sejam também investigadas nesses estudos. Assim, na presente investigação, além das espécies orais, nós estendemos o número de microorganismos avaliados, incluindo mais 38 espécies patogênicas. Dentre essas, enterobactérias, *P. tanneriae*, *F. alocis*, *N. gonorrhoea*, *E. saprophyticum*, *P. aeruginosa*, *D. pneumosintes*, *C. albicans* e *Neisseria* spp. foram detectadas em >40% das amostras em níveis elevados (>3x10⁵ células) (Figuras 5A e 6A, *Figures 5 e 7* do artigo). Muitas dessas espécies são patógenos de importância médica associados a várias doenças em humanos, bem como infecções hospitalares, infecções por biofilme e multi-resistência a antimicrobianos (Costerton et al. 1999, Richards et al. 2000, Gootz 2010). A presença frequente desses patógenos no biofilme periodontal tem implicações médicas importantes, pois espécies colonizando biofilmes são mais resistentes ao tratamento com antimicrobianos. Por exemplo, alguns autores demonstraram que após o tratamento para infecção com *H. pylori*, esse microorganismo foi erradicado da mucosa gástrica da maioria dos pacientes, porém persistiu no biofilme dental (Umeda et al. 2003, Gebara et al. 2006). O papel dessas espécies “não-periodontais” na etiopatogenia da doença periodontal ainda não está completamente elucidado. No entanto, alguns autores sugerem que espécies como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *A. baumannii*, *H. pylori*, *Neisseria* spp., enterococos, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Candida* spp podem participar ativamente da destruição periodontal por possuírem fatores de virulência compatíveis com destruição tecidual e óssea, e processos inflamatórios crônicos (Slots et al. 1988, 1990, Contreras et al. 2000, Colombo et al. 2002, 2009, Souto et al. 2006, Botero et al. 2007, Ferraro et al. 2007, Fritschi et al. 2008, Souto & Colombo 2008a, 2008b, Ardila et al. 2010). Por exemplo, nós observamos que *S. aureus* apresentou uma forte correlação com presença de supuração (Tabela 5A). Recentemente, Fritschi et al. (2008) reportou uma forte associação de *S. aureus* com PA, utilizando esse microorganismo como forma de diferenciar esses pacientes daqueles com PC. Essa complexidade da microbiota periodontal reforça o conceito de uma microbiota dinâmica, na qual certamente ocorrem inúmeras inter-relações, sejam estas relações sinérgicas ou antagonistas (Kolenbrander

et al. 2006). Andersen et al. (1998) reportaram que *H. pylori* e *F. nucleatum* coagregam no biofilme, enquanto *Fusobacterium periodonticum* coagrega com *P. gingivalis* (Ishihara et al. 1997). Em outro estudo, uma substância denominada *new-antipseudomonal substance*, derivada de *S. sanguinis*, mostrou ação bactericida contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Watanabe et al. 2009). Um dado surpreendente em nosso estudo foi que 78% e 87% dos indivíduos avaliados no período pré-terapia apresentaram uma relação inversa entre a prevalência de *S. sanguinis* e *A. baumannii*, e *S. sanguinis* e *P. aeruginosa*, respectivamente (Figura 6A). Outro dado interessante foi que aqueles pacientes com as mais baixas frequências dos patógenos *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* apresentavam as maiores prevalências de *D. pneumosintes* e vice-versa (Figura 7A).

A dificuldade em se estabelecer um diagnóstico preciso das PAs obviamente tem uma grande repercussão no tratamento dessas doenças. Apesar de não haver um protocolo terapêutico definido para o tratamento de PAG, estudos sugerem que esses pacientes se beneficiariam do uso de antimicrobianos sistêmicos, principalmente AMX e MET (Herrera et al. 2002, Haffajee et al. 2003). Assim, o presente estudo se propôs a avaliar o efeito coadjuvante da administração sistêmica de AMX e MET, associada à terapia periodontal não-cirúrgica melhorada suplementada com CHX sobre um grande número de espécies da microbiota subgingival de indivíduos com PAG, por um período de 6 meses após tratamento. A terapia melhorada combinou alguns dos princípios aplicados na terapia denominada *full-mouth disinfection*, seguida da instrumentação mecânica convencional de RAR em sessões semanais. A justificativa para esse protocolo terapêutico era de que uma instrumentação mecânica intensa de todos os sítios periodontais, associada ao controle da carga oral bacteriana com CHX forneceria uma melhora clínica e microbiológica significativa, sem haver a necessidade do uso de antibióticos sistêmicos. Já está bem estabelecido que os melhores resultados terapêuticos periodontais ocorram naqueles indivíduos com os melhores padrões de higiene oral (Axelsson et al. 1991, Westfelt et al. 1998, Ximenez-Fyvie et al. 2000, Checchi et al. 2002). Além disso, a CHX, quando associada à higiene bucal apresenta maiores benefícios no controle de biofilme supragengival e na inflamação marginal do que somente a higiene bucal com instrumentos mecânicos (van Strydonck et al. 2008). Recentemente, ensaios clínicos demonstraram que a CHX na forma de bochecho a 0,12% apresentou um efeito benéfico adicional nos parâmetros clínicos e microbiológicos de indivíduos com PC aos 2 e 6 meses após terapia (Feres et al. 2009,

Faveri et al. 2006). Assim, o uso da CHX como auxiliar no controle do biofilme supragengival é justificado para prevenir que patógenos do biofilme supragengival re-colonizem o ambiente subgengival (Ximenez-Fyvie et al. 2000).

Em relação aos resultados clínicos, observou-se que ambos os protocolos terapêuticos foram eficientes em reduzir por até 6 meses os parâmetros de destruição periodontal e inflamação, especificamente as “médias” de PS, NCI, SAS, IPV e ISG. Por outro lado, quando a proporção de sítios periodontais que melhoraram ou pioraram após tratamento foram comparados entre os grupos, observou-se que o grupo que recebeu os antibióticos sistêmicos apresentou uma prevalência significativamente maior de sítios que responderam ao tratamento, ou seja, “fecharam” as bolsas periodontais, do que o grupo placebo (*Figure 2* do artigo). Essa análise foi realizada apenas nos sítios selecionados para posteriores correlações com os dados microbiológicos. Esses dados estão de acordo com outros estudos que sugerem um efeito clínico benéfico, porém limitado, nas características clínicas periodontais (Guerrero et al. 2005, Xajigeorgiou et al. 2006, Yek et al. 2010). Além disso, essa melhora é bem mais significativa nos primeiros 3 meses de avaliação após o tratamento e em sítios que com PS moderada no exame pré-terapia (Badersten et al. 1984, Pavicic et al. 1994a, Colombo et al. 2005, Haffajee et al. 2006, Kaner et al. 2007, Mestnik et al. 2010).

Em termos microbiológicos, o sucesso da terapia periodontal pode ser traduzido na redução prolongada da prevalência, níveis e proporções de patógenos periodontais, concomitantemente com o aumento de espécies compatíveis com saúde periodontal (Teles et al. 2006). Porém, qual seria o alvo da terapia em pacientes com baixas frequências de patógenos periodontais clássicos? Ao analisarmos a resposta terapêutica de pacientes com baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, observamos uma modesta diminuição desses patógenos aos 3 meses, seguida do retorno aos 6 meses para os níveis iniciais (dados não apresentados). Possivelmente, pacientes com altas proporções desses periodontopatógenos parecem se beneficiar mais do tratamento com AMX+MET do que pacientes com baixos níveis desses microorganismos (Haffajee et al. 1996, Haffajee et al. 1997a,b). Logo, mesmo empregando-se critérios clínicos bem definidos para o diagnóstico de PAG, a variabilidade microbiológica, bem como a variabilidade na resposta à infecção e à terapia enfatizam a importância da análise laboratorial previamente à instituição do tratamento, principalmente quando do uso de antimicrobianos sistêmicos (Slots & Ting 2002, van Winkelhoff & Winkel 2005). Na prática clínica, porém, essas análises

laboratoriais nunca são realizadas, o que normalmente leva o profissional a uma escolha empírica de antimicrobianos (Shaddox & Walker 2009).

Apesar de toda a variabilidade microbiológica dessa população, nossos dados demonstraram que ambos os grupos terapêuticos foram capazes de reduzir significativamente a prevalência e os níveis de vários patógenos periodontais como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*. O mesmo ocorreu com microorganismos do complexo laranja, incluindo *C. rectus*, *F. nuc. nucleatum*, *F. nuc. vincentii*, *P. micra*, *P. nigrescens* e *P. intermedia*. Algumas espécies benéficas, como *S. gordonii*, *C. sputigena*, *A. naeslundii* II e *R. dentocariosa* também aumentaram suas prevalência e/ou níveis. Esse impacto das terapias foi maior nos níveis bacterianos. Outros estudos já demonstraram que a prevalência de espécies periodontais é menos afetada pelo tratamento periodontal mecânico com ou sem antimicrobianos (Haffajee et al. 2006, Teles et al. 2006). Esse evento pode refletir a característica de “memória” da microbiota oral que tende a recolonizar rapidamente os diferentes nichos ecológicos da cavidade oral após qualquer impacto (p. ex., terapias) nesse ecossistema (Socransky & Haffajee 2005). Podemos notar que, apesar da redução significativa em frequência e níveis de patógenos periodontais aos 6 meses nos dois grupos terapêuticos, esses microorganismos ainda eram detectados em proporções relativamente altas (*Figure 4* do artigo). Estudos mais antigos de intervenção com avaliação microbiológica focavam principalmente na eliminação de patógenos periodontais como parâmetro de sucesso terapêutico (van Winkelhoff et al. 1992, Pavicic et al. 1994b Winkel et al. 2001). Essa necessidade de se eliminar patógenos justificaria o uso de antimicrobianos sistêmicos como forma de alcançar sítios que a terapia mecânica somente não teria acesso. Já a literatura mais recente reforça a idéia de que, independentemente da terapia empregada (incluindo a combinação de instrumentação mecânica, CHX e antibióticos sistêmicos), espécies adaptadas aos *habitats* orais são dificilmente “erradicadas” da cavidade oral (Fujise et al. 2006, Johnson et al. 2008). Essas bactérias parecem permanecer nos tecidos periodontais após o tratamento, podendo assim colonizar novamente os sítios tratados (Johnson et al. 2008). Um trabalho recente de van Assche et al. (2009), por exemplo, reportou a presença de patógenos periodontais nas mucosas orais e língua de pacientes submetidos à extração total dos dentes. Outros autores têm demonstrado que a estabilidade periodontal pode ser alcançada após tratamento sem necessariamente a eliminação de patógenos periodontais (Cugini et al. 2000; Teles et al. 2006). Por outro lado, como existe uma tendência da microbiota periodontal a retornar ao que era antes

do tratamento, há a necessidade de que terapias de manutenção bem conduzidas sejam sempre implementadas. A melhor terapia para cada indivíduo é aquela que gera uma comunidade clímax estável e oferece estabilidade periodontal a longo prazo. Ou seja, uma terapia capaz de reduzir os periodontopatógenos e manter uma microbiota compatível com o hospedeiro (Socransky & Haffajee 2005, Teles et al. 2006).

Apenas dois estudos publicados avaliaram o efeito da AMX+MET na microbiota subgengival de PAG por 6 meses. Yek et al. (2010) avaliaram o efeito da terapia periodontal de RAR associada ou não à AMX+MET em pacientes turcos com PAG. Diferentemente dos pacientes da nossa amostra, os indivíduos com PAG apresentavam baixa prevalência de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, sendo este último não detectado em um dos grupos no início do estudo. Ainda assim, ambas as terapias resultaram na redução da prevalência de patógenos do complexo vermelho. Esse efeito foi mais acentuado para *T. forsythia*, a qual não foi detectada no grupo tratado com AMX+MET. Xajigeorgiou et al. (2006) compararam 4 diferentes terapias (RAR, AMX+MET, MET e doxiciclina) e observaram uma redução significativa nos níveis de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* até 6 meses pós-terapia no grupo que recebeu AMX+MET. Esses autores concluíram que esses antibióticos foram eficazes em reduzir os níveis, mas não a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* ao longo do tempo.

No presente estudo, as maiores alterações na microbiota periodontal também foram observadas aos 3 meses após tratamento, como já demonstrado por outros (Cugini et al. 2000, Colombo et al. 2005, Teles et al. 2006, Mestnik et al. 2010). Em um estudo clínico randomizado e controlado com placebo, Mestnik e colaboradores avaliaram o efeito da AMX+MET em um grande número de espécies orais. Esses autores observaram que o grupo que recebeu os antibióticos apresentou uma maior redução nos níveis e proporções de patógenos periodontais, principalmente do complexo laranja, do que o grupo placebo. Além disso, os níveis de *A. actinomycetemcomitans* estavam significativamente mais baixos no grupo teste após tratamento. Por outro lado, esses dados refletem os efeitos a curto prazo (3 meses) das terapias na microbiota subgengival. É esperado que pacientes com doença avançada e sem tratamento, quando tratados tenham uma melhora significativa na primeira reavaliação. O grande desafio é saber se a terapia adjunta com antibióticos sistêmicos irá proporcionar estabilidade clínica e microbiológica por longos períodos de tempo.

O impacto das terapias aqui empregadas nas espécies não relacionadas à PAG foi bastante variado. Ao contrário dos patógenos periodontais, essas espécies aumentaram, na sua maioria, em prevalência e níveis após a terapia, principalmente no grupo controle. O antibiótico mostrou-se um pouco mais eficaz em manter os níveis dessas espécies baixos aos 6 meses. Espécies multi-resistentes a antimicrobianos, como *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, aumentaram em níveis aos 3 meses, mas reduziram a valores iniciais aos 6 meses. Espécies comumente suscetíveis ao metronidazol, como *B. fragilis*, *C. difficile* e *H. pylori* apresentaram uma tendência a diminuir em níveis no grupo teste. *C. albicans*, *B. fragilis*, *F. necrophorum* e *Neisseria* spp. aumentaram aos 3 meses, mas reduziram a valores semelhantes à pré-terapia aos 6 meses (Figure 5 do artigo). É provável que essas espécies patogênicas desenvolvam relações sinérgicas ou antagonistas com bactérias orais, o que justificaria o seu aumento, em um momento em que os patógenos periodontais foram reduzidos pelas terapias propostas. Em particular, a espécie *D. pneumosintes* apresentou níveis bem mais elevados aos 6 meses em ambos os grupos terapêuticos. Além disso, níveis e frequências elevadas de *D. pneumosintes* foram observados inicialmente nos sítios que perderam inserção em relação aos que ganharam em ambos os grupos. Esse anaeróbio estrito é uma bactéria extremamente fastidiosa e de difícil cultivo e identificação fenotípica. Talvez essas sejam algumas das razões pelas quais esse microrganismo tenha sido tão negligenciado anteriormente. Estudos mais recentes têm associado à presença dessa espécie com doença periodontal (Contreras et al. 2000, Gomes et al. 2006, Ferraro et al. 2007, Colombo et al. 2009). Em 2009, Colombo e colaboradores observaram uma alta prevalência de *D. pneumosintes* em indivíduos refratários à terapia periodontal mecânica associada à AMX+MET (Colombo et al. 2009). Além disso, sítios com altos níveis de *P. nigrescens*, *P. melaninogenica* e *T. socranskii* não responderam bem ao tratamento com AMX + MET (Figure 9 do artigo). No grupo controle, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *F. necrophorum*, *P. tannerea* e *E. saphenum* também foram associados ao fracasso do tratamento. Estes dados indicam que, além dos clássicos patógenos periodontais já conhecidos, outras espécies podem ter um papel importante na etiopatogenia da PAG, bem como no monitoramento da resposta terapêutica.

Apesar das evidências indicarem que antibióticos sistêmicos associados à terapia periodontal mecânica promovem efeitos benéficos adicionais aos pacientes com PAG, a escolha da terapia periodontal correta para esses indivíduos continua sendo um desafio. Questionamentos como qual antimicrobiano prescrever, qual a dose correta, em que

momento deve ser administrado e exatamente para quais pacientes (ou perfis microbiológicos), entre outros, permanecem presentes no dia-a-dia da clínica periodontal. A escolha dos antibióticos sistêmicos e a dosagem instituída no presente estudo baseou-se em investigações prévias demonstrando o seu efeito sinérgico sobre o *A. actinomycetemcomitans* e maior espectro de ação (Pavicic et al. 1991, 1994a, 1994b). Além disso, os antibióticos foram administrados logo após o debridamento subgingival completo (Figura 1). Levando-se em conta as características do biofilme dental (Marsh 2005, Socransky & Haffajee 2002) pode-se deduzir que o uso de antimicrobianos será mais eficaz quando o biofilme estiver desorganizado. De fato, alguns autores tem demonstrado que é melhor realizar um debridamento em um curto período de tempo e imediatamente prescrever o antimicrobiano (Herrera et al. 2008). Outros indicaram que pacientes com PA apresentam benefícios clínicos adicionais em bolsas periodontais profundas quando AMX+ MET são administrados logo após as sessões de raspagem, e não no período de cicatrização (Kaner et al. 2007b). A questão da presença de uma microbiota cada vez mais resistente também é outra questão a ser debatida em relação ao emprego de antimicrobianos. A emergência de cepas com resistência a vários antimicrobianos tem sido motivo de preocupação durante anos (Kunin 1993). Dentre os fenômenos associados a isso, está o uso abusivo e indiscriminado de drogas antimicrobianas (Shlaes et al. 1997), prática muito comum na população brasileira (Berquo et al. 2004). É possível que mudanças em relação a susceptibilidade de patógenos periodontais à AMX e MET passe a ser um evento comum (Aldridge et al. 2001, Eick et al. 2004). Por outro lado, a CHX não parece causar resistência microbiana ou surgimento de microorganismos oportunistas (Løe 2000). Isso pode ser resultado do seu amplo espectro de ação, ao contrário dos antibióticos sistêmicos que possuem espectros mais limitados (Sreenivasan & Gaffar 2002). Esses dados são relevantes na escolha de terapias para o tratamento de pacientes com periodontite agressiva. De acordo com o presente estudo, o uso de uma terapia melhorada com CHX propiciou bons resultados clínicos e microbiológicos, sem alterações significativas nos padrões de susceptibilidade do biofilme subgingival desses pacientes às drogas aqui administradas. Em um estudo paralelo, estamos avaliando as concentrações inibitórias mínimas (CIM) das amostras de biofilme subgingival desses indivíduos para os três antimicrobianos usados antes e após as terapias. No momento, pudemos observar um aumento significativo aos 3 meses, mas transitório, na CIM à AMX no grupo teste. Nenhuma

alteração marcante foi observada para MET ou CHX nos dois grupos (dados não apresentados).

Dados microbiológicos sobre o efeito de terapias com antimicrobianos na PAG são limitados e muitas vezes confusos. Em relação ao impacto dessas terapias em outros segmentos da microbiota, pode-se dizer que são raros. A dificuldade em se comparar os dados disponíveis na literatura resulta de diferenças metodológicas marcantes no desenho experimental, no modo como as coletas microbiológicas são realizadas, no número de sítios coletados, na técnica de identificação microbiológica utilizada, no número de espécies avaliadas, na maneira como os dados são expressos e como são analisados (Teles et al. 2006). O presente trabalho foi conduzido de acordo com as normas do CONSORT (Moher et al. 2001) para um estudo clínico randomizado controlado por placebo, oferecendo desse modo uma boa qualidade metodológica. Para a identificação microbiológica, a técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* foi utilizada. Esta técnica tem se mostrado eficiente para analisar concomitantemente um grande número de amostras e propiciar uma ampla visão do perfil microbiológico em termos de frequência e níveis de microorganismos (Socransky & Haffajee 2005). Tendo-se o conhecimento da importância de não somente detectar o microorganismo, mas também quantificar patógenos periodontais (Haffajee & Socransky 1994), optou-se pela utilização de um método semi-quantitativo, não apenas para a determinação de prevalência. Também foram investigadas várias espécies bacterianas, incluindo patógenos de importância médica, até então não relacionados à PA. Estudos têm indicado a necessidade de se ampliar o número de bactérias investigadas nos estudos da microbiota periodontal, mais especificamente na PA (Paster et al. 2001, 2006, Faveri et al. 2008; Fritschi et al. 2008, Metnisk et al. 2009, Colombo et al. 2009). Com isso, será possível esboçar perfis microbiológicos mais completos dos indivíduos com PAG, assim como os efeitos das terapias propostas sobre esses perfis.

Devido à complexidade da microbiota periodontal e sua variabilidade de um sítio para outro, um número razoável de sítios periodontais deve ser coletado para se obter dados representativos. Por exemplo, um número elevado de amostras é necessário para a detecção de espécies menos prevalentes, como o *A. actinomycetemcomitans* (Haffajee & Socransky 1992). Assim, alguns estudos não reportam a presença desse importante patógeno devido a um número pequeno de sítios coletados (Yek et al. 2010). Além disso, estudos que analisam somente 1-4 sítios podem trazer dados inconclusivos (Haffajee & Socransky 1992). Devido a questões de praticidade e custos, optamos nesse trabalho por coletar 14 sítios com condições clínicas variadas. Para a coleta, foram utilizadas curetas estéreis individuais para cada sítio. Teles et al. (2008) demonstraram uma boa reprodutibilidade desse método de coleta de biofilme subgengival. Também consideramos esse método vantajoso, pois permite coletar teoricamente todo o biofilme da bolsa periodontal para processamento, sem ampliações ou diluições como ocorre em outros métodos (Socransky et al. 2004). Todas as técnicas possuem pontos fortes e fracos. Em relação à técnica do checkerboard, uma preocupação na interpretação dos dados seria a respeito da sensibilidade e especificidade das sondas de DNA empregadas. A sensibilidade do ensaio foi ajustada para 10^4 células de cada espécie através do ajuste da concentração de cada sonda na solução de hibridização. A especificidade foi examinada pela hibridização de cada sonda entre si e com outras espécies distintas. Em relação à maneira como os dados foram apresentados, cuidados foram mantidos durante a análise dos mesmos. A presença e níveis de cada espécie foram avaliados em cada sítio, as médias computadas para cada paciente e para cada grupo. Além disso, optou-se por utilizar na análise estatística o Modelo Linear Geral para Medições Repetidas (GLM), para assim comparar diferenças significativas entre os grupos ao longo do tempo. Essa análise corrige para diferenças nas variâncias entre os grupos. A entrada dos dados clínicos e microbiológicos no Banco de Dados foi constantemente checada por um investigador sênior (A.P.V.C.) durante todo o estudo. Todas essas condutas realizadas foram de grande importância para se garantir a fidelidade dos dados apresentados.

Em resumo, os dados do presente estudo sugerem um efeito clínico adicional da administração sistêmica da AMX+MET associada à terapia periodontal não-cirúrgica melhorada. Esse efeito adicional foi observado em relação à redução na média de PS em bolsas inicialmente com PS moderada, bem como no número de bolsas residuais aos 6 meses após o tratamento. A terapia periodontal não-cirúrgica melhorada associada a um

meticuloso controle de higiene bucal com CHX também mostrou benefícios clínicos significativos no tratamento de pacientes com PAG. O monitoramento desses pacientes por pelo menos 12 meses nos permitirá avaliar com maior robustez a estabilidade clínica nos dois grupos terapêuticos a fim de se obter conclusões mais definitivas. Por outro lado, ambas as terapias foram eficientes na redução de patógenos periodontais. Logo, pode-se dizer que a utilização da CHX associada ao tratamento não-cirúrgico pode ser uma alternativa eficaz e de bom custo benefício para essa população. No entanto, é importante se destacar que espécies não comumente associadas com PAG foram menos afetadas por ambas as terapias. Desse modo, estudo longitudinais que avaliem o papel dessas espécies na PAG e sua resposta a diferentes protocolos terapêuticos são necessários para a determinação de terapias menos empíricas e adequadas aos diferentes perfis microbiológicos.

6. CONCLUSÃO

- A administração sistêmica da AMX+MET resulta em benefício clínico no tratamento da PAG até 6 meses após a terapia. Entretanto, esses antibióticos não têm efeito adjunto na supressão da microbiota periodontal patogênica, bem como na prevalência e níveis de espécies não comumente relacionadas com PA;
- Espécies orais, tais como *F. nuc nucleatum*, *P. micra*, *P. gingivalis*, *S. anginosus*, *C. ochracea*, *A. gerencseriae*, *V. parvula*, *P. nigrescens*, *S. noxia*, *T. socranskii*, *C. concisus*, e *E. nodatum* apresentam correlações significativas com parâmetros clínicos periodontais e demográficos da amostra estudada;
- Espécies não relacionadas com a etiopatogenia das PAs, incluindo *P. tanneriae*, *C. albicans*, *O. uli*, *E. saphenum* também apresentam fortes correlações com parâmetros periodontais e demográficos;
- A microbiota subgengival de indivíduos com PAG apresenta uma grande variabilidade. Apesar disso, altas prevalências e níveis de patógenos periodontais, assim como patógenos de importância médica, não comumente relacionados à PAG, são observadas;
- Altos níveis de espécies não consideradas membros da microbiota periodontal e alguns patógenos periodontais estão associados à perda de inserção após tratamento. O papel dessas espécies na patogenia e tratamento das PAGs deve ser mais investigado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAP (2004). Position Paper: Systemic antibiotics in periodontics. *Journal of Periodontology* **75**, 1553-1565.
- Albandar, J. M., Brown, L. J. & Loe, H. (1997). Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology* **68**, 973-981.
- Albandar, J. M. & Rams, T. E. (2002). Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontology 2000* **29**, 207-222.
- Albandar, J. M. & Tinoco, E. M. (2002). Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontology 2000* **29**, 153-176.
- Aldridge, K. E., Ashcraft, D., Cambre, K., Pierson, C. L., Jenkins, S. G. & Rosenblatt, J. E. (2001). Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1238-1243.
- Alfant, B., Shaddox, L. M., Tobler, J., Magnusson, I., Aukhil, I. & Walker, C. (2008). Matrix metalloproteinase levels in children with aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **79**, 819-826.
- Apatzidou, D.A. & Kinane D.F. (2004). Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. I. Clinical findings. *Journal of Clinical Periodontology* **31**,132-140.
- Apatzidou, D. A. (2006). One stage full-mouth disinfection--treatment of choice? *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 942-943.
- Ardila, C.M., Fernandez, N. and Guzman, I.C. (2010).Antimicrobial susceptibility of moxifloxacin against gram-negative enteric rods from colombian patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **81**, 292-299.
- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.
- Asikainen, S., Jousimies-Somer, H., Kanervo, A. & Saxen, L. (1986) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and clinical periodontal status in Finnish juvenile periodontitis patients. *Journal of Periodontology* **57**, 91-93.

- Asikainen, S., Alaluusua, S. & Saxen, L. (1991). Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *Journal of Periodontology* **62**, 203-206.
- Atieh, M. A. (2008). Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *Journal of Periodontology* **79**, 1620-1629.
- Axelsson, P., Lindhe, J. & Nystrom, B. (1991). On the prevention of caries and periodontal disease. Results of a 15-year longitudinal study in adults. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 182-189.
- Badersten, A., Nilveus, R. & Egelberg, J. (1984). Effect on non surgical periodontal therapy. II. Severly advanced periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **11**, 63-76.
- Beikler, T., Prior, K., Ehmke, B. & Flemmig, T. F. (2004). Specific antibiotics in the treatment of periodontitis--a proposed strategy. *Journal of Periodontology* **75**, 169-175.
- Berglundh, T., Krok, L., Liljenberg, B., Westfelt, E., Serino, G. & Lindhe, J. (1998). The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 354-362.
- Bernal, L. A., Guillot, E., Paquet, C. & Mouton, C. (1998). beta-Lactamase-producing strains in the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiology and Immunology* **13**, 36-40.
- Berquo, L. S., Barros, A. J., Lima, R. C. & Bertoldi, A. D. (2004). [Use of antimicrobial drugs in an urban population]. *Revista de Saúde Pública* **38**, 239-246.
- Bollen, C. M., Vandekerckhove, B. N., Papaioannou, W., Van Eldere, J. & Quirynen, M. (1996). Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. A pilot study: long-term microbiological observations. *Journal of Clinical Periodontology* **23**, 960-970.
- Bollen, C. M., Mongardini, C., Papaioannou, W., Van Steenberghe, D. & Quirynen, M. (1998). The effect of a one-stage full-mouth disinfection on different intra-oral niches. Clinical and microbiological observations. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 56-66.

- Botero, J. E., Contreras, A., Lafaurie, G., Jaramillo, A., Betancourt, M. & Arce, R. M. (2007). Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *Journal of Periodontology* **78**, 696-704.
- Brett, P. M., Zygianni, P., Griffiths, G. S., Tomaz, M., Parkar, M., D'Aiuto, F. & Tonetti, M. (2005). Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *Journal of Dental Research* **84**, 1149-1153.
- Brogan, J. M., Lally, E. T., Poulsen, K., Kilian, M. & Demuth, D. R. (1994). Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infection and Immunity* **62**, 501-508.
- Buchmann, R., Conrads, G. & Sculean, A. (2010). Short-term effects of systemic antibiotics during periodontal healing. *Quintessence International* **41**, 303-312.
- Cecchi, L., Montecchi, M., Gatto, M. R. & Trombelli, L. (2002). Retrospective study of tooth loss in 92 treated periodontal patients. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 651-656.
- Ciancio, S. G. (2002). Systemic medications: clinical significance in periodontics. *Journal of Clinical Periodontology* **29 Suppl 2**, 17-21.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A. (2009). Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *J Periodontol* **80**, 364-371.
- Colombo, A. P., Eftimiadi, C., Haffajee, A. D., Cugini, M. A. & Socransky, S. S. (1998a). Serum IgG2 level, Gm(23) allotype and FcγRIIa and FcγRIIIb receptors in refractory periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 465-474.
- Colombo, A. P., Haffajee, A. D., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Smith, C. M., Cugini, M. A. & Socransky, S. S. (1998b). Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 169-180.
- Colombo, A. P., Sakellari, D., Haffajee, A. D., Tanner, A., Cugini, M. A. & Socransky, S. S. (1998c). Serum antibodies reacting with subgingival species in refractory periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 596-604.
- Colombo, A. P., Haffajee, A. D., Smith, C. M., Cugini, M. A. & Socransky, S. S. (1999). Discrimination of refractory periodontitis subjects using clinical and

- laboratory parameters alone and in combination. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 569-576.
- Colombo, A. P., Teles, R. P., Torres, M. C., Souto, R., Rosalem, W. J., Mendes, M. C. & Uzeda, M. (2002). Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **73**, 360-369.
- Colombo, A. P., Teles, R. P., Torres, M. C., Rosalem, W., Mendes, M. C., Souto, R. M. & Uzeda, M. (2005). Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *Journal of Periodontology* **76**, 778-784.
- Colombo, A.P., Boches, S.K., Cotton, S.L., Goodson, J.M., Kent, R., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Hasturk, H., Van Dyke, T.E., Dewhirst, F. and Paster, B.J. (2009) Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *Journal of Periodontology* **80**, 1421-1432.
- Contreras, A., Doan, N., Chen, C., Rusitanonta, T., Flynn, M.J. and Slots, J. (2000) Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **15**, 269-272.
- Corraini, P., Baelum, V., Pannuti, C.M., Pustiglioni, A.N., Romito, G.A. and Pustiglioni, F.E. (2008a) Periodontal attachment loss in an untreated isolated population of Brazil. *Journal of Periodontology* **79**, 610-620.
- Corraini, P., Baelum, V., Pannuti, C.M., Pustiglioni, A.N., Romito, G.A. and Pustiglioni, F.E. (2008b) Risk indicators for increased probing depth in an isolated population in Brazil. *Journal of Periodontology* **79**, 1726-1734.
- Cortelli, J. R., Cortelli, S. C., Pallos, D. & Jorge, A. O. (2002). Prevalence of aggressive periodontitis in adolescents and young adults from Vale do Paraiba. *Pesquisa Odontológica Brasileira* **16**, 163-168.
- Cortelli, S. C., Jorge, A. O., Cortelli, J. R., Jordan, S. F. & Haraszthy, V. I. (2003). Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. *Pesquisa Odontológica Brasileira* **17**, 183-188.
- Cortelli, J. R., Cortelli, S. C., Jordan, S., Haraszthy, V. I. & Zambon, J. J. (2005). Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 860-866.

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**, 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322
- Cugini, M.A., Haffajee, A.D., Smith, C., Kent, R.L., Jr. and Socransky, S.S. (2000) The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 30-36.
- Cunha-Cruz, J., Hujoel, P. P. & Kressin, N. R. (2007). Oral health-related quality of life of periodontal patients. *Journal of Periodontal Research* **42**, 169-176.
- Danser, M. M., van Winkelhoff, A. J., de Graaff, J., Loos, B. G. & van der Velden, U. (1994). Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 484-489.
- de Souza, R. C. & Colombo, A. P. (2006). Distribution of FcgammaRIIa and FcgammaRIIb genotypes in patients with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **77**, 1120-1128.
- Diniz, C. G., Farias, L. M., Carvalho, M. A., Rocha, E. R. & Smith, C. J. (2004). Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 100-108.
- Ehmke, B., Moter, A., Beikler, T., Milian, E. & Flemmig, T. F. (2005). Adjunctive antimicrobial therapy of periodontitis: long-term effects on disease progression and oral colonization. *Journal of Periodontology* **76**, 749-759.
- Eick, S., Seltmann, T. & Pfister, W. (2004). Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm - an in vitro study. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 376-383.
- Faveri, M., Gursky, L. C., Feres, M., Shibli, J. A., Salvador, S. L. & de Figueiredo, L. C. (2006). Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 819-828.
- Faveri, M., Mayer, M. P., Feres, M., de Figueiredo, L. C., Dewhirst, F. E. & Paster, B. J. (2008). Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology* **23**, 112-118.

- Faveri, M., Figueiredo, L.C., Duarte, P.M., Mestnik, M.J., Mayer, M.P. and Feres, M. (2009) Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 739-749.
- Feres, M., Gursky, L.C., Faveri, M., Tsuzuki, C.O. and Figueiredo, L.C. (2009) Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 857-867.
- Ferraro, C.T., Gornic, C., Barbosa, A.S., Peixoto, R.J. and Colombo, A.P. (2007) Detection of *Dialister pneumosintes* in the subgingival biofilm of subjects with periodontal disease. *Anaerobe* **13**, 244-248.
- Fine, D. H., Markowitz, K., Furgang, D., Fairlie, K., Ferrandiz, J., Nasri, C., McKiernan, M. & Gunsolley, J. (2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 3859-3869.
- Flemmig, T. F., Milian, E., Karch, H. & Klaiber, B. (1998a). Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 380-387.
- Flemmig, T. F., Milian, E., Kopp, C., Karch, H. & Klaiber, B. (1998b). Differential effects of systemic metronidazole and amoxicillin on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in intraoral habitats. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 1-10.
- Fritschi, B. Z., Albert-Kiszely, A. & Persson, G. R. (2008). *Staphylococcus aureus* and other bacteria in untreated periodontitis. *Journal of Dental Research* **87**, 589-593.
- Fujise, O., Miura, M., Hamachi, T. & Maeda, K. (2006). Risk of *Porphyromonas gingivalis* recolonization during the early period of periodontal maintenance in initially severe periodontitis sites. *Journal of Periodontology* **77**, 1333-1339.
- Gajardo, M., Silva, N., Gomez, L., Leon, R., Parra, B., Contreras, A. & Gamonal, J. (2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *Journal of Periodontology* **76**, 289-294.
- Gjermeo, P., Rosing, C. K., Susin, C. & Oppermann, R. (2002). Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontology 2000*, **29**, 70-78.

- Gebara, E. C. E., Faria, C. M., Pannuti, C., Chehter, L., Mayer, M. P. A. & Lima, L. A. P. A. (2006) Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 329-333.
- Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, et al. (2006). Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *Journal of Periodontology* **77**:1483-1490.
- Gootz, T. D. (2010) The global problem of antibiotic resistance. *Critical Reviews in Immunology* **30**, 79-93.
- Guerrero, A., Griffiths, G. S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D. R., Laurell, L. & Tonetti, M. S. (2005). Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1096-1107.
- Guerrero, A., Echeverria, J. J. & Tonetti, M. S. (2007). Incomplete adherence to an adjunctive systemic antibiotic regimen decreases clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients: a pilot retrospective study. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 897-902.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1992). Effect of sampling strategy on the false-negative rate for detection of selected subgingival species. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 57-59.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, **5**, 78-111.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Dibart, S. & Kent, R. L., Jr. (1996) Response to periodontal therapy in patients with high or low levels of *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *B. forsythus*. *Journal of Clinical Periodontology* **23**, 336-345.
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1997a). Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 767-776.
- Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R.L., Jr. and Socransky, S.S. (1997b) The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 324-334.

- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003). Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Annals of Periodontology* **8**, 115-181.
- Haffajee, A. D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N. J. & Socransky, S. S. (2004). Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 996-1002.
- Haffajee, A. D., Teles, R. P. & Socransky, S. S. (2006) The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontology 2000* **42**, 219–258.
- Haraszthy, V. I., Hariharan, G., Tinoco, E. M., Cortelli, J. R., Lally, E. T., Davis, E. & Zambon, J. J. (2000). Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology* **71**, 912-922.
- Haubek, D., Ennibi, O. K., Poulsen, K., Benzarti, N. & Baelum, V. (2004). The highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and progression of periodontal attachment loss. *Journal of Dental Research* **83**, 767-770.
- Haubek, D., Ennibi, O. K., Poulsen, K., Vaeth, M., Poulsen, S. & Kilian, M. (2008). Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* **371**, 237-242.
- Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldan, S. (2002). A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **29 Suppl 3**, 136-159.
- Herrera, D., Alonso, B., Leon, R., Roldan, S. and Sanz, M. (2008) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 45-66.
- Ishihara, K., Miura, T., Kimikuza, R. (1997) Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth. *FEMS Microbiology Letters* **152**, 355-361.
- Jardim, E. G. J., Bosco, J. M. D., Lopes, M. A., Landucci, L. F., Jardim, E. C. G. & Carneiro, S. R. S. (2006). Occurrence of *A.actinomycetemcomitans* in patients with chronic periodontitis,aggressive periodontitis,healthy subjects and children with gingivitis in two cities of the state of São Paulo,Brazil. *Journal of Applied Oral Science* **14**, 153-156.

- Jones, C. G. (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology 2000* **15**, 55-62.
- Johnson, J. D., Chen, R., Lenton, P. A., Zhang, G., Hinrichs, J. E. & Rudney, J. D. (2008). Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **79**, 2305-2312.
- Kamma, J. J. & Slots, J. (2003). Herpesviral-bacterial interactions in aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 420-426.
- Kamma, J. J., Nakou, M., Gmur, R. & Baehni, P. C. (2004). Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 314-321.
- Kaner, D., Bernimoulin, J. P., Hopfenmuller, W., Kleber, B. M. & Friedmann, A. (2007a). Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 880-891.
- Kaner, D., Christan, C., Dietrich, T., Bernimoulin, J. P., Kleber, B. M. & Friedmann, A. (2007b). Timing affects the clinical outcome of adjunctive systemic antibiotic therapy for generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **78**, 1201-1208
- Kinane, D. F., Podmore, M., Murray, M. C., Hodge, P. J. & Ebersole, J. (2001). Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontology 2000* **26**, 54-91.
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Jr., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I. & Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000* **42**, 47-79.
- Kunin, C. M. (1993). Resistance to antimicrobial drugs--a worldwide calamity. *Annals of Internal Medicine* **118**, 557-561.
- Lee, J., Choi, B., Yoo, Y., Choi, S., Cho, K., Chai, J. & Kim, C. (2003) Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **74**, 1329-1335.
- Löe, H. (2000). Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *International Dental Journal* **50**, 129-139.

- Lopez, N. J., Mellado, J. C. & Leighton, G. X. (1996). Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **23**, 101-105.
- Machtei, E. E. & Younis, M. N. (2008). The use of 2 antibiotic regimens in aggressive periodontitis: comparison of changes in clinical parameters and gingival crevicular fluid biomarkers. *Quintessence International* **39**, 811-819.
- Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology* **32 Suppl 6**, 7-15.
- Matto, J., Asikainen, S., Vaisanen, M. L., Von Troil-Linden, B., Kononen, E., Saarela, M., Salminen, K., Finegold, S. M. & Jousimies-Somer, H. (1999). Beta-lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Prevotella pallens* genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 2383-2388.
- Mayorga-Fayad, I., Lafaurie, G. I., Contreras, A., Castillo, D. M., Baron, A. & Aya Mdel, R. (2007). [Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogota, Colombia: an epidemiological approach]. *Biomedica* **27**, 21-33.
- Meng, H., Xu, L., Li, Q., Han, J. & Zhao, Y. (2007). Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* **43**, 133-159.
- Mestnik, M.J., Feres, F., Figueiredo, L., Duarte, P.M., Lira, E.A.G. and Faveri, M. (2010). Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 353-365.
- Moher D., Schulz K.F. & Altman D.G.(2001). The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet* **357**, 1191-1194.
- Mombelli, A., Schmid, B., Rutar, A. & Lang, N. P. (2000). Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *Journal of Periodontology* **71**, 14-21.
- Mombelli, A., Casagni, F. & Madianos, P. N. (2002). Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive

- periodontitis? A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* **29** Suppl 3, 10-21.
- Moreira, R. M. & Feres-Filho, E. J. (2007). Comparison between full-mouth scaling and root planing and quadrant-wise basic therapy of aggressive periodontitis: 6-month clinical results. *Journal of Periodontology* **78**, 1683-1688.
- Moter, A., Riep, B., Haban, V., Heuner, K., Siebert, G., Berning, M., Wyss, C., Ehmke, B., Flemmig, T. F. & Gobel, U. B. (2006). Molecular epidemiology of oral treponemes in patients with periodontitis and in periodontitis-resistant subjects. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 3078-3085.
- Mullally, B. H., Dace, B., Shelburne, C. E., Wolff, L. F. & Coulter, W. A. (2000). Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **35**, 232-241.
- Nakagawa, R. I., Guazeli-Amin, V. H., Hidalgo, M. M., Trevisan Jr, W. & Itano, E. N. (2001). Anti-leukotoxin antibodies against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in serum and saliva samples from patients with localized juvenile periodontitis. *Pesquisa Odontológica Brasileira* **15**, 5-11.
- Nibali, L., Donos, N., Brett, P. M., Parkar, M., Ellinas, T., Llorente, M. & Griffiths, G. S. (2008a). A familial analysis of aggressive periodontitis - clinical and genetic findings. *Journal of Periodontal Research* **43**, 627-634.
- Nibali, L., Griffiths, G. S., Donos, N., Parkar, M., D'Aiuto, F., Tonetti, M. S. & Brett, P. M. (2008b). Association between interleukin-6 promoter haplotypes and aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 193-198.
- Oosterwaal, P. J., Mikx, F. H., van 't Hof, M. A. & Renggli, H. H. (1991). Short-term bactericidal activity of chlorhexidine gel, stannous fluoride gel and amine fluoride gel tested in periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 97-100.
- Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J. & Kornman, K. S. (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* **14**, 216-48.
- Papapanou, P. N., Madianos, P. N., Dahlen, G. & Sandros, J. (1997). "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *European Journal of Oral Sciences* **105**, 389-396.

- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology* **183**, 3770-3783.
- Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A. & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology* **2000**, **42**, 80-87.
- Pavicic, M. J., van Winkelhoff, A. J. & de Graaff, J. (1991). Synergistic effects between amoxicillin, metronidazole, and the hydroxymetabolite of metronidazole against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 961-966.
- Pavicic, M.J., van Winkelhoff, A.J., Pavicic-Temming, Y.A. and de Graaff, J. (1994a) Amoxycillin causes an enhanced uptake of metronidazole in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a mechanism of synergy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **34**, 1047-1050.
- Pavicic, M. J., van Winkelhoff, A. J., Douque, N. H., Steures, R. W. & de Graaff, J. (1994b). Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 107-112.
- Pawlowski, A. P., Chen, A., Hacker, B. M., Mancl, L. A., Page, R. C. & Roberts, F. A. (2005). Clinical effects of scaling and root planing on untreated teeth. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 21-28.
- Picolos, D. K., Lerche-Sehm, J., Abron, A., Fine, J. B. & Papapanou, P. N. (2005). Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1055-1061.
- Quirynen, M., Bollen, C. M., Vandekerckhove, B. N., Dekeyser, C., Papaioannou, W. & Eyssen, H. (1995). Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *Journal of Dental Research* **74**, 1459-1467.
- Quirynen, M., Papaioannou, W. & van Steenberghe, D. (1996). Intraoral transmission and the colonization of oral hard surfaces. *Journal of Periodontology* **67**, 986-993.
- Quirynen, M., Mongardini, C., Pauwels, M., Bollen, C. M., Van Eldere, J. & van Steenberghe, D. (1999). One stage full- versus partial-mouth disinfection in the

- treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Long-term impact on microbial load. *Journal of Periodontology* **70**, 646-656.
- Quirynen, M., De Soete, M., Boschmans, G., Pauwels, M., Coucke, W., Teughels, W. & van Steenberghe, D. (2006). Benefit of "one-stage full-mouth disinfection" is explained by disinfection and root planing within 24 hours: a randomized controlled trial. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 639-647.
- Rhemrev, G. E., Timmerman, M. F., Veldkamp, I., Van Winkelhoff, A. J. & Van der Velden, U. (2006). Immediate effect of instrumentation on the subgingival microflora in deep inflamed pockets under strict plaque control. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 42-48.
- Ribeiro Edel, P., Bittencourt, S., Zanin, I. C., Bovi Ambrosano, G. M., Sallum, E. A., Nociti, F. H., Goncalves, R. B. & Casati, M. Z. (2009). Full-mouth ultrasonic debridement associated with amoxicillin and metronidazole in the treatment of severe chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **80**, 1254-1264.
- Richards, M. J., Edwards, J. R., Culver, D. H. & Gaynes, R. P. (2000). Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **21**, 510-515.
- Roberts, M. C. (2002). Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontology 2000* **28**, 280-297.
- Rooney, J., Wade, W. G., Sprague, S. V., Newcombe, R. G. & Addy, M. (2002). Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxycillin alone and combined. A placebo controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 342-350.
- Rosalem, W. J., Souza, R. C., Andrade, A. F. B. & Colombo, A. P. V. (2006a). Analysis of leukotoxin gene types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in brazilians with aggressive periodontitis. . *Brazilian Journal of Microbiology* **37**, 127-134.
- Rosalem, W. J., Andrade, A. F. B. & Colombo, A. P. V. (2006b). Prevalence of leukotoxic genotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in brazilians with chronic periodontitis. . *Brazilian Journal of Microbiology*, **37**, 590-596.
- Schacher, B., Baron, F., Rossberg, M., Wohlfeil, M., Arndt, R. & Eickholz, P. (2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 566-573.

- Schenkein, H. A., Barbour, S. E. & Tew, J. G. (2007). Cytokines and inflammatory factors regulating immunoglobulin production in aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* **45**, 113-127.
- Schiott, C. R., Briner, W. W. & Loe, H. (1976a). Two year oral use of chlorhexidine in man. II. The effect on the salivary bacterial flora. *Journal of Periodontal Research* **11**, 145-152.
- Schiott, C. R., Briner, W. W., Kirkland, J. J. & Loe, H. (1976b). Two years oral use of chlorhexidine in man. III. Changes in sensitivity of the salivary flora. *Journal of Periodontal Research* **11**, 153-157.
- Serino, G., Rosling, B., Ramberg, P., Socransky, S. S. & Lindhe, J. (2001). Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 910-916.
- Seymour, R. A. & Hogg, S. D. (2008). Antibiotics and chemoprophylaxis. *Periodontology 2000*, **46**, 80-108.
- Shaddox, L. M. & Walker, C. (2009) Microbial testing in periodontics: value, limitations and future directions. *Periodontology 2000* **50**, 25-38.
- Shlaes, D. M., Gerding, D. N., John, J. F., Jr., Craig, W. A., Bornstein, D. L., Duncan, R. A., Eckman, M. R., Farrer, W. E., Greene, W. H., Lorian, V., Levy, S., McGowan, J. E., Jr., Paul, S. M., Ruskin, J., Tenover, F. C. & Watanakunakorn, C. (1997). Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **18**, 275-291.
- Sigusch, B., Beier, M., Klinger, G., Pfister, W. & Glockmann, E. (2001). A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **72**, 275-283.
- Silva-Boghossian, C.M., Luiz, R.R. and Colombo, A.P. (2009) Periodontal status, sociodemographic, and behavioral indicators in subjects attending a public dental school in Brazil: analysis of clinical attachment loss. *Journal of Periodontology* **80**, 1945-1954.
- Slots, J., Rams, T. E. & Listgarten, M. A. (1988). Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **3**, 47-52.

- Slots, J., Feik, D. & Rams, T. E. (1990). Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **5**, 149-154.
- Slots, J. (2002). Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *Journal of Periodontal Research* **37**, 389-398.
- Slots, J. & Ting, M. (2002) Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontology 2000* **28**, 106-176.
- Slots, J. & Contreras, A. (2000). Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiology and Immunology* **15**, 277-280.
- Slots, J. & Jorgensen, M. G. (2002). Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet? *Periodontology 2000* **28**, 298-312.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of Periodontology* **63**, 322-331.
- Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994). "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* **17**, 788-792.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134-144.
- Socransky, S. S., Smith, C. & Haffajee, A. D. (2002). Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 260-268.
- Socransky, S.S. & Haffajee, A.D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28**, 12-55.
- Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG & Goodson JM. (2004) Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 352-62.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**, 135-187.
- Souto, R., Andrade, A. F. B., Uzeda, M. & Colombo, A. P. (2006). Prevalence of " non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**, 208-215.
- Souto, R. & Colombo, A. P. (2008a). Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *Journal of Periodontology* **79**, 97-103.

- Souto, R. & Colombo, A. P. (2008b). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Archives of Oral Biology* **53**, 155-160.
- Sreenivasan, P. & Gaffar, A. (2002). Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 965-974.
- Susin, C. & Albandar, J. M. (2005). Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. *Journal of Periodontology* **76**, 468-475.
- Susin, C., Valle, P., Oppermann, R.V., Haugejorden, O. and Albandar, J.M. (2005). Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 123-129.
- Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishizuka, M., Huang, Y. & Ishikawa, I. (2003). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *Journal of Periodontology* **74**, 1460-1469
- Tan, K. S., Woo, C. H., Ong, G. & Song, K. P. (2001). Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 886-890.
- Teles, F. R., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2008). The reproducibility of curet sampling of subgingival biofilms. *Journal of Periodontology* **79**, 705-713.
- Teles, R. P., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2006). Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000* **42**, 180-218.
- Tinoco, E. M., Beldi, M. I., Loureiro, C. A., Lana, M., Campedelli, F., Tinoco, N. M., Gjermo, P. & Preus, H. R. (1997). Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. *European Journal of Oral Sciences* **105**, 9-14.
- Tonetti, M. S. & Mombelli, A. (1999). Early-onset periodontitis. *Annals of Periodontol*, **4**, 39-53.
- Trevilatto, P. C., Tramontina, V. A., Machado, M. A., Goncalves, R. B., Sallum, A. W. & Line, S. R. (2002). Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 233-239.
- Trinh, S., Haggoud, A. & Reysset, G. (1996). Conjugal transfer of the 5-nitroimidazole resistance plasmid pIP417 from *Bacteroides vulgatus* BV-17: characterization and nucleotide sequence analysis of the mobilization region. *Journal of Bacteriology* **178**, 6671-6676.

- Trombelli, L., Bottega, S., Orlandini, E., Scapoli, C., Tosi, M. & Tatakis, D. (2003). Response to a plaque control regimen on different levels of gingival inflammation. *Minerva Stomatologica* **52**, 75-79.
- Umeda, M., Kobayashi, H., Takeuchi, Y., Hayashi, J., Mototome-Hayashi, Y. & Yano, K. (2003) High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *Journal of Periodontology* **74**:129-134.
- van Assche, N., Van Essche, M., Pauwels, M., Teughels, W. & Quirynen, M. (2009). Do periodontopathogens disappear after full-mouth tooth extraction? *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 1043-1047.
- van der Velden, U. (2005) Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontology 2000* **39**, 13–21.
- van Strydonck, D. A., Timmerman, M. F., Van der Velden, U. & Van der Weijden, F. (2008). Clinical efficacy of a chlorhexidine-delivering toothbrush. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 584-590.
- van Winkelhoff, A. J., Tjihof, C. J. & de Graaff, J. (1992). Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Journal of Periodontology* **63**, 52-57.
- van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G., Barendregt, D., Dellelijn-Kippuw, N., Stijne, A. & van der Velden, U. (1997). beta-Lactamase producing bacteria in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 538-543.
- van Winkelhoff, A. J. (2003). Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *International Journal of Dental Hygiene* **1**, 131-137.
- van Winkelhoff, A. J. (2005). Antibiotics in periodontics: are we getting somewhere? *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1094-1095.
- van Winkelhoff, A. J. & Winkel, E. G. (2005) Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontology 2000* **39**, 40–52.
- van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Oteo, A. & Sanz, M. (2005). Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 893-898.
- Vandekerckhove, B. N., Bollen, C. M., Dekeyser, C., Darius, P. & Quirynen, M. (1996). Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections.

- Long-term clinical observations of a pilot study. *Journal of Periodontology* **67**, 1251-1259.
- Vilarino JF, Soares IC, da Silveira CM, Rodel AP, Bortoli R, Lemos RR (1998). [Self-medication profile in a city of south Brazil]. *Revista de Saude Publica* **32**,43-49.
- Walker, C. B. (1996). Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontology 2000* **10**, 12-28.
- Watanabe, S. A., Correia-Silva, J. F., Horta, M. C. R., da Costa, J. E. & Gomez, R. S. (2007). EBV-1 and HCMV in aggressive periodontitis in Brazilian patients. *Brazilian Oral Research* **21**, 336-341.
- Watanabe, K., Senba, M., Ichinose, A., Yamamoto, T., Ariyoshi, K. & Matsumoto, K. (2009). Bactericidal activity in filtrated supernatant of *Streptococcus sanguinis* against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **219**, 79-84.
- Westfelt, E., Rylander, H., Dahlen, G. & Lindhe, J. (1998). The effect of supragingival plaque control on the progression of advanced periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 536-541.
- Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., Van der Velden, U. & Van der Weijden, G. A. (2001). Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 296-305.
- Wright, T. L., Ellen, R. P., Lacroix, J. M., Sinnadurai, S. & Mittelman, M. W. (1997). Effects of metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *Journal of Periodontal Research* **32**, 473-477.
- Xajigeorgiou, C., Sakellari, D., Slini, T., Baka, A., Konstantinidis, A. (2006). Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 254-264.
- Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., Som, S., Thompson, M., Torresyap, G. & Socransky, S. S. (2000). The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 637-647.
- Ximenez-Fyvie, L. A., Almaguer-Flores, A., Jacobo-Soto, V., Lara-Cordoba, M., Moreno-Borjas, J. Y. & Alcantara-Maruri, E. (2006). Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 869-877.

- Yang, H. W., Huang, Y. F., Chan, Y. & Chou, M. Y. (2005). Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *European Journal of Oral Sciences* **113**, 28-33.
- Yek, E. C., Cintan, S., Topcuoglu, N., Kulekci, G., Issever, H. & Kantarci, A. (2010). Efficacy of Amoxicillin and Metronidazole Combination for the Management of Generalized Aggressive Periodontitis. *Journal of Periodontology* doi:10.1902/jop.2010.090522.

8. ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROJETO DE PESQUISA EM PERIODONTIA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor e Senhora,

A pesquisa da qual você está sendo convidado a participar tem o objetivo de melhorar o tratamento das **Doenças Periodontais Agressivas** (doenças que afetam as **gengivas e o osso** que suportam os dentes na boca). As doenças periodontais são infecções causadas pelo **acúmulo de bactérias** específicas presentes na **placa dental bacteriana**. Esta doença aparece como uma inflamação da gengiva, com sangramento gengival, presença de tártaro e placa dental (massa branca aderida ao dente), e mobilidade (“amolecimento”) do dente.

Se você é mulher e está grávida ou amamentando você não poderá participar do estudo. Para participar deste estudo você deve estar com boa saúde geral, e não pode ter tomado antibióticos nos últimos 6 meses. A pesquisa envolve inicialmente um **exame clínico oral** (exame da gengiva, sondagem da gengiva, e presença de placa dental ou tártaro). Além disso, a **placa dental bacteriana** será removida com um instrumento estéril (usado para remoção de tártaro). Os indivíduos selecionados que aceitarem participar desse estudo e que forem identificados com doença periodontal, serão divididos em dois grupos. Um grupo receberá o tratamento de raspagem das raízes dos dentes associado ao antibiótico (Amoxicilina 500mg de 8 em 8 horas, e metronidazol 250mg de 8 em 8 horas, durante 7 dias, e bochechos com antisséptico (clorexidina), para auxiliar no controle da infecção. O outro grupo receberá o tratamento de raspagem associado a um placebo (medicação sem efeito) e bochechos com antissépticos (clorexidina). O pesquisador irá sortear em qual grupo você será participante. Os dois grupos receberão o mesmo tipo de tratamento, sendo a única diferença o uso, ou não de antibióticos. Todos os exames serão feitos com material estéril e equipamento odontológico adequados na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFRJ. Os procedimentos deste estudo envolvem exames clínicos e tratamento de gengiva que são normalmente feitos no consultório dentário, consistindo de raspagem e alisamento das raízes dos dentes, removendo o “tártaro” e os microorganismos para tratar a infecção e, não implicam em nenhum risco adicional ao paciente participante do estudo. Eventualmente o uso destes antibióticos podem causar enjôo e diarreia, e o paciente não pode tomar bebida alcoólicas. O benefício da pesquisa é reduzir o uso de antibióticos prescritos desnecessariamente. Os resultados de seus exames serão confidenciais e você poderá requisitá-los quando quiser. Finalmente, você poderá desistir de participar desse estudo, a qualquer momento. Portanto, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, solicitamos que você date e assine esse formulário de consentimento. Declaro ter lido e entendido os termos da presente pesquisa e, portanto, consinto em participar, abaixo assinado,

Rio de Janeiro ____/____/____

Assinatura do paciente

Nome do Pesquisador: Victor de Macedo Varela e Débora Heller
 Orientadores responsáveis: Eduardo Feres Filho, Maria Cynésia M. B. Torres, Ana Paula Colombo / Endereço Faculdade de Odontologia – UFRJ: Av. Brigadeiro Tromowsky, s/ n. Cep 21941-590, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro. Fone: 21-2562-2035

ANEXO 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUÍZ DE FORA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDES
 COMISSÃO ÉTICA DE PESQUISA

PARECEER 96/2007

PROCESSO: 45/2007

Projeto de Pesquisa: **EFETO DA TERAPIA PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICA ASSOCIADA A ANTIMICROBIANOS SOBRE PARÂMETROS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA PERIODONTITE AGRESSIVA**

Pesquisador: Victor de Macedo Varela

O Comitê de Ética em Pesquisa, tendo em vista o que dispõe a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, resolveu APROVAR o presente projeto.

Informamos que o CEP está à disposição do pesquisador para quaisquer esclarecimentos ou orientações que se façam necessários no decorrer da pesquisa.

Lembramos que o pesquisador deverá apresentar relatório da pesquisa no prazo de um ano a partir desta data.

Cidade Universitária, 22 de novembro de 2007.

Carla Regina de Oliveira
 Carla Regina de Oliveira
 Coordenadora CEPE/UFJF

Instituto de Ciências Biológicas e Saúde (ICBS/UFJF)
 Rua Leopoldo de Bulhões, 105 - Cidade Universitária
 Belo Horizonte - RJ de Janeiro RJ
 CEP: 31610-900
 Fone: (51) 3632-1111
 E-mail: cbs@ufjf.edu.br

ANEXO 3
PROJETO DE PESQUISA EM PERIODONTIA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FICHA DE ANAMNESE

Nome: _____ Data de Nascimento: ___/___/___
 Endereço: _____
 Telefone: _____ Estado civil: _____ Profissão: _____
 Sua cor ou raça é: () 1 - Branca () 2 - Preta () 3 - Amarela () 4 - Parda () 5 – Indígena
 Sua renda familiar é: () 1. Menor de R\$380,00 () 2. de R\$381,00 a \$600,00 () 3. de R\$601,00 a \$1000,00
 () 4. de R\$1001,00 a R\$1500,00 () 5. mais de R\$1500,00
 Nível de escolaridade: Sabe ler e escrever? () Sim () Não
 Qual é o curso mais elevado que cursou, no qual concluiu pelo menos uma série? _____

Questionário Médico

1. Nome do seu médico: _____ Telefone: _____
 2. Data do último exame médico: _____
 3. Você já foi hospitalizado(a)? () Sim () Não () Não sei
 4. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____
 5. Você está sob cuidados médicos? () Sim () Não () Não sei
 6. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____
 7. Você tem ou já teve alguma das seguintes condições:
 - a) Doenças congênitas do coração? () Sim () Não () Não sei
 - b) Doenças cardíacas (ex.: enfarte, angina, derrame, pressão alta, pressão baixa)?
 () Sim () Não () Não sei
 - Respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço? () Sim () Não () Não sei
 - Inchaço nos pés ou nos tornozelos? () Sim () Não () Não sei
 - Dor, pressão ou mal estar no peito? () Sim () Não () Não sei
 - c) Febre reumática? () Sim () Não () Não sei
 - d) Endocardite bacteriana? () Sim () Não () Não sei
 - e) Sopros no coração? () Sim () Não () Não sei
 - f) Desmaios convulsões ou epilepsia? () Sim () Não () Não sei
 - g) Dor de cabeça freqüente (2 ou mais por semana)? () Sim () Não () Não sei
 - h) Tratamento nervoso? () Sim () Não () Não sei
 - i) Problemas pulmonares (ex.: tuberculose, asma, enfisema, bronquite)? () Sim () Não () Não sei
 - j) Hepatite, doenças hepáticas, icterícia? () Sim () Não () Não sei
 - k) Artrite ou dores articulares? () Sim () Não () Não sei
 - l) Doenças sexualmente transmissíveis (ex.: sífilis, gonorréia, AIDS)? () Sim () Não () Não sei
 - m) Diabetes? () Sim () Não () Não sei
 - Demora na cicatrização dos ferimentos? () Sim () Não () Não sei
 - Você urina mais de seis vezes por dia? () Sim () Não () Não sei
 - Você sente sede a maior parte do tempo? () Sim () Não () Não sei
 - n) Problemas sangüíneos (ex.: anemia, fragilidade capilar, coagulação, sangramento, hemoptise, melena, hematemese, hemotúria, epistaxes)? () Sim () Não () Não sei
 - o) Úlceras ou outros problemas estomacais? () Sim () Não () Não sei
 - p) Reação alérgica a: anestésicos, antibióticos (ex.: penicilina, tetraciclina), sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranquilizantes, outros (ex.: alimentos, iodo, poeira)? () Sim () Não () Não sei
 8. Você já sofreu transfusão sangüínea? () Sim () Não () Não sei
 9. Você está tomando algum medicamento (listar nas observações)? () Sim () Não () Não sei
 10. Você teve um aumento ou diminuição acentuada do peso? () Sim () Não () Não sei
 11. Você teve uma variação recente no apetite? () Sim () Não () Não sei
 12. Você sofreu tratamento com raios x, rádio ou cobalto? () Sim () Não () Não sei
- Somente para mulheres**
13. Você já passou pela menopausa? () Sim () Não () Não sei
 14. Você está tomando algum hormônio? () Sim () Não () Não sei

Questionário Odontológico

1. Nome do seu dentista: _____ Telefone: _____
2. Frequência de visitas ao dentista: _____
3. Data da última visita ao dentista: _____
4. História das extrações:
 - a) Causa provável das extrações: _____
 - b) Data da última extração: _____
 - c) Você teve reações adversas durante ou após alguma extração dentária () Sim () Não() Não sei
 - d) Você teve sangramento excessivo após alguma extração dentária? () Sim () Não() Não sei
5. Suas gengivas sangram? () Sim () Não() Não sei
6. Você já teve algum abscesso periodontal ou GUN ? () Sim () Não() Não sei
7. Você já fez algum tratamento periodontal? () Sim () Não() Não sei
8. Em caso de resposta positiva, qual e há quanto tempo? _____
9. Você já teve algum tratamento ortodôntico? () Sim () Não () Não sei
10. Em caso de resposta positiva, listar data do tratamento, condição tratada, e tempo de duração do tratamento: _____
11. Você já fez algum tratamento de canal? () Sim () Não() Não sei
12. Em caso de resposta positiva, data do tratamento de canal: _____
13. Você usa ou já usou alguma prótese dentária? () Sim () Não() Não sei
14. Em caso de resposta positiva, citar idade da prótese em uso: _____
15. História dentária familiar:
 - a) Alguém em sua família tem ou teve doença periodontal? () Sim () Não() Não sei
 - b) Alguém em sua família teve perda precoce dos dentes? () Sim () Não() Não sei
 - c) Em caso de resposta positiva, listar quem e possíveis causas: _____
16. Você costuma respirar pela boca? () Sim () Não() Não sei
17. Você range os dentes? () Sim () Não() Não sei
18. Quantas vezes você escova os dentes por dia? _____
19. Alguém já lhe ensinou a escovar os dentes? () Sim () Não() Não sei
20. Você usa fio dental? () Sim () Não() Não sei
21. Você está usando ou já usou algum medicamento para tratar de problemas dentários? () Sim () Não () Não sei
22. Em caso de resposta positiva, que medicamento, quando usou e condição que levou ao uso: _____
23. Você fuma? () Sim () Não
24. Em caso de resposta positiva, quantos cigarros por dia? _____
25. Caso você seja ex-fumante, há quanto tempo parou, por quanto tempo fumou, e quantos cigarros costumava fumar? _____

Assinatura

_____/_____/_____

ANEXO 5**Tabela 1A.** Características demográficas dos 39 indivíduos nos dois grupos clínicos no exame inicial.

Parâmetros demográficos*	Controle (n=20)	Teste (n=19)
Idade (anos) (média ± DP)	32,6 ± 3,9	33,2 ± 4,9
Gênero (% homens)	35	47
Fumantes (%)	10	11
Não- fumantes (%)	90	89
Renda (%)		
< R\$ 380.00	5,3	5,3
R\$ 381.00 - 600.00	31,6	5,3
R\$ 601.00-1000.00	31,6	73,6
R\$ 1001.00-1500.00	21	5,3
>R\$ 1500.00	10,5	10,5
Raça declarada (%)		
Branca	21	31,6
Preta	31,6	10,5
Parda	47,4	57,9
Escolaridade (%)		
EFI	10,5	16,7
EFC	5,3	11,1
EMI	15,8	5,6
EMC	47,4	50
ESI	10,5	11
ESC	10,5	5,6

* Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para nenhuma das variáveis. EFI, ensino fundamental incompleto; EFC, ensino fundamental completo; EMI, ensino médio incompleto; EMC, ensino médio completo; ESI, ensino superior incompleto; ESC, ensino superior completo.

ANEXO 6**Tabela 2A.** Características clínicas periodontais (média \pm DP) de todos os sítios examinados dos 39 pacientes no exame inicial.*

Parâmetros clínicos	Controle (n = 20)	Teste (n = 19)
Número de dentes ausentes	2,8 \pm 2,9	3,4 \pm 3,7
Profundidade de sondagem (mm)	4,3 \pm 0,7	4,3 \pm 0,8
Nível clínico de inserção (mm)	4,6 \pm 1,2	4,9 \pm 1,2
<i>Porcentagem de sítios com:</i>		
Placa visível	67,8 \pm 18,9	70,1 \pm 17,6
Sangramento gengival	24,3 \pm 13,8	28,4 \pm 13,9
Sangramento à sondagem	80,5 \pm 19,5	85 \pm 15
Supuração	0,5 \pm 0,8	0,7 \pm 1,8
Profundidade de sondagem \leq 3 mm	46,2 \pm 18,4	49 \pm 18,1
Profundidade de sondagem 4- 6	39,5 \pm 11,9	36,5 \pm 11,9
Profundidade de sondagem \geq 7 mm	14,3 \pm 9,2	14,5 \pm 8,9
Nível clínico de inserção \leq 3 mm	43,9 \pm 20,9	40,7 \pm 21,8
Nível clínico de inserção 4- 6 mm	34,1 \pm 11,6	34,6 \pm 10,9
Nível clínico de inserção \geq 7 mm	22 \pm 13,7	24,7 \pm 15,2

*Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para nenhuma das variáveis.

ANEXO 7**Tabela 3A.** Parâmetros clínicos periodontais (média \pm DP) dos sítios selecionados para análise microbiológica dos 39 pacientes no exame inicial.*

Parâmetros clínicos *	Controle (n = 20)	Teste (n = 19)
Profundidade de sondagem (mm)	4,9 \pm 0,7	5,2 \pm 0,7
Nível clínico de inserção (mm)	5,2 \pm 0,9	5,6 \pm 1,0
<i>Porcentagem de sítios com:</i>		
Placa visível	64 \pm 23,5	66 \pm 24
Sangramento gengival	19 \pm 12,5	18,5 \pm 12
Sangramento à sondagem	81,6 \pm 17	85,5 \pm 12
Supuração	1,1 \pm 2,5	1,5 \pm 4,4

*Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para nenhuma das

ANEXO 8**Tabela 4A.** Associações significativas entre prevalência e níveis de espécies bacterianas e parâmetros demográficos da população estudada (n=39).

Parâmetros demográficos	Gênero‡		Tabagismo‡		Cor#		
	Homens	Mulheres	Não fumantes	Fumantes	Branca	Preta	Parda
<i>C. gingivalis</i> *	33±26	55±26			29±23	58±22	52±29
<i>C. gingivalis</i> **					0,04±0,03	2,8±5	0,4±0,8
<i>O. uli</i> *	41±29	18±15	29±24	7±6			
<i>P. intermedia</i> **	11±1,3	4,5±8,5					
Entéricos*					43±29	27±24	56±27
<i>S. constellatus</i> **					0,1±0,1	2,4±3	1,3±2
<i>C. albicans</i> **					0,02±0,03	1,7±3	3,5±7
<i>P. micra</i> **	4,1±1,5	15±2,8					
<i>P. gingivalis</i> **	14±1,2	7,8±1,1					
<i>T. denticola</i> **	2,9±5,7	2,4±8,2					
<i>V. parvula</i> **	1,3±1,9	0,4±0,7					
<i>P. nigrescens</i> *			47±24	80±15			
<i>T. socranskii</i> *			58±24	88±9			
<i>E. saphenum</i> *			43±30	75±12			
<i>E. nodatum</i> *			49±29	79±11			
<i>E. nodatum</i> **			4±7,5	22±1,5			
<i>C. concisus</i> *			25±22	3,6±7			
<i>C. concisus</i> **			1,5±4,7	0,003±0,007			
<i>T. forsythia</i> **			4±8,9	13±1,3			

*Refere-se à média (±DP) da prevalência (%); **Refere-se à media (±DP) dos níveis ($\times 10^5$ células bacterianas); ‡ Refere-se à diferenças entre os grupos ($p < 0,05$, Mann-Whitney); # Refere-se à diferença entre os grupos ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis). Não houve diferenças significativas para idade, educação ou renda.

ANEXO 9**Tabela 5A.** Associações significativas entre prevalência e níveis de espécies bacterianas e parâmetros clínicos periodontais da população estudada (n=39).

Parâmetros clínicos ‡	Profundidade de Sondagem	Nível Clínico de Inserção	Sangramento Gengival	Sangramento à Sondagem	Placa Visível	Supuração
<i>F. nuc vicentii</i> **	rho= 0,384	rho= 0,485				
<i>N. mucosa</i> *	rho= -0,365					
<i>A rimae</i> *		rho= 0,456				
<i>P. gingivalis</i> *				rho= 0,364		
<i>F. nuc nucleatum</i> **				rho= 0,428		
<i>C. albicans</i> *				rho= -0,402		
<i>G. vaginallis</i> **				rho= 0,368		
<i>P. melaninogenica</i> *				rho= 0,450		
<i>P. tannerea</i> *				rho= 0,424		
<i>S. enterica</i> *				rho= 0,363		
<i>G. morbillorum</i> *			rho= 0,458			
<i>G. morbillorum</i> **			rho= 0,485			
<i>F. nuc polymorphum</i> **			rho= -0,419			
<i>T. socranskii</i> **						rho= -0,424
<i>P. nigrescens</i> **						rho= -0,428
<i>E. saphenum</i> **						rho= -0,372
<i>S. aureus</i> *						rho= 0,476
<i>S. aureus</i> **						rho= 0,476
<i>A baumannii</i> *						rho= 0,355
<i>P. acnes</i> **						rho= 0,386
<i>S. constellatus</i> **					rho= -0,440	

*Refere-se à média da prevalência; **Refere-se à media dos níveis; ‡ Refere-se às médias nos sítios selecionados para análise microbiológica; rho = Coeficiente de Spearman ($p < 0,05$). Só foram consideradas associações com coeficientes rho $\geq 0,350$ (associações moderadas a fortes)

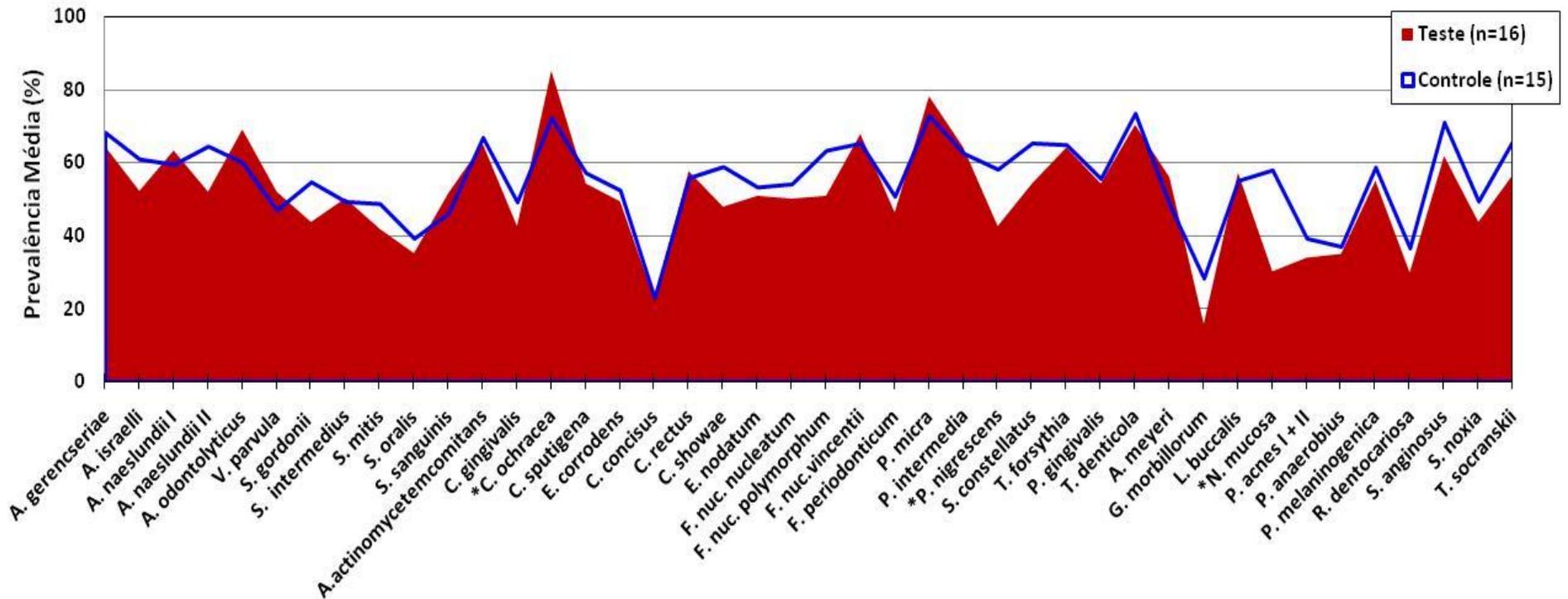
ANEXO 10

Figura 2A. Média da prevalência das espécies orais nas amostras de biofilme subgingival dos 39 pacientes com periodontite agressiva generalizada nos dois grupos clínicos, no início do estudo. *Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$, teste de Mann-Whitney).

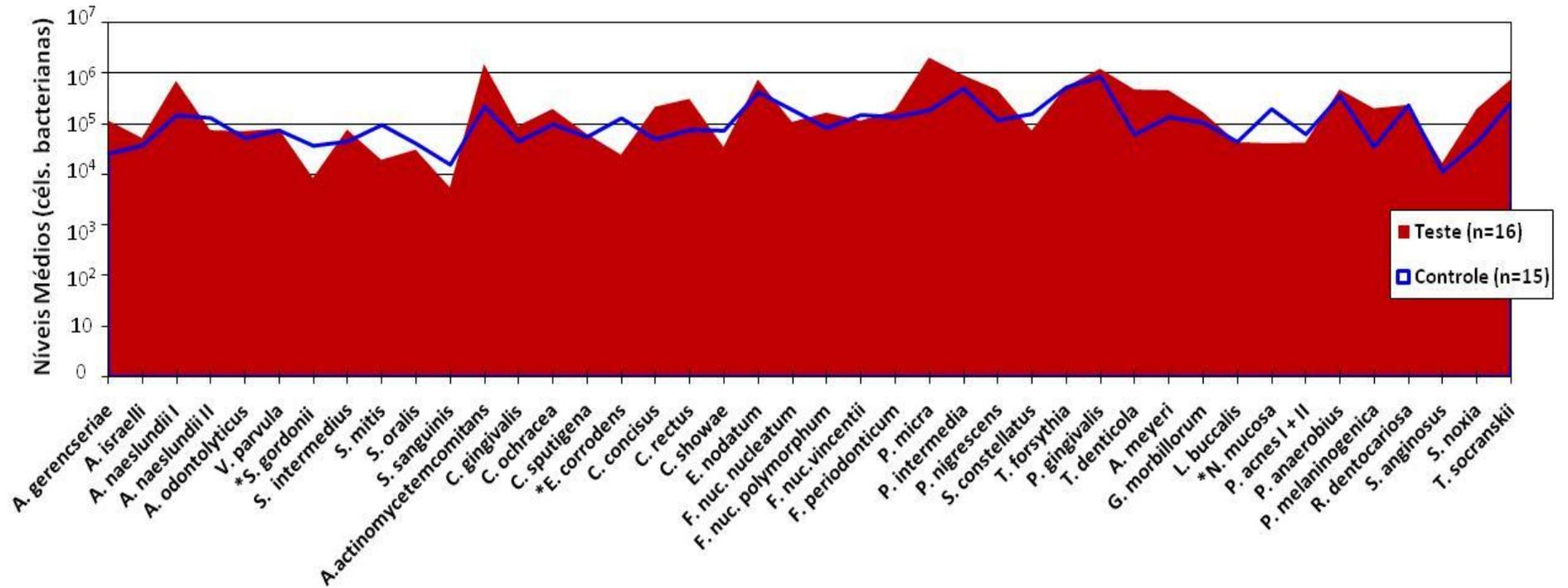
ANEXO 11

Figura 3A. Média dos níveis (x 10⁵ células) das espécies orais nas amostras de biofilme subgengival dos 39 pacientes com periodontite agressiva generalizada nos dois grupos clínicos, no início do estudo. *Diferenças significativas entre os grupos (p<0.05, teste de Mann-Whitney).

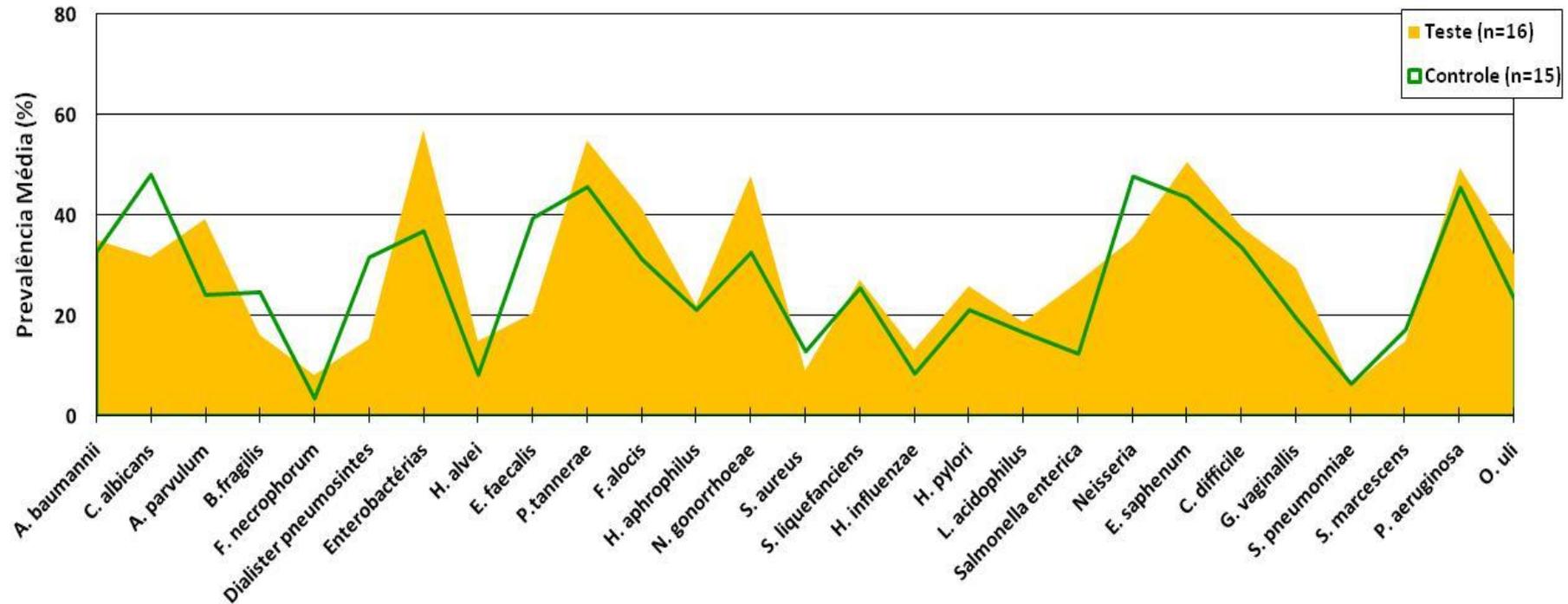
ANEXO 12

Figura 4A. Média da prevalência das espécies “não-periodontais” nas amostras de biofilme subgengival dos 39 pacientes com periodontite agressiva generalizada nos dois grupos clínicos, no início do estudo. *Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$, teste de Mann-Whitney).

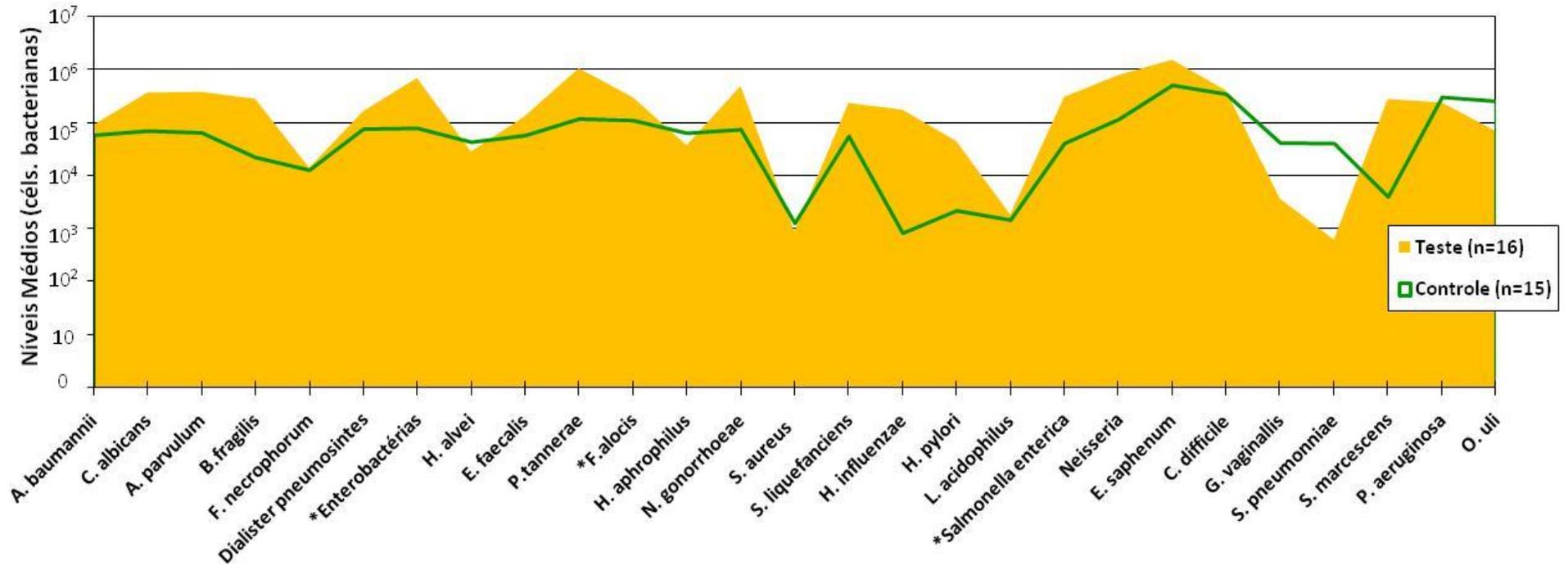
ANEXO 13

Figura 5A. Média dos níveis (x 10⁵ células) das espécies “não-periodontais” nas amostras de biofilme subgingival dos 39 pacientes com periodontite agressiva generalizada nos dois grupos clínicos, no início do estudo. *Diferenças significativas entre os grupos (p<0.05, teste de Mann-Whitney).

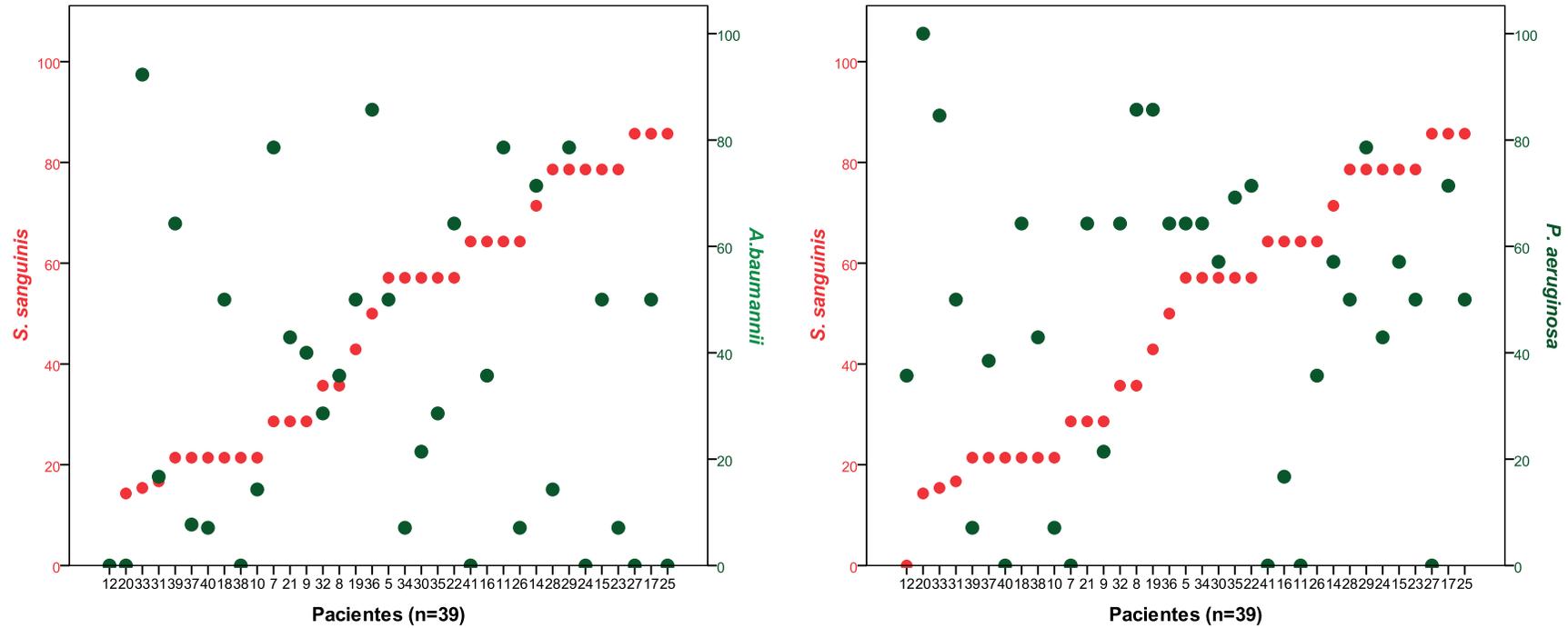
ANEXO 14

Figura 6A. Relações inversas na prevalência de *Streptococcus sanguinis* e as espécies “não-periodontais” *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* nos 39 indivíduos com PAG no início do estudo.

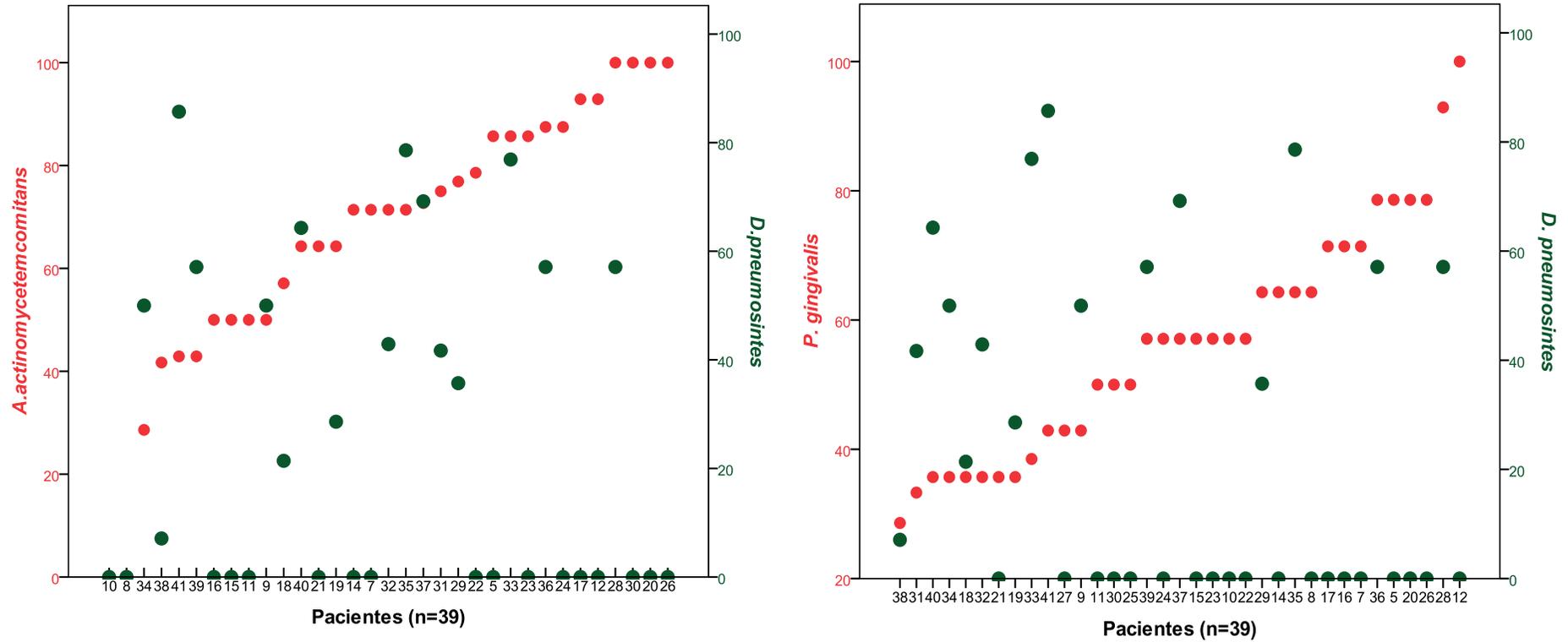
ANEXO 15

Figura 7A. Relações inversas na prevalência dos patógenos periodontais *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* e *Dialister pneumosintes* nos 39 indivíduos com PAG no início do estudo.

ANEXO 16

Figura 8A. Perfil radiográfico e clínico das condições periodontais de diferentes pacientes do estudo.

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](#)