



**MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA**

MARIA JOSEFA MESTNIK

**EFEITOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA
ASSOCIAÇÃO DE AMOXICILINA E METRONIDAZOL À
RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR EM
INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL AGRESSIVA
GENERALIZADA**

Guarulhos
2009

MARIA JOSEFA MESTNIK

**EFEITOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA
ASSOCIAÇÃO DE AMOXICILINA E METRONIDAZOL À
RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR EM
INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL AGRESSIVA
GENERALIZADA**

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

Guarulhos
2009

M586e Mestnik, Maria Josefa

Efeitos clínicos e microbiológicos da associação de amoxicilina e metronidazol à raspagem e alisamento radicular em indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada / Maria Josefa Mestnik. Guarulhos, SP, 2009.

65 f. ; 31 cm

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Magda Feres
Bibliografia: f. 54-62

1. Periodontite agressiva generalizada. 2. Metronidazol. 3. Amoxicilina. 4. Clorexidina. 5. Terapia periodontal I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 22st 617.632



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "EFEITOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO DE AMOXICILINA E METRONIDAZOL À RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL AGRESSIVA GENERALIZADA" em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata Maria Josefa Mestnik aprovada com louvor.

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Faveri', written over a horizontal line.

2. Profa. Dra. Adriana da Costa Ribeiro (USP)

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Adriana Ribeiro', written over a horizontal line.

3. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo (UnG)

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'L. Figueiredo', written over a horizontal line.

Guarulhos, 27 de Fevereiro de 2009.

Dedico mais esta conquista, inteiramente aos meus pais Joze e Maria que me deram a vida, amor e educação, como também me ensinaram a importância do trabalho, fundamentais para a formação do caráter de uma pessoa de bem.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, e por nos ter dotado de inteligência, possibilitando o conhecimento das leis que regem o universo, e o dom da palavra para podermos divulgar a maravilha da sua criação.

Aos meus pais, que mesmo sentindo a minha falta, souberam compreender e me receber com brilho nos olhos e um grande sorriso quando eu dizia que permaneceria ao lado deles.

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos que sempre torceram pelo meu sucesso e confiaram na minha capacidade, incentivando-me e apoiando-me de todas as formas. Sou uma pessoa privilegiada pela família que tenho, amo vocês!

Maria de Fátima, que Deus te abençoe pelo carinho e atenção com que cuidou dos meus pais na minha ausência, como também a Débora e a Maria Aparecida que deram retaguarda no consultório e em casa. Vocês são meus anjos da guarda!

Aos meus amigos que souberam compreender minhas recusas em participar de tantos eventos ocorridos neste período, e muitas vezes, “trouxeram” a festa até mim, para deixar claro que eu faço parte do grupo.

Muitas vezes, palavras são insuficientes para descrever a dimensão dos nossos sentimentos, tentarei deixar aqui, um pouco do significado destes dois anos na minha vida. Sinto-me enriquecida com tantos amigos, troca de informações e grandes momentos compartilhados com todos, gostaria de mencionar cada um, porém preciso ser breve.

Ao meu orientador Professor Marcelo de Faveri, que admiro muito como pessoa, professor e pesquisador, pela capacidade de coordenar o tempo fazendo tantas coisas ao mesmo tempo, porque o faz com amor ao trabalho e ao próximo. Todo meu carinho pela paciência e confiança em mim depositada nesta pesquisa.

À professora Magda Feres, agradeço a grande oportunidade de participar de uma equipe que demonstra satisfação no que faz, transmitindo-nos confiança neste caminho que estamos iniciando. Isso é o resultado de uma coordenação firme e competente, sempre com garra e elegância!

Ao professor Jamil Shibli, que me incentivou a ingressar nesse mundo onde aprendi a adquirir e transmitir conhecimentos, e que tenho como amigo assim como à Suzana.

À professora Luciene Figueiredo, por me acalmar sempre que me sentia num turbilhão, só pela presença meiga e delicada, e mesmo com tantas atribuições, encontra um tempo para me ensinar.

À professora Poliana Duarte, um exemplo de mestre, orientadora, pesquisadora e pessoa de coração puro, aprendi muito ao seu lado.

Aos professores do Centro de Pós-Graduação Marta Bastos, Cláudia Ota, Alessandra Acaçoni, Sergio Sato, André Reis, José Augusto Rodrigues e César Arrais que sempre se puseram à disposição e nos atenderam com atenção.

Quanto à turma do mestrado, sinto que não nos encontramos ao acaso; somos todos tão diferentes, porém unidos numa energia que transcende nosso entendimento! Sei que estaremos sempre ligados de maneira que nem a distância fará diferença, vibrando e acompanhando o sucesso uns dos outros.

Eduardo, Marcelinho, Marcelão e Datte, que nos matam de rir, mas são extremamente prestativos e me ensinaram tudo o que tive dificuldade fora do programa do mestrado. As meninas então, quanta afinidade! A Kelly sempre “antenada” me ensinou o que é competência. Vanessa, dedicada, vai longe! Juliana, que usa o instinto maternal em tudo o que faz, e Geisla, a filhota do sul, que me ensinou firmeza e objetividade. Amo vocês!

A Joyce foi um presente à parte, irmã, amiga, filhota do norte... tão longe e tão dentro do coração, obrigada por você existir e fazer parte da minha vida!

Ao Lucas Furtado, pelo auxílio prestado durante a pesquisa, assim como a Eislá e Priscila.

À Cristina Zoucas pela orientação no sentido burocrático.

À Cinthia Lobo, pelo apoio profissional, pessoal e psicológico, por pura amizade! Você é iluminada!

À Adriana Rose pela colaboração com relação aos pacientes e clínica.

À Izilvânia Barreto pela amizade e boa vontade em me explicar sobre o funcionamento do laboratório.

À Regina L. da Silva e Josete A. da Silva, pela companhia na clínica noite a dentro...

Aos pacientes que colaboraram para que este trabalho pudesse ser realizado.

Muito obrigada, e que Deus abençoe a todos!!!

AUTOLIBERTAÇÃO

“... nada trouxemos para este mundo e manifesto é que nada podemos levar dele.” – *Paulo*. (I TIMÓTEO, 6:7.)

Se desejas emancipar a alma das grilhetas escuras do “eu”, começa o teu curso de autolibertação, aprendendo a viver “como possuindo tudo e nada tendo”, “com todos e sem ninguém”.

Se chegaste à Terra na condição de um peregrino necessitado de aconchego e socorro e se sabes que te retirarás dela sozinho, resigna-te a viver contigo mesmo, servindo a todos, em favor do teu crescimento espiritual para a imortalidade.

Lembra-te de que, por força das leis que governam os destinos, cada criatura está ou estará em solidão, a seu modo, adquirindo a ciência da auto-superação.

Consagra-te ao bem, não só pelo bem de ti mesmo, mas, acima de tudo, por amor ao próprio bem.

Realmente grande é aquele que conhece a própria pequenez, ante a vida infinita.

Não te imponhas, deliberadamente, afugentando a simpatia; não dispensarás o concurso alheio na execução de tua tarefa.

Jamais suponhas que a tua dor seja maior que a do vizinho ou que as situações do teu agrado sejam as que devam agradar aos que te seguem. Aquilo que te encoraja pode espantar a muitos e o material de tua alegria pode ser um veneno para teu irmão.

Sobretudo, combate a tendência ao melindre pessoal com a mesma persistência empregada no serviço de higiene do leito em que repousas. Muita ofensa registrada é pelo inútil ao coração. Guardar o sarcasmo ou o insulto dos outros não será o mesmo que cultivar espinhos em nossa casa?

Desanuvia a mente, cada manhã, e segue para diante, na certeza de que acertaremos as nossas contas com Quem nos emprestou a vida e não com os homens que a malbaratam.

Deixa que a realidade te auxilie a visão e encontrarás a divina felicidade do anjo anônimo, que se confunde na glória do bem comum.

Aprende a ser só, para seres mais livre no desempenho do dever que te une a todos, e, de pensamento voltado para o Amigo Celeste, que esposou o caminho estreito da cruz, não nos esqueçamos da advertência de Paulo, quando nos diz que, com alusão a quaisquer patrimônios de ordem material, “nada trouxemos para este mundo e manifesto é que nada podemos levar dele”.

Fonte Viva
Francisco Cândido Xavier
Emmanuel

RESUMO

O objetivo do presente estudo duplo-cego, placebo controlado e randomizado foi avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos da raspagem e alisamento radicular (RAR) isoladamente ou em combinação com metronidazol (MTZ) e amoxicilina (AMX) no tratamento de indivíduos com periodontite agressiva generalizada (PAG). Foi realizado em 30 indivíduos com PAG que receberam RAR isoladamente (n=15) ou combinada com antibióticos (n=15; 400mg MTZ e 500mg AMX três vezes ao dia durante 14 dias). Todos os indivíduos receberam instrução de higiene oral incluindo o uso de enxaguatório bucal contendo clorexidina 0,12% duas vezes ao dia durante 2 meses. Exames clínicos e microbiológicos foram realizados no momento inicial e 3 meses pós-terapia. Amostras de biofilme subgengival foram analisadas individualmente por meio do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para 40 espécies bacterianas. Ambos os grupos apresentaram melhora em todos os parâmetros clínicos 3 meses após a terapia. Indivíduos que receberam RAR+MTZ+AMX apresentaram os melhores resultados na média de profundidade de sondagem ($p<0,01$) e no nível clínico de inserção ($p<0,05$). A associação da terapia antibiótica com a RAR promoveu benefícios clínicos adicionais em comparação a RAR isoladamente em sítios inicialmente intermediários e profundos ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente). A terapia de RAR+MTZ+AMX promoveu a mudança mais benéfica no perfil microbiológico subgengival. Os indivíduos deste grupo demonstraram reduções significativas nos níveis e proporções de periodontopatógenos tais como *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, e um aumento na proporção de bactérias compatíveis com o hospedeiro. Para complementar, a terapia de RAR+MTZ+AMX também reduziu significativamente os níveis de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em sítios profundos. Efeitos positivos foram observados nos parâmetros clínicos e na composição da microbiota subgengival quando o MTZ+AMX foi associado à RAR no tratamento de indivíduos com periodontite agressiva generalizada, em relação à RAR somente.

Palavras-chave: periodontite agressiva generalizada; amoxicilina; metronidazol; clorexidina; terapia periodontal

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the clinical and microbiological effects of scaling and root planing (SRP) alone or in combination with metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) in the treatment of subjects with generalized aggressive periodontitis (GAgP). A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial was conducted in 30 subjects with GAgP. Subjects received SRP alone (n=15) or combined with antibiotics (n=15; 400mg MTZ and 500mg AMX three times a day for 14 days). All subjects received oral hygiene instruction including the use of 0.12% chlorhexidine mouthrinse solution twice a day for 2 months. Clinical and microbiological examinations were performed at baseline and 3 months post-therapy. Subgingival samples were individually analyzed by checkerboard DNA-DNA hybridization for 40 bacterial species. In both groups, all clinical parameters improved at 3 months. Subjects receiving SRP+MTZ+AMX showed the greatest improvements in mean full-mouth probing depth and clinical attachment level. The antibiotic therapies associated with SRP led to additional clinical benefits over SRP alone in intermediate and deep sites. The SRP+MTZ+AMX therapy led to the most beneficial changes in the subgingival microbial profile. Subjects in this group showed significant reductions in mean counts and proportion of periodontal pathogens such as *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*, and the greatest increase in proportions of host-compatible species. In addition, The SRP+MTZ+AMX therapy reduced significantly *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in deep sites. Significant advantages are observed in clinical parameters and in the composition of the subgingival microbiota when MTZ+AMX was associated with SRP in the treatment of subjects with generalized aggressive periodontitis when compared with SRP alone.

Key words: generalized aggressive periodontitis; amoxicillin; metronidazole; chlorhexidine; antibiotic therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Delineamento experimental.....	24
Figura 2	Representação gráfica do <i>Minislot 30</i> e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon.....	30
Figura 3	Representação gráfica do <i>Miniblotter 45</i> e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival	30
Figura 4	Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA...	33
Figura 5	Média dos parâmetros clínicos analisados nos dois grupos terapêuticos na consulta inicial e 90 dias pós-terapia.....	38
Figura 6	Alterações nas médias de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e média do percentual de sangramento à sondagem ocorridas entre a consulta inicial e 90 dias pós-terapia nos dois grupos terapêuticos.....	39
Figura 7	Alterações nas médias de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e média do percentual de sangramento à sondagem ocorridas entre a consulta inicial e 90 dias pós-terapia nos dois grupos terapêuticos.....	40
Figura 8	Alterações das médias individuais do nível clínico entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia para os dois grupos terapêuticos.....	41
Figura 9	Perfil microbiano das médias de contagem ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos.....	44
Figura 10	Perfil microbiano das médias de proporção das sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos.....	45
Figura 11	Proporções dos complexos microbianos no início do estudo e 90 dias pós-terapia nas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos dos dois grupos terapêuticos.....	46

Figura 12 Média de contagem $\times 10^5$ de *A. actinomycetemcomitans*, em sítios inicialmente rasos (PS<3mm), intermediários (PS 4-6mm) e profundos (PS>6mm) para ambos os grupos terapêuticos.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação das cepas empregadas na confecção das sondas de DNA separadas por complexos bacterianos.....	32
Tabela 2	Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival.....	34
Tabela 3	Média dos parâmetros clínicos, no exame inicial, para os indivíduos nos dois grupos terapêuticos.....	36
Tabela 4	Média dos parâmetros clínicos, no exame de 90 dias pós-terapia, para os indivíduos nos dois grupos terapêuticos.....	37

SUMÁRIO

1.	Introdução	15
2.	Proposição	21
3.	Material e Métodos	22
3.1	Seleção da amostra.....	22
3.2	Critérios de inclusão e exclusão.....	22
3.3	Delineamento do estudo.....	23
3.4	Seleção dos sítios-teste.....	25
3.4.1	Coleta das amostras de biofilme subgengival.....	25
3.5	Monitoramento clínico.....	26
3.6	Procedimentos terapêuticos.....	27
3.6.1	Terapia periodontal básica.....	27
3.6.2	Bochechos com solução de clorexidina a 0,12%.....	27
3.6.3	Aderência ao tratamento.....	28
3.7	Monitoramento microbiológico.....	29
3.7.1	Análise microbiológica por meio da técnica do <i>Checkerboard DNA DNA Hybridization</i>	29
3.7.2	Hibridização das membranas com as sondas de DNA.....	29
3.7.3	Sondas de DNA.....	31
3.7.4	Detecção das espécies.....	31
3.8	Análise estatística.....	34
3.8.1	Monitoramento clínico.....	34
3.8.2	Monitoramento microbiológico.....	35
4.	Resultados	36
4.1	Resultados clínicos.....	36
4.2	Resultados microbiológicos.....	42
5.	Discussão	48
5.1	Aspectos clínicos periodontais.....	49
5.2	Aspectos microbiológicos.....	50

6. Conclusão.....	53
Referências bibliográficas.....	54
Anexos.....	63

1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são um grupo de infecções que possuem como fator etiológico primário as bactérias presentes na cavidade oral, especialmente as que colonizam as superfícies dos dentes, supra e subgengivalmente, organizadas num biofilme cuja presença acomete as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, levando à perda de inserção, de tecido ósseo, e eventualmente do elemento dentário (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994). Muitos avanços tecnológicos nas áreas da imunologia e biologia molecular, ocorridos principalmente nas duas últimas décadas, facilitaram sobremaneira o entendimento da etiopatogenia das periodontites, incluindo a microbiota patogênica relacionada a cada tipo de doença e o perfil do hospedeiro. Esses conhecimentos têm facilitado o direcionamento de terapias mais específicas para cada paciente, que sendo fundamentadas nos fatores etiológicos da infecção, podem vir a trazer melhores resultados clínicos e microbiológicos a longo prazo.

As doenças periodontais, no caso das periodontites, podem ser classificadas na sua forma crônica e na sua forma agressiva (ARMITAGE, 1999). A Periodontite crônica, subdividida em localizada e generalizada, é mais prevalente em adultos. A sua progressão pode variar de lenta a moderada e é normalmente consistente com a presença de fatores locais (ex.: biofilme, cálculo, iatrogenias). Já a Periodontite agressiva, também subdividida em localizada e generalizada, apresenta características clínicas e laboratoriais claramente identificáveis, o que a torna suficientemente diferente da periodontite crônica (LANG et al., 1999). É uma infecção que acomete indivíduos sistemicamente saudáveis, caracterizada por uma grande perda de inserção clínica associada a uma rápida destruição óssea alveolar, atingindo normalmente indivíduos jovens (TONETTI e MOMBELI, 1999; ARMITAGE, 1999; LANG et al., 1999).

A microbiota da doença periodontal agressiva é complexa consistindo geralmente de bactérias anaeróbias Gram-negativas, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium* ssp. e espécies de *Selenomonas* (LOESCHE et al., 1985; MULLALLY et al., 2000; KAMMA et al., 2001, KAMMA et al.,

2004; FAVERI et al., 2008). O papel de bactérias específicas, especialmente do *A. actinomycetemcomitans* na doença periodontal agressiva tem sido extensivamente estudado (ZAMBON et al., 1983; TINOCO et al., 1997; DARBY et al., 2000; CORTELLI et al., 2005; YANG et al., 2005). SLOTS et al. (1980), analisando por meio de cultura microbiana, amostras de biofilme subgengival de bolsas periodontais profundas de pacientes portadores de doença periodontal agressiva, detectaram *A. actinomycetemcomitans* em 9 dos 10 indivíduos analisados. Outros estudos detectaram *A. actinomycetemcomitans* em cerca de 75 a 100% das amostras de bolsas periodontais ativas na doença periodontal agressiva (MANDELL e SOCRANSKY, 1981; ZAMBON et al., 1983; CHRISTERSSON et al., 1985; ZAMBON, 1985; RUSSO et al., 1998; LEE et al., 2003; CORTELLI et al., 2003; YANG et al., 2005). Embora *A. actinomycetemcomitans* seja considerado como o principal patógeno na doença periodontal agressiva, existem algumas controvérsias na literatura (HAN et al., 1991; LOPEZ et al., 1996; MULLALLY et al., 2000; KAMMA et al., 2001; ISHIKAWA et al., 2002; TREVILATTO et al., 2002; TAKEUCHI et al., 2003; GAJARDO et al., 2005).

MULLALLY et al., (2000) e KAMMA et al., (2001), estudando populações na Irlanda do Norte e na Grécia, respectivamente, observaram por meio da técnica do PCR (Reação em cadeia da polimerase) uma baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* (28% e 18,8%, respectivamente) em bolsas periodontais de indivíduos com doença periodontal agressiva localizada. Em outro estudo, HAN et al. (1991) não detectaram por cultura *A. actinomycetemcomitans* em nenhuma das 23 amostras subgengivais obtidas de indivíduos chineses portadores da forma agressiva da doença periodontal. TREVILATTO et al. (2002) estudaram uma família brasileira com doença periodontal agressiva (n=14) e relataram uma baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, questionando assim o valor do isolamento deste microrganismo como forma de diagnóstico para a doença periodontal agressiva. Complementando, MOMBELLI et al. (2002), em uma revisão sistemática da literatura, relataram que a presença ou ausência de *A. actinomycetemcomitans* não pode ser um parâmetro para diferenciar indivíduos com doença periodontal agressiva daqueles com a forma crônica da doença. Assim, estes estudos sugerem que outros microrganismos,

ou então formas mais virulentas de *A. actinomycetemcomitans* podem estar associados à etiologia da doença periodontal agressiva.

Entre os fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans* destacam-se a capacidade invasiva em células epiteliais (MAYER et al., 1999) e a produção de duas exotoxinas, a toxina distensora citoletal e a leucotoxina. A toxina distensora citoletal é capaz de causar parada de ciclo celular na fase G2 levando à distensão das células epiteliais e fibroblastos, além de agir sobre linfócitos T (SUGAI et al., 1998; MAYER et al., 1999). A leucotoxina, uma proteína membro da família das RTX, é capaz de lisar neutrófilos e monócitos humanos, prejudicando as defesas do hospedeiro (KOLODRUBETZ et al., 1989). A leucotoxina (Itx) é altamente virulenta ao hospedeiro, e é expressa por um *operon* constituído de 4 genes assim designados na ordem de transcrição; C (ItxC), A (ItxA), B (ItxB) e D (ItxD). A estrutura da leucotoxina é designada ao gene A, sendo os demais genes responsáveis pela ativação e transporte da toxina (LALLY et al., 1989). Esta leucotoxina produzida pela cepa que possui este *operon* é específica para determinadas células, entre elas, células do sistema imune (DIRIENZO et al., 1994). Assim sendo, a leucotoxina poderia proteger o *A. actinomycetemcomitans* contra as células de defesa do sistema imune do hospedeiro (JOHANSSON et al., 2000). A expressão da leucotoxina é regulada em muitas cepas, embora determinadas cepas possuam uma deleção de 530 pb na região promotora do gene, afetando assim a sua transcrição (BROGAN et al., 1994; PAJU et al., 2000). Indivíduos com doença periodontal agressiva vem demonstrando uma alta prevalência de cepas extremamente leucotóxicas em comparação a indivíduos com doença periodontal crônica e indivíduos saudáveis (ZAMBON et al., 1996; CORTELLI et al., 2005).

O melhor conhecimento da interação entre microbiota e hospedeiro, perfil microbiológico de cada doença e a distribuição geográfica, podem propiciar o encontro de uma terapia periodontal adequada, cujos objetivos principais são a redução da profundidade de sondagem, do sangramento à sondagem e da supuração, bem como o aumento do nível clínico de inserção, e a estabilidade desses parâmetros ao longo do tempo. Os estudos científicos demonstram que esses resultados clínicos satisfatórios são atingidos quando os níveis, proporções e percentual de sítios colonizados por diferentes periodontopatógenos são efetivamente reduzidos (TELES et al., 2006).

Subseqüentemente, deve-se estabelecer uma nova comunidade microbiana no biofilme subgingival com níveis e proporções mais elevadas de microrganismos compatíveis com saúde periodontal. Aparentemente, esse perfil microbiano compatível com saúde é mais facilmente instalado na cavidade oral quando a terapia empregada permite uma rápida e drástica redução dos patógenos, não somente nos sítios profundos, mas em toda a cavidade oral, incluindo sítios rasos e mucosas. O tratamento periodontal mais comumente utilizado, a raspagem e alisamento radicular (RAR), apesar de ser eficaz para uma boa parcela dos pacientes, muitas vezes não leva às modificações microbiológicas necessárias para manter os benefícios conseguidos inicialmente, estáveis a longo prazo, principalmente em indivíduos com doença periodontal agressiva. Um dos principais motivos da falta de eficácia da RAR são dificuldades técnicas de intervir no biofilme em áreas de difícil acesso, como bifurcações, concavidades radiculares e bolsas periodontais profundas. Além disso, alguns periodontopatógenos relacionados com a doença periodontal agressiva tem capacidade de invasão tecidual, o que poderia ser um foco de recolonização dos sítios tratados. Logo, com o objetivo de potencializar os efeitos da RAR, outras formas de tratamento, como a associação de antibióticos sistêmicos, têm sido propostas no tratamento de indivíduos com doença periodontal agressiva (HERRERA et al., 2002; HAFFAJEE et al., 2003).

Os antibióticos sistêmicos parecem ter um importante papel no tratamento das periodontites agressivas, pois muitos desses pacientes não respondem bem à terapia periodontal mecânica convencional (CALIFANO et al., 2003; SLOTS et al., 2004). Duas revisões sistemáticas avaliaram estudos sobre a utilização desses medicamentos em periodontia e sugerem que os antibióticos sistêmicos potencializam os efeitos da RAR, principalmente nos indivíduos com periodontite agressiva (HERRERA et al., 2002; HAFFAJEE et al., 2003). Nove das 10 comparações realizadas na revisão de Haffajee e colaboradores mostraram que os indivíduos que tomaram um antibiótico sistêmico, em combinação com a RAR, tiveram um maior ganho na média de nível clínico de inserção em comparação àqueles indivíduos que receberam RAR somente.

Os estudos clínicos controlados sobre a efetividade de antibióticos sistêmicos no tratamento periodontal tiveram início no final da década de 1970, com a utilização da

tetraciclina no tratamento da periodontite juvenil localizada, atualmente denominada periodontite agressiva localizada (NOVAK et al., 1988). Posteriormente, outras investigações clínicas e microbiológicas mostraram que as tetraciclinas hidrocloreídricas ou seus derivados semi-sintéticos, como a doxiciclina e a minociclina, foram efetivas para o tratamento da periodontite agressiva localizada (MANDELL & SOCRANSKY et al., 1988).

Os tratamentos sempre focavam a eliminação ou a redução do *A. actinomycetemcomitans*, que se acreditava ser o principal microrganismo associado com as periodontites agressivas. Desta maneira, em 1992, van Winkelhoff e colaboradores mostraram que a combinação do metronidazol (250mg; três vezes ao dia durante 7 dias) e da amoxicilina (500mg; três vezes ao dia durante 7 dias) era efetiva no tratamento de um grupo de indivíduos com doença periodontal positivos para a presença de *A. actinomycetemcomitans*. Aparentemente, a combinação de um antibiótico direcionado para anaeróbios estritos (metronidazol) e outro para aeróbios ou facultativos (amoxicilina), parece ter um efeito benéfico no tratamento das periodontites relacionadas à presença do *A. Actinomycetemcomitans*, no caso, nas doenças periodontais agressivas.

Vários estudos intervencionais sem o uso de um grupo controle foram realizados utilizando a associação de amoxicilina e metronidazol no tratamento da doença periodontal agressiva (van WINKELHOFF et al., 1992; PAVIČIĆ et al., 1992; GORDON et al., 1993; WINKEL et al,1998), porém, os estudos clínicos, randomizados e placebo controlados somente começaram a surgir a partir de 2005 (GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIOU et al., 2006; HAAS et al., 2008). O primeiro estudo clínico placebo-controlado foi realizado por GUERRERO et al. (2005). Os autores selecionaram indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada, que foram divididos em dois grupos terapêuticos: Controle- raspagem e alisamento radicular (RAR) associado a placebo e Grupo Teste- RAR associado à amoxicilina (500mg) e metronidazol (500mg). Um fato importante deste estudo é que o tratamento de raspagem e alisamento radicular foi realizado em duas sessões em um intervalo de 24hs, segundo um protocolo conhecido como “*full-mouth disinfection*”, além disso, nenhuma avaliação microbiológica foi realizada. Os autores observaram que a combinação de metronidazol

e amoxicilina levou a resultados clínicos superiores aos observados no grupo que recebeu apenas a RAR (controle). Posteriormente, XAJIGEORGIOU et al. (2006) compararam a efetividade de 3 diferentes terapias antibióticas em conjunto com a RAR no tratamento de indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Quarenta e três pacientes participaram do estudo e foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos terapêuticos: RAR somente (controle) ou em combinação com metronidazol e amoxicilina (500 mg de cada antibiótico 3x/dia por 7 dias); doxiciclina (200 mg iniciais, seguida de 100 mg/dia por 14 dias), ou metronidazol (500 mg 3x/dia por 7 dias). Foram realizadas avaliações clínicas e microbiológicas até 6 meses após as terapias. Amostras de biofilme subgengival foram avaliadas para a presença de 4 patógenos, *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. Os autores observaram que a combinação de metronidazol e amoxicilina foi a mais eficaz em reduzir o percentual de sítios com profundidade de sondagem > 6mm, e os 4 patógenos avaliados. É interessante observar que nesse estudo, o grupo que recebeu somente RAR foi o que apresentou os maiores níveis de recolonização pelos periodontopatógenos avaliados aos 6 meses pós-terapia.

Recentemente, HAAS et al. (2008) em um estudo clínico, randomizado e placebo controlado observaram os efeitos que o uso sistêmico de azitromicina associado à raspagem e alisamento radicular tinham nos parâmetros clínicos periodontais. Foram selecionados 24 indivíduos e distribuídos aleatoriamente em dois grupos terapêuticos: RAR somente e RAR associado a azitromicina 500 mg. Os autores observaram que a associação de azitromicina à terapia básica de raspagem e alisamento radicular promoveu benefícios clínicos em um período de avaliação de 12 meses pós terapia em indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada.

Entretanto, nenhum destes estudos clínicos randomizados e controlados, com exceção do estudo de XAJIGEORGIOU et al. (2006) que avaliou 4 espécies bacterianas, pesquisou alterações dos níveis desses microrganismos na microbiota subgengival em indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada que receberam ou não antibioticoterapia sistêmica, sendo necessário mais estudos que avaliem de forma mais abrangente as alterações em níveis e proporção dos patógenos.

2. PROPOSIÇÃO

Avaliar as alterações clínicas e microbiológicas promovidas pela terapia de raspagem e alisamento radicular associada ao uso sistêmico de amoxicilina e metronidazol em indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção da amostra

Trinta indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada que compareceram na Clínica Odontológica da Universidade Guarulhos foram selecionados para a participação no estudo. A seleção foi feita por um único profissional treinado. Os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas, coletas e terapias. Os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, responderam a um questionário de saúde/anamnese e receberam a terapia periodontal gratuitamente, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Guarulhos (Nº156/2007 – Anexo A).

3.2. Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

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

- Voluntários portadores de doença periodontal agressiva generalizada;
- Idade entre 18-30 anos;
- Possuir no mínimo 20 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal apresentando profundidade de sondagem ≥ 5 mm e nível clínico de inserção ≥ 5 mm, não contíguos, localizados nas regiões de molares e incisivos; e mais 6 dentes com as mesmas características clínicas localizados em outros grupos dentários.

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Fumantes;
- Pacientes grávidas ou lactantes;
- História de tratamento periodontal nos últimos seis meses;

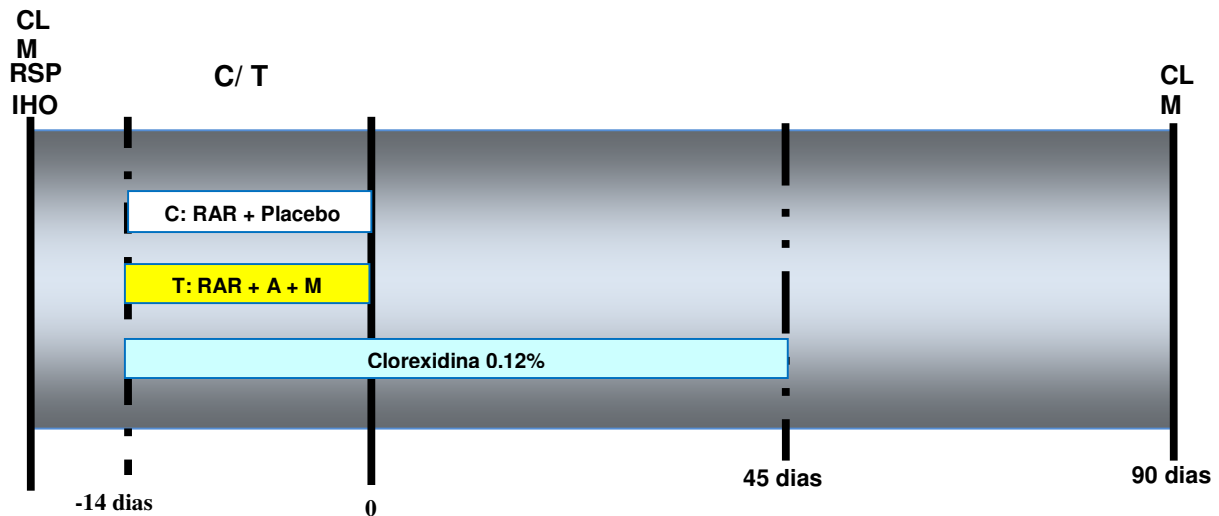
- História de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- História de uso de anti-sépticos bucais nos últimos seis meses;
- História de doença sistêmica que comprometa a resposta do hospedeiro ou exija medicação profilática ao tratamento;
- Relato de alergia à amoxicilina, metronidazol e clorexidina.

3.3. Delineamento do estudo

Os indivíduos selecionados para participar deste estudo duplo-cego foram aleatoriamente distribuídos por meio de cara e coroa, em 2 grupos terapêuticos, cada grupo com 15 indivíduos, sendo 1 grupo controle e 1 grupo teste. Para a determinação da amostra foi realizado cálculo de potência para cada um dos parâmetros clínicos e microbiológicos, baseado nos resultados dos estudos de XIMENEZ-FYVIE et al. (2000); FERES et al. (1999 e 2001) e FAVERI et al. (2006), encontrando uma potência superior a 80% para uma amostragem de 15 pacientes. Os indivíduos foram distribuídos nos seguintes grupos:

Controle (C): Raspagem e alisamento radicular associado a placebo;

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



C (Controle): RAR + Placebo
 Teste (T): RAR + A + M

RAR: Raspagem e alisamento
 radicular
 CLX: Clorexidina 0,12%; 2x/dia

CL: Avaliação Clínica
 M: Avaliação Microbiológica
 RSP: Raspagem Supragengival
 IHO: Instrução de Higiene Oral
 A: Amoxicilina 500mg (3x/dia,
 14dias)

Figura 1. Delineamento experimental.

O protocolo experimental está sumarizado na Figura 1. Inicialmente, todos os pacientes receberam monitoramento clínico e microbiológico, de acordo com o protocolo especificado nas duas sessões seguintes (3.4 Seleção dos sítios-teste e 3.5 Monitoramento clínico), seguido de raspagem supragengival (RSP) de todos os dentes, remoção de tecido cariado e selamento provisório das cavidades, desgaste de restaurações em excesso, curativos endodônticos e exodontias. Como instrução de higiene oral, todos os voluntários foram orientados a utilizar o mesmo dentífrício contendo triclosan/gantrez (Colgate Total[®], Anakol Ind. Com. Ltda- Kolynos do Brasil - Colgate Palmolive Co, São Bernardo do Campo, SP, Brazil), e receberam escovas Colgate Professional suave (Anakol Ind. Com. Ltda- Kolynos do Brasil - Colgate Palmolive Co, São Bernardo do Campo, SP, Brazil) e interdentais HB-Bituflo (Aromaterapia Ind. Com. Ltda., Rua Campos Sales, 953/963, Valinhos, SP, Brasil) nos

diâmetros indicados aos espaços entre os dentes. A terapia básica de raspagem e alisamento radicular (RAR) foi realizada de 4 a 6 sessões e finalizada, em 14 dias no máximo. Os indivíduos dos 2 grupos experimentais (controle e teste) foram orientados a realizar bochechos com clorexidina 0,12% 2x/dia. O controle químico do biofilme supragengival foi iniciado em conjunto com a terapia de RAR e prosseguiu por um período de 45 dias pós-terapia. Os pacientes foram monitorados clínica e microbiologicamente no início e aos 90 dias pós-terapia.

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

3.4. Seleção dos sítios-teste

Foram selecionados 9 sítios em cada voluntário, distribuídos uniformemente de acordo com a profundidade de sondagem inicial nas seguintes categorias de bolsa (3 sítios por categoria): rasas ($PS \leq 3\text{mm}$), moderadas ($PS 4-6\text{ mm}$), e profundas ($PS \geq 7\text{mm}$). Estes sítios deveriam estar localizados em faces dentais interproximais não-contíguas, e preferencialmente distribuídos entre os 4 quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados. Amostras de biofilme subgengival foram coletadas no início e 90 dias pós-terapia.

3.4.1. Coleta das amostras de biofilme subgengival

Após a remoção da placa supragengival, a coleta de amostras de biofilme subgengival foi feita com curetas Gracey do tipo mini-five (HuFriedy, USA), posicionadas na porção mais apical dos sítios selecionados. As amostras foram depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150 μl de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6) e em seguida foram acrescidos 100 μl de solução de NaOH

a 0,5 M a essa suspensão bacteriana para que o DNA bacteriano ficasse viável por longos períodos de tempo, para a análise por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Os tubos foram identificados e armazenados à -20°C em um período máximo de 3 meses até serem analisados.

3.5. Monitoramento clínico

O monitoramento clínico foi realizado no momento inicial (-14 dias) e 90 dias após o término da terapia de RAR por meio de sondas periodontais manuais (PCPUNC - BR15, HuFriedy do Brasil, RJ, Brasil). Um examinador foi treinado e calibrado com o objetivo de se conseguir a melhor reprodutibilidade nas medições realizadas. A metodologia utilizada para a calibração foi preconizada por Araujo et al. (2003) onde se avaliou o erro padrão da medida (e.p.m) e o erro médio percentual (e.m.p) para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção). O e.p.m e e.m.p intra-examinador demonstrou que o examinador obteve e.p.m. de 0,13mm e 0,17mm para a profundidade de sondagem e nível clínico de inserção respectivamente. Esses valores de e.p.m. indicam uma reprodutibilidade aceitável dentro dos parâmetros de pesquisa clínica periodontal. Para as variáveis categóricas (índice de placa visível e índice de sangramento gengival), considerando somente a presença ou a ausência do parâmetro clínico, foi realizada a média do nível de concordância e o examinador apresentou uma concordância intra-examinador igual a 92% (Teste Kappa).

As mensurações clínicas foram realizadas em 6 sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares). Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados:

* *Índice de Placa Visível – IPV* (AINAMO e BAY, 1975): Observou-se a presença ou ausência de placa dentária supragengival visível, após lavagem e secagem dos dentes. A ausência de placa recebeu o escore 0 (não-visível) e a presença de placa recebeu o escore 1 (visível).

* *Índice de Sangramento Gengival – ISG* (AINAMO e BAY, 1975): Observou-se a presença ou ausência de sangramento na gengiva marginal após percorrer levemente

com a sonda periodontal ao longo do sulco gengival. A ausência de sangramento recebeu o escore 0 e a presença de sangramento recebeu escore 1.

* *Profundidade de Sondagem – PS*: Distância em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

* *Nível Clínico de Inserção – NCI*: Distância em milímetros, entre a junção esmalte-cemento e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

* *Sangramento à Sondagem – SS*: Presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento até 20 segundos após a sondagem com sonda periodontal milimetrada.

* *Supuração – SUP*: Presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de supuração até 20 segundos após a sondagem com sonda periodontal milimetrada.

3.6. Procedimentos terapêuticos

3.6.1. Terapia periodontal básica

Após o exame clínico e coleta do biofilme subgengival para análise microbiológica, os indivíduos foram submetidos à raspagem supragengival (RSP) e instruções de higiene oral (IHO). Em seguida, receberam 4 a 6 sessões de raspagem e alisamento radicular (RAR) com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy, Chicago, EUA), que tiveram duração de aproximadamente 1 hora dentro dos 14 dias de terapia antibiótica. O tratamento periodontal recebido foi gratuito durante toda a duração do estudo. As outras necessidades de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da Clínica de Odontologia da Universidade Guarulhos.

3.6.2. Bochechos com solução de clorexidina a 0,12%

Indivíduos dos grupos Controle e Teste receberam RAR e o controle químico com solução contendo clorexidina 0,12% combinados ou não com o uso de antibióticos. Os voluntários iniciaram o uso adjuvante do controle químico em conjunto com a RAR prosseguindo por 45 dias após a terapia periodontal básica. Os voluntários foram

orientados a bochechar 15 ml da solução duas vezes ao dia (manhã e noite), por 1 minuto, como proposto por FAVERI et al. (2006b). Foi recomendada a não-ingestão de alimentos sólidos ou líquidos nos 30 minutos subseqüentes aos bochechos, sendo que os mesmos deveriam ser realizados 40 minutos depois da escovação dentária, para que não ocorressem interações químicas entre os componentes flúor e Lauril Sulfato de Sódio (LSS) com o digluconato de clorexidina, diminuindo assim a efetividade do mesmo (BARKVOLL et al., 1989; OWENS et al., 1997; FAVERI et al., 2006b).

3.6.3. Aderência ao tratamento

Os medicamentos foram manipulados especialmente para esta pesquisa, na Farmácia de Manipulação Ervanário (Maringá, PR), com cápsulas de antibióticos e placebo (talco farmacêutico) da mesma coloração e tamanho, estocados em frascos leitosos com 21 unidades cada, devidamente codificados e entregues ao coordenador do estudo. A Clorexidina foi colocada em frascos de 210 ml, quantidade suficiente para uma semana. Todos os medicamentos foram fornecidos gratuitamente aos pacientes, que foram instruídos a relatar eventuais efeitos colaterais ao coordenador, e ao término do período de administração dos medicamentos/placebo, os indivíduos responderam a um questionário de possíveis reações adversas (anexo B), e ao final dos 45 dias, outro para o enxaguatório (anexo C).

A aderência e a motivação do paciente são de suma importância para o sucesso do tratamento e obtenção de dados confiáveis (GUERRERO et al., 2007; HUGOSON et al., 2007), e neste estudo, houve um acompanhamento via telefone realizado por um aluno de iniciação científica durante o período de terapia antibiótica, e os pacientes traziam os frascos vazios para a troca do enxaguatório e confirmação do término das cápsulas.

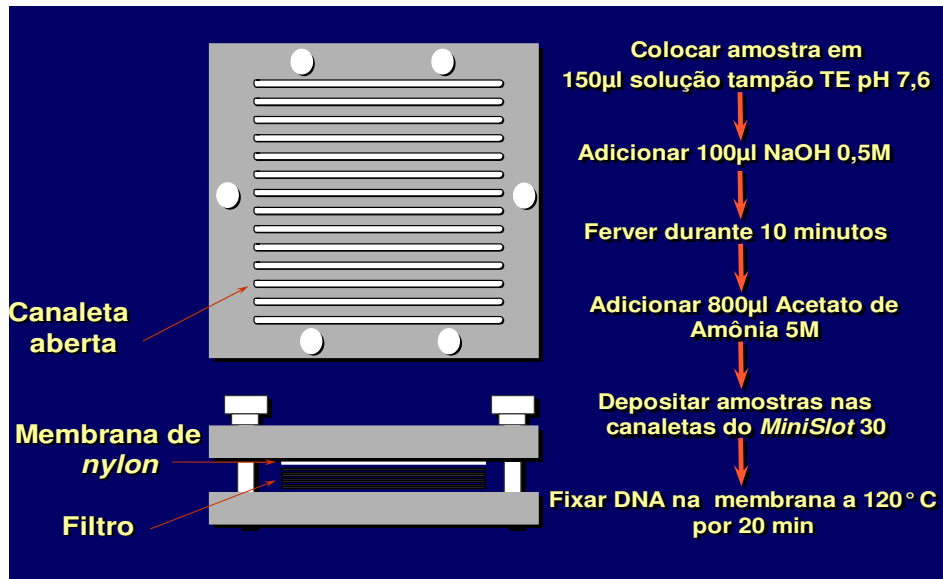
3.7. Monitoramento microbiológico

3.7.1. Análise microbiológica por meio da técnica do *Checkerboard DNA DNA Hybridization* (SOCRANSKY et al., 1994)

As suspensões contendo as amostras de biofilme bacteriano coletado foram fervidas em banho-maria por 10 min e em seguida neutralizadas pela adição de 0,8 ml de 5 M de acetato de amônia. Com isso, as células bacterianas foram lisadas e o DNA ficou suspenso na solução. Cada suspensão do biofilme contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “*Minislot 30*” (*Immunetics, Cambridge, MA, USA*) e o DNA ficou aderido à membrana de nylon (15 X 15 cm) com carga positiva (*Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA*). A membrana foi removida do aparato e o DNA depositado foi então fixado na mesma por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. As duas últimas canaletas do “*Minislot 30*” abrigaram soluções controle, contendo uma mistura das espécies de microrganismos que serão investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas (Figura 2).

3.7.2. Hibridização das membranas com as sondas de DNA:

Após a fixação do DNA nas membranas, essas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1 hora 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, Cambridge, MA, USA*) com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às 45 canaletas desse “*Miniblotter 45*” (Figura 3).



Figura

2.

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

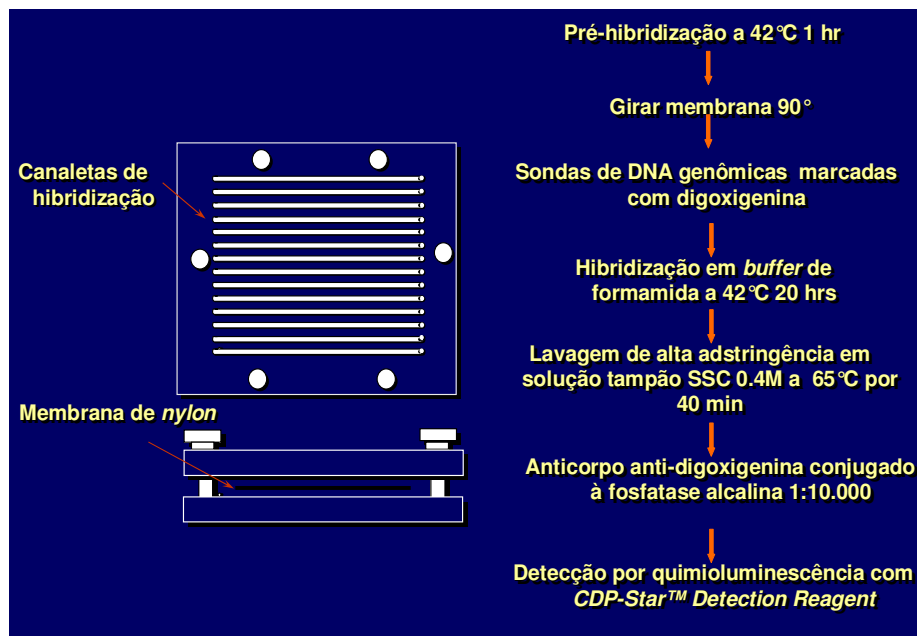


Figura 3. Representação gráfica do *Miniblotter* 45 (Immuntics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

3.7.3. Sondas de DNA:

As sondas de DNA foram confeccionadas usando o “*random primer digoxigenin labeling Kit*” (Boehringer Mannheim). Sondas de DNA específicas para 40 espécies foram usadas nesse estudo (Tabela 1). Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de 10^4 células bacterianas. Suas concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas ficasse semelhante. Cada canaleta do “*Miniblotter 45*” foi então preenchida com 130 μ l de uma determinada sonda, contida numa solução de hibridização (45% 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 sonda de DNA). As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato de xadrez com as linhas de DNA, horizontais, e as sondas, verticais. O aparato, contendo as membranas, foi colocado dentro de um saco plástico para evitar a desidratação das mesmas. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu a 42°C, durante um período mínimo de 20 horas.

3.7.4. Detecção das espécies:

Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do “*Miniblotter 45*” e lavadas por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens de 20 minutos, a 65°C, numa solução adstringente (0.1 X SSC, 0.1% SDS), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas ficaram imersas por 1 hora numa solução contendo 0,1 M ácido maleico, 3M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0, e por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenin conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim), numa diluição de 1/25.000 (ENGLER-BLUM et al., 1993). As membranas foram então lavadas com uma solução de 0.1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0.2 M NaOH, 0.3% Tween 20, pH 8.0, 2 vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0.1 M Tris HCl, 0.1 Na Cl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5. Em seguida, as membranas foram

Tabela 1. Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA separadas por complexos bacterianos (SOCRANSKY et al., 1998).

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

^a ATCC (American Type Culture Collection), ^b Forsyth Institute.

incubadas em uma solução detectora, *Lumi Phos 530* (Lumigen, Southfield, MI, USA), por 45 minutos a 37°C. Finalmente, as membranas foram colocadas num cassete sob um filme radiográfico (KodaK X-OMAT) por aproximadamente 40 minutos, e os filmes revelados logo em seguida (fig. 4).

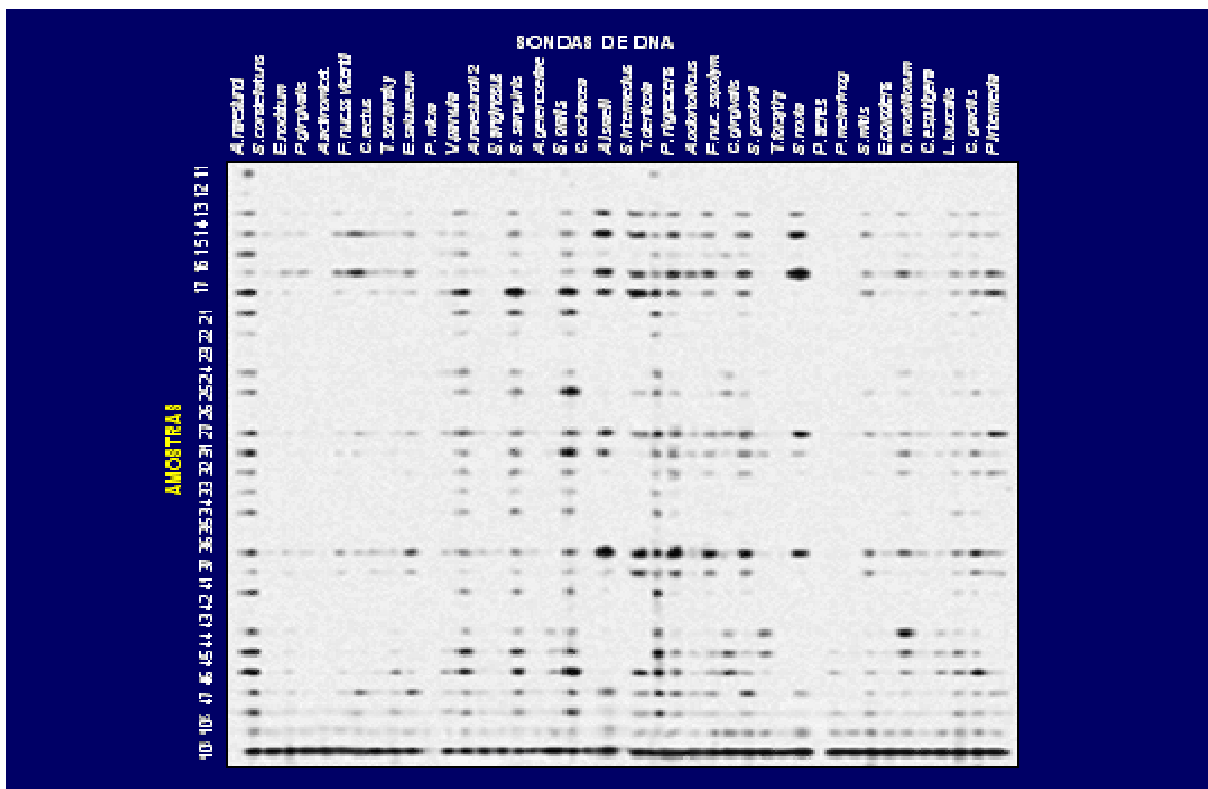


Figura 4. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. O número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células;

2 equivaleu a 10^5 células; 3, entre 10^5 e 10^6 células; 4 a 10^6 células e 5, mais de 10^6 células (Tabela 2). Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas.

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

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

3.8. Análise estatística

3.8.1. Monitoramento clínico

A média das medidas clínicas de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, assim como a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração foram computadas para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. As diferenças dentro de cada grupo, entre os tempos experimentais foram avaliadas utilizando o teste Wilcoxon. O teste Mann–Whitney foi utilizado para examinar diferenças entre os 2 grupos terapêuticos nos dois tempos. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$).

3.8.2. Monitoramento microbiológico

Os dados microbiológicos da análise das 40 espécies bacterianas em 9 amostras de biofilme subgengival por indivíduo foram expressos de 3 maneiras: contagens (níveis), % de contagem das sondas de DNA (proporção) e % de sítios colonizados (prevalência). Todos os dados iniciais (níveis, proporções e prevalência) foram analisados pelo teste de Mann–Whitney para detectar possíveis diferenças significantes entre os 2 grupos terapêuticos.

Para comparar os níveis médios de cada uma das espécies bacterianas, os dados foram expressos como contagem $\times 10^5$ células em cada sítio e foram avaliados por indivíduo e depois entre indivíduos, dentro de cada grupo, em cada tempo do estudo. De maneira semelhante, a proporção e a prevalência de cada espécie foram computadas para cada sítio, depois foram calculadas as médias entre os sítios em cada indivíduo, e então entre os indivíduos de um mesmo grupo terapêutico em cada tempo experimental. Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microrganismos dentro de cada grupo, entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon. Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, considerando $p < 0,00125$ ($p < 0,05$), como proposto por SOCRANSKY et al. (1991).

A significância estatística foi estabelecida em 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados clínicos

As características epidemiológicas e as médias dos parâmetros clínicos observados no exame inicial, nos 2 diferentes grupos de tratamento, controle (n=15) e teste (n=15) estão apresentadas na Tabela 3. Os resultados demonstram que os grupos eram homogêneos em relação aos parâmetros clínicos, visto que não apresentaram diferenças estatísticas no exame inicial.

Tabela 3. Média (\pm DP) dos parâmetros clínicos, no **exame inicial**, para os indivíduos nos 2 grupos terapêuticos.

Variáveis	Grupos terapêuticos		
	(RAR + CLX) n=15	(RAR + M+ A + CLX) n=15	
Gênero (proporção M/F)	4/11	9/6	
Idade (anos) [†]	27,6 \pm 3,56	26,8 \pm 3,95	
PS (mm) [†]	4,15 \pm 0,58	4,27 \pm 0,73	
NCI (mm) [†]	4,22 \pm 0,49	4,49 \pm 0,85	
% sítios			
IPV [†]	62,75 \pm 22,4	61,35 \pm 19,8	
ISG [†]	23,7 \pm 20,4	37,32 \pm 27,2	
SS [†]	63,86 \pm 21,3	77,79 \pm 19,7	
RAR: Alisamento CLX: Sup [†]	3,78 \pm 9,3	1,83 \pm 3,8	Raspagem e Radiculares; Clorexidina

0,12%; M: Masculino; F: Feminino; PS: Profundidade de Sondagem; NCI: Nível Clínico de Inserção; IPV: Índice de Placa Visível; ISG: Índice de Sangramento Gengival; SS: Sangramento à Sondagem; Sup:Supuração.

[†] Teste Mann-Whitney(p>0,05).

A Tabela 4 compara os diferentes tratamentos na avaliação clínica periodontal de 90 dias. Existem diferenças estatísticas entre o grupo teste e o grupo controle em relação à média de profundidade de sondagem. A média de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, sangramento a sondagem e supuração e a média do nível clínico de inserção não apresentaram diferenças entre os grupos terapêuticos.

Tabela 4. Média (\pm DP) dos parâmetros clínicos, no **exame de 90 dias** pós-terapia, para os indivíduos nos 2 grupos terapêuticos.

	Variáveis	Grupos terapêuticos		
		(RAR + CLX) n=15	(RAR + M+ A + CLX) n=15	
RAR:	PS (mm) *	3,23 \pm 0,64	2,66 \pm 0,35	Raspagem e Radicular; Clorexidina de NCI: Nível Inserção; de Placa Índice de
Alisamento CLX:	NCI (mm)	3,50 \pm 0,54	3,19 \pm 0,55	
0,12%; PS:	% sítios			
Profundidade	IPV	34,83 \pm 16,5	34,34 \pm 15,0	
Sondagem;	ISG	5,0 \pm 6,5	3,8 \pm 0,40	
Clínico de	SS	12,5 \pm 11,7	12,2 \pm 13,0	
IPV: Índice	Sup	0,17 \pm 0,07	0 \pm 0	
Visível; ISG:				

Sangramento Gengival; SS: Sangramento à Sondagem; Sup : Supuração.

* Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

A Figura 5 mostra a média dos parâmetros clínicos analisados (índice de placa visível, índice de sangramento gengival, sangramento à sondagem, supuração, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção) nos diferentes grupos terapêuticos, em todos os tempos de avaliação (consulta inicial e 90 dias pós-terapia). As duas modalidades de tratamento levaram a uma redução significativa na média dos parâmetros clínicos periodontais ao final do tempo de avaliação (Teste de Wilcoxon).

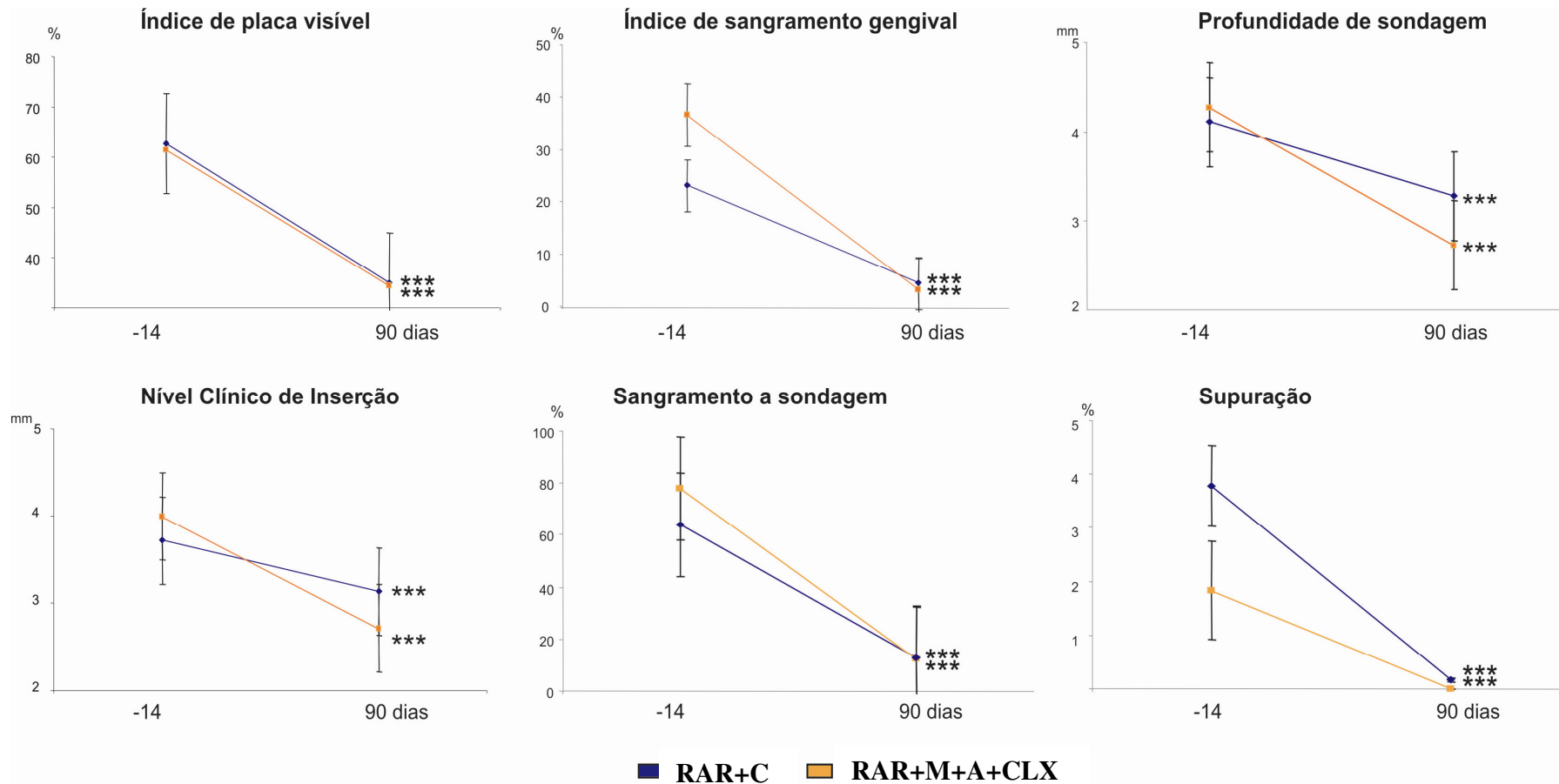


Figura 5. Média dos parâmetros clínicos analisados nos 2 grupos terapêuticos na consulta inicial e 90 dias pós-terapia
 Teste de Wilcoxon : diferenças entre as médias; em cada grupo terapêutico, ao longo do período experimental (**p<0,001).
 RAR:Raspagem e Alisamento Radicular; CLX: Clorexidina; M: Metronidazol; A: Amoxicilina

A Figura 6 mostra as alterações ocorridas entre a consulta inicial e 90 dias pós-terapia, nas médias dos parâmetros de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção (milímetros) e na média do percentual de sítios apresentando sangramento à sondagem, nos 2 grupos terapêuticos. Ambas terapias proporcionaram reduções nas médias dos parâmetros avaliados, sendo que o grupo teste mostrou uma média de redução da profundidade de sondagem e do nível clínico de inserção significativamente maior do que o grupo controle aos 90 dias, para os parâmetros de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção.

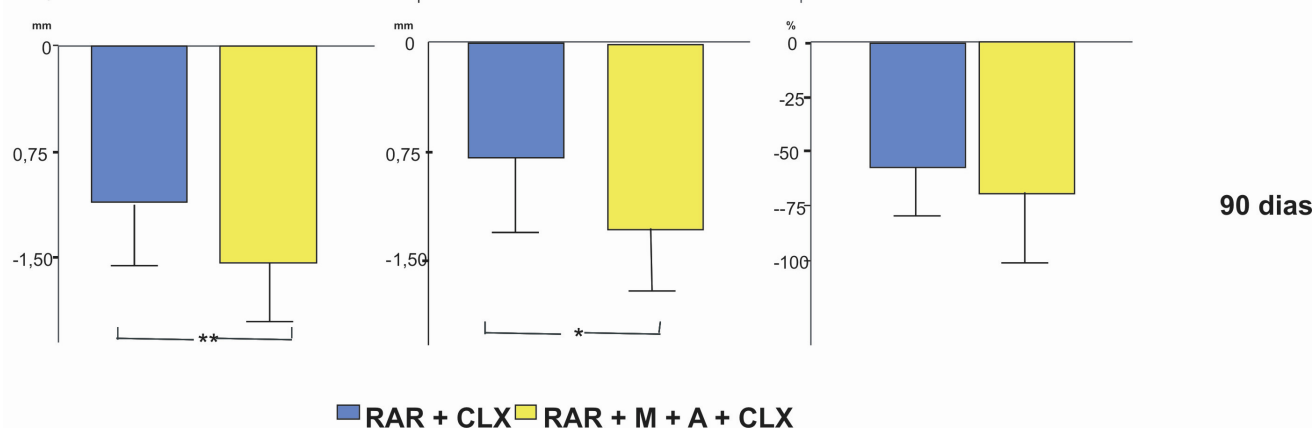


Figura 6. Alterações nas médias de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e média do percentual de sangramento à sondagem ocorridas entre a consulta inicial e 90 dias pós-terapia nos 2 grupos terapêuticos.

RAR: Raspagem e Alisamento Radicular; CLX: Clorexidina; M: Metronidazol;

A: Amoxicilina. Teste Mann-Whitney: diferenças entre os tratamentos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Para um melhor entendimento do efeito das diferentes terapias e para permitir comparações mais claras entre os 2 grupos, os sítios foram divididos em categorias baseadas nos valores iniciais de profundidade de sondagem em bolsas moderadas (PS 4-6mm) e profundas (PS > 6mm). A Figura 7 mostra as alterações ocorridas entre a consulta inicial e 90 dias pós-terapia, nas médias dos parâmetros de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção (milímetros) nos 2 grupos terapêuticos para a categoria de bolsas inicialmente intermediárias e

profundas. Considerando os 2 grupos terapêuticos, ambas as categorias de bolsas mostraram uma redução estatisticamente significativa na média de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção aos 90 dias pós-terapia, com exceção do nível clínico de inserção nas bolsas inicialmente intermediárias.

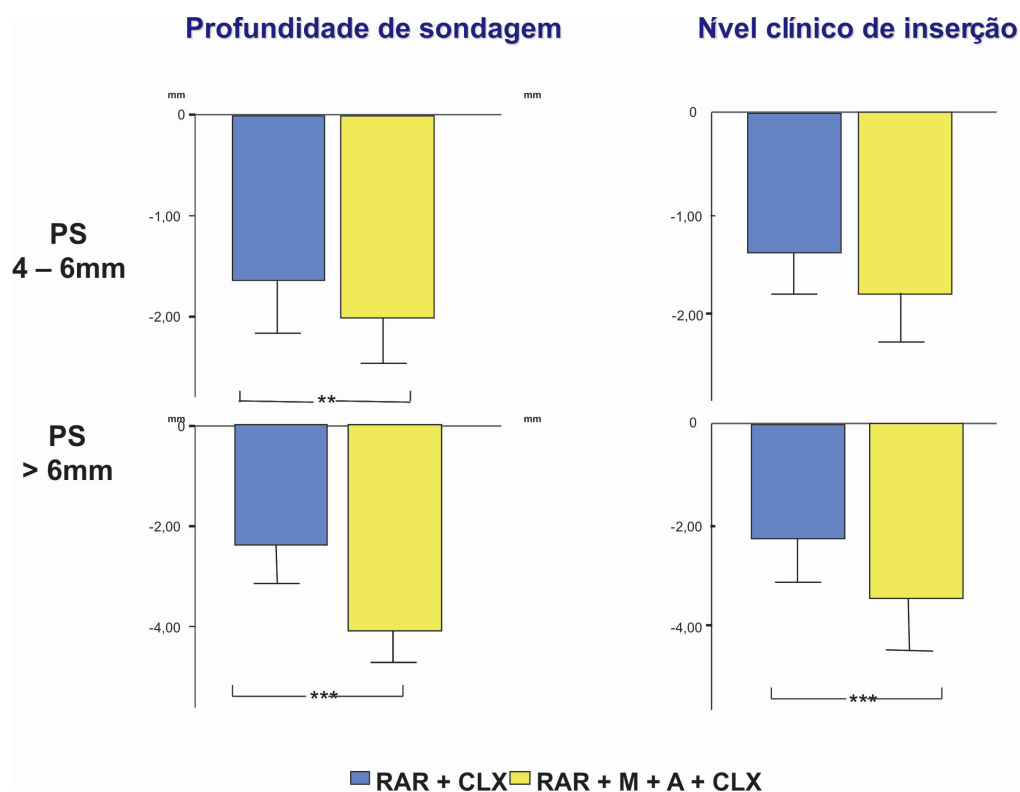
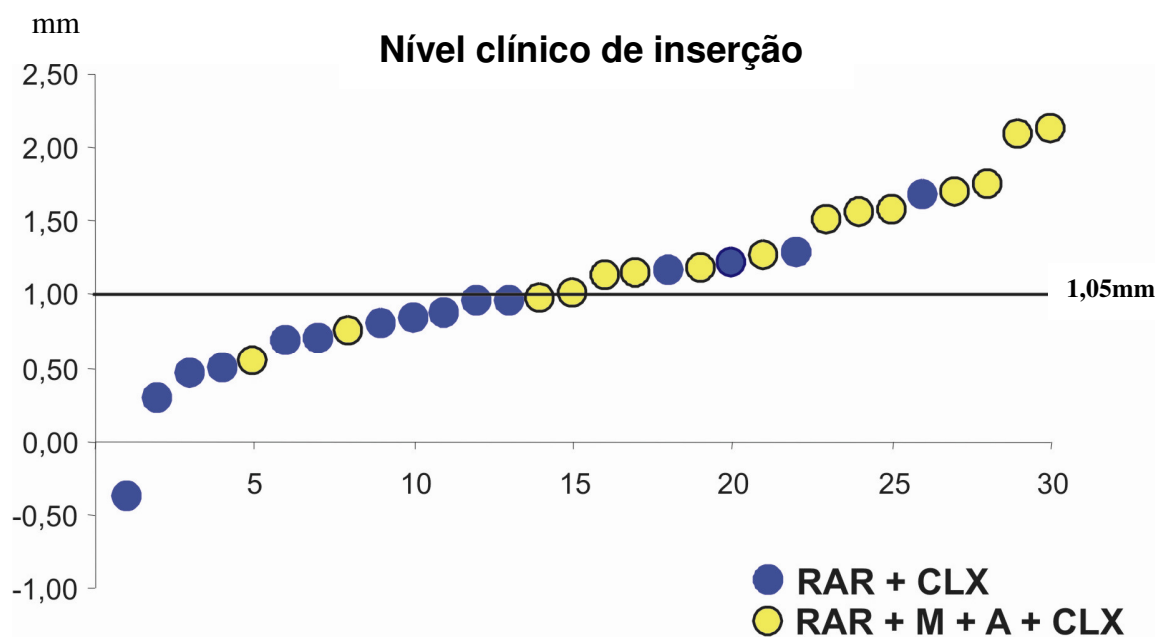


Figura 7. Alterações nas médias de profundidade

de sondagem e nível clínico de inserção ocorridas entre a consulta inicial e 90 dias pós-terapia nos 2 grupos terapêuticos. Teste Mann-Whitney: diferenças entre os tratamentos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). RAR: Raspagem e Alisamento Radicular; CLX: Clorexidina; M: Metronidazol; A: Amoxicilina

A Figura 8 apresenta a alteração na média individual do nível clínico entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia para os 2 grupos terapêuticos. Podemos observar que apenas um indivíduo do grupo controle perdeu inserção 90 dias pós-terapia e onze dos quinze indivíduos do grupo teste ganharam inserção clínica acima do valor da mediana (1,05 mm) correspondente à alteração ocorrida dentre todos os indivíduos do estudo.



4.2. Resultados microbiológicos

Os níveis médios, proporções e prevalência das 40 espécies bacterianas avaliadas nos dois grupos terapêuticos não diferiram significativamente no início do estudo.

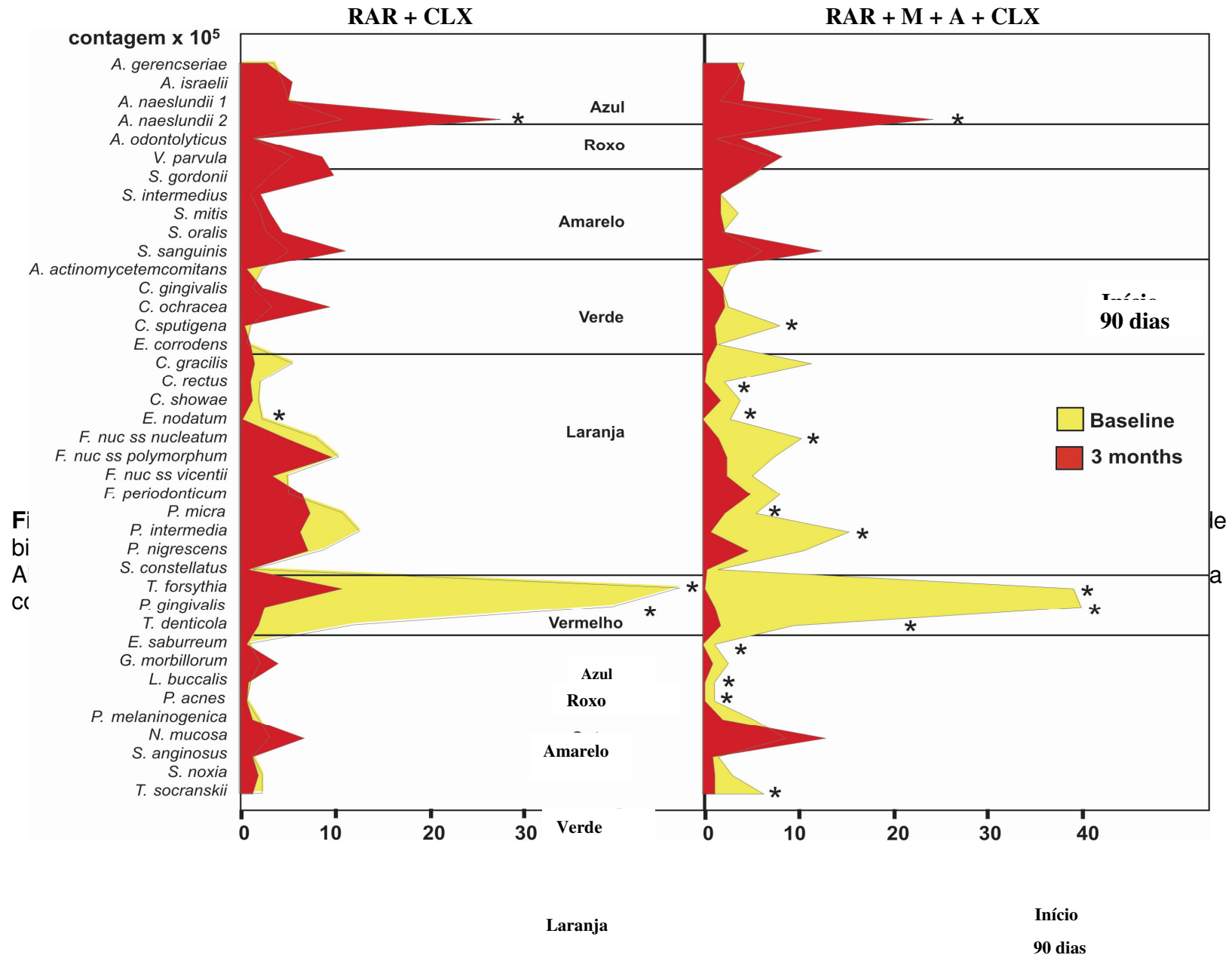
A Figura 9 apresenta a média de contagem ($\times 10^5 \pm$ desvio padrão) das 40 espécies subgingivais no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia para os 2 grupos terapêuticos. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos descritos por SOCRANSKY et al. (1998). De um modo geral, ambas terapias utilizadas levaram a uma redução da contagem dos patógenos do complexo vermelho, porém, apenas o grupo que recebeu a combinação dos 2 antibióticos

reduziu significativamente as 3 espécies deste complexo. Os níveis (contagem $\times 10^5 \pm$ desvio padrão) de *T. forsythia* passaram de $48,2 \pm 25,9$ para $10,6 \pm 12,1$ ($p < 0,05$) no grupo C; de $39,0 \pm 19,3$ para $0,3 \pm 0,7$ ($p < 0,05$) no grupo Teste; *P. gingivalis* passaram de $40,9 \pm 28,4$ para $2,4 \pm 3,6$ ($p < 0,05$) no grupo C, de $39,9 \pm 19,3$ para $1,2 \pm 1,5$ ($p < 0,05$) no grupo Teste; e *T. denticola* passaram de $12,5 \pm 16,4$ para $1,9 \pm 3,1$ ($p > 0,05$) no grupo C, de $9,5 \pm 8,1$ para $1,9 \pm 4,6$ ($p < 0,05$) no grupo Teste. A contagem de 5 espécies do complexo laranja foram significativamente reduzidas no grupo teste (*Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum* e *Fusobacterium nucleatum ss. nucleatum*, *Parvimonas micra* e *Prevotella intermedia*) e apenas 1 espécie no grupo controle (*E. nodatum*). As contagens da maioria das espécies consideradas benéficas dos grupos roxo, amarelo, verde, e espécies de *Actinomyces* não foram afetadas após as terapias, com exceção para *Capnocytophaga sputigena* que apresentou uma redução significativa para o grupo teste e para o *Actinomyces naeslundii 2* que apresentou um aumento significativo para ambos os grupos ($p < 0,05$).

A média da proporção das sondas de DNA das 40 espécies subgingivais no início do estudo e 90 dias pós-terapia está apresentada na Figura 10. Mudanças substanciais ocorreram nas proporções das 3 espécies do complexo vermelho em ambos os grupos ($p < 0,05$). As variações entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia foram as seguintes: *T. forsythia* passou de $19,6 \pm 13,1\%$ para $4,8 \pm 6,0\%$ ($p < 0,05$) no grupo Controle; de $15,6 \pm 10,2\%$ para $1,3 \pm 1,5\%$ ($p < 0,05$) no grupo Teste; *P. gingivalis* passou de $15,6 \pm 10,2\%$ para $1,3 \pm 1,5\%$ ($p < 0,05$) no grupo C, de $16,0 \pm 8,4\%$ para $1,8 \pm 3,8\%$ ($p < 0,05$) no grupo Teste; e *T. denticola* passou de $4,1 \pm 3,3\%$ para $0,8 \pm 0,98\%$ ($p < 0,05$) no grupo Controle e de $3,5 \pm 2,5\%$ ($p < 0,05$) para $0,9 \pm 2,1\%$ no grupo Teste ($p < 0,05$). Além disso, 4 espécies do complexo laranja: *C. rectus*, *E. nodatum* e *F. nucleatum SS. nucleatum*, e *P. intermedia*, tiveram suas proporções reduzidas significativamente no grupo Teste, e apenas 1 espécie do complexo laranja, *E. nodatum*, foi reduzida no grupo Controle. Em contrapartida, 4 espécies relacionadas com saúde gengival tiveram suas proporções aumentadas no grupo Teste, *A. naeslundii 2*, *Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella parvula* e *Streptococcus sanguinis*; e três espécies

tiveram suas proporções aumentadas no grupo controle, *A. naeslundii* 2, *Streptococcus gordonii* e *S. sanguinis*.

A Figura 11 apresenta as proporções dos complexos microbianos no início e aos 90 dias pós-terapia nas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos dos 2 grupos terapêuticos. As áreas dos gráficos foram ajustadas para refletir a contagem total de microrganismos em cada grupo terapêutico, nos 2 tempos experimentais. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos propostos por SOCRANSKY et al. (1998). Pode-se observar que as proporções dos diferentes complexos microbianos foram semelhantes no início do estudo sem diferenças estatísticas entre os 2 grupos experimentais. Os complexos presentes em maiores proporções no início do estudo foram o vermelho e o laranja. Ambas terapias levaram a uma redução significativa nas proporções do complexo vermelho, sendo que essa redução foi ainda mais marcante no grupo Teste (33,8% para 2,8%, $p < 0,001$) do que no grupo Controle (37,2% para 8,15%, $p < 0,05$). Já a proporção do complexo laranja foi afetada somente para o grupo Teste. As proporções dos complexos considerados benéficos, roxo, amarelo, e das espécies *Actinomyces*, representados em azul, aumentaram significativamente após as terapias.



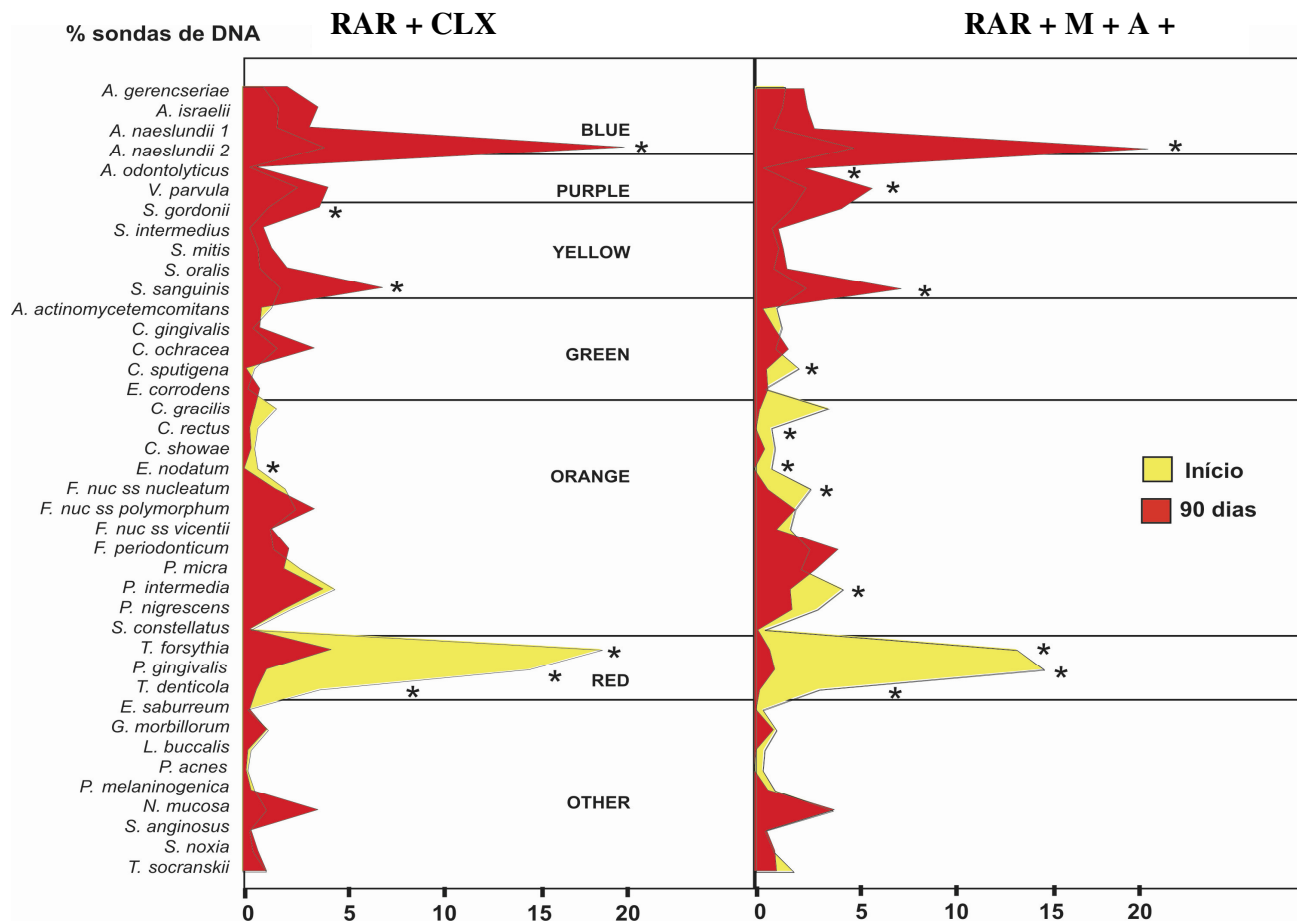


Figura 10. Perfil microbiano das médias de proporção das sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos. RAR: Raspagem e Alisamento Radicular; M: Metronidazol; A: Amoxicilina; CLX: Clorexidina 0,12%. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas. Teste Wilcoxon (* $p < 0,05$).

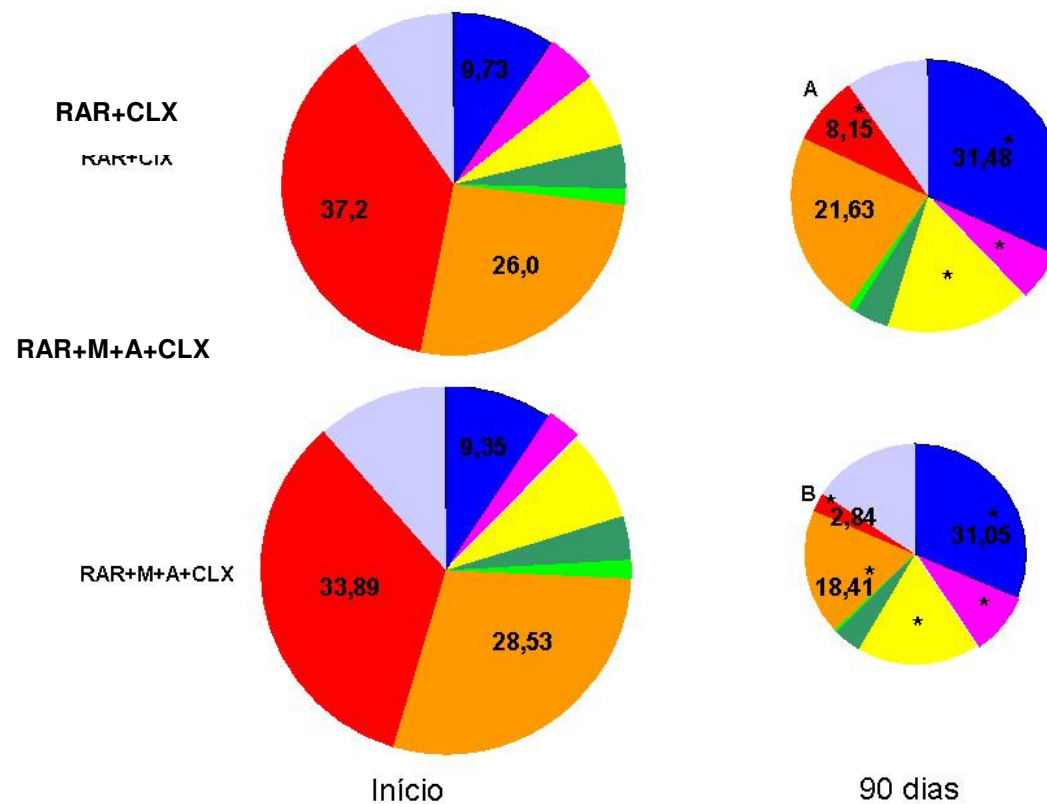


Figura 11. Proporções dos complexos microbianos no início do estudo e 90 dias pós-terapia nas amostras de biofilme subgingival dos indivíduos dos dois grupos terapêuticos. A cor verde claro caracteriza a proporção individual do *A. actinomycetemcomitans*. As áreas dos gráficos foram ajustadas para refletir a quantidade total de microrganismos em cada grupo terapêutico, nos dois tempos experimentais. RAR: Raspagem e Alisamento Radicular; CLX: Clorexidina 0,12%; M: Metronidazol; A: Amoxicilina. Teste Wilcoxon (* $p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças existentes entre os grupos (Mann-Whitney).

De modo geral as duas terapias utilizadas levaram a uma redução, embora não significativa, na contagem e na proporção de *A. actinomycetemcomitans* após o término da terapia inicial (Figuras 9 e 10). Para um melhor entendimento do efeito das diferentes terapias e para permitir comparações mais claras entre os 2 grupos em relação os níveis de contagem do *A. actinomycetemcomitans*, os sítios foram divididos em categorias baseadas nos valores iniciais de profundidade de sondagem em bolsas rasas (PS<3mm), bolsas moderadas (PS 4-6mm) e profundas (PS > 6mm). A Figura 12 apresenta a média de contagem x 10⁵ de *A. actinomycetemcomitans*, em sítios inicialmente rasos, intermediários e profundos para ambos os grupos terapêuticos. Ambas as terapias levaram a uma redução na contagem de *A. actinomycetemcomitans* em todas as categorias de profundidade de sondagem, entretanto esta redução foi significativa apenas para as bolsas inicialmente profundas (p<0,05).

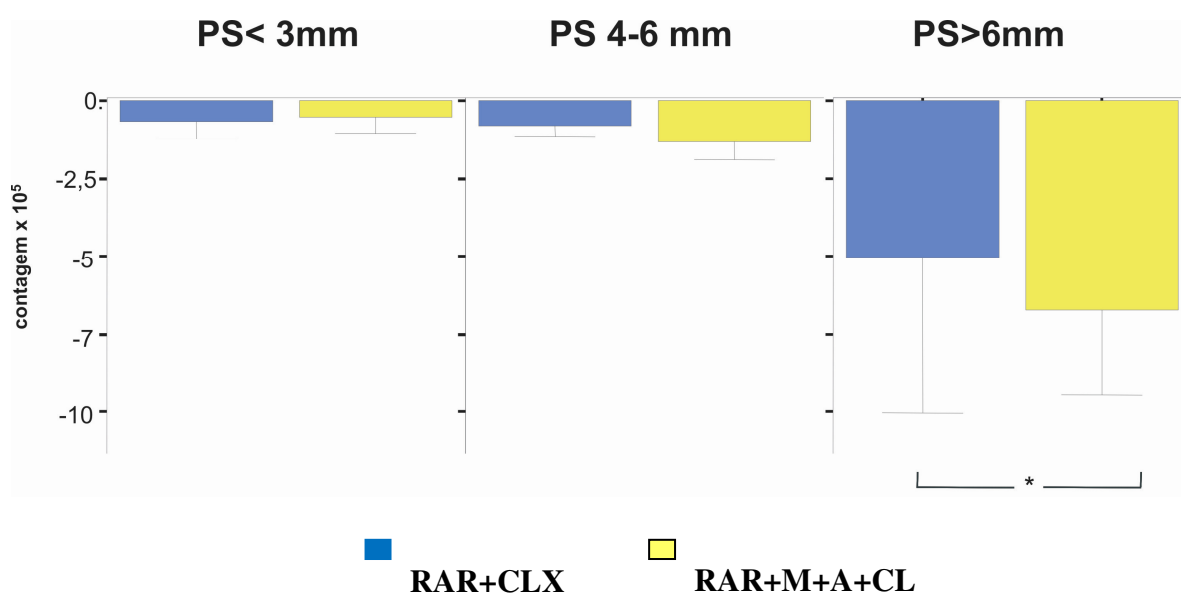


Figura 12. Alterações de redução na média de contagem x 10⁵ de *A. actinomycetemcomitans*, em sítios inicialmente rasos (PS<3mm), intermediários (PS 4-6mm) e profundos (PS>6mm) para ambos os grupos terapêuticos.

Teste Mann-Whitney: diferenças entre os tratamentos (*p<0,05)

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da RAR, associada ou não ao metronidazol e à amoxicilina, em um grupo de indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite agressiva generalizada. O crescente interesse em se definir terapias periodontais mais efetivas para indivíduos com doença periodontal agressiva está relacionado ao fato desses indivíduos não responderem satisfatoriamente às terapias mecânicas tradicionais, como a RAR isoladamente (CALIFANO et al., 2003; SLOTS et al., 2004). Além das limitações próprias aos fatores que dificultam a instrumentação, tais como a anatomia dentária, concavidades, e região de bi e tri-furcações, bolsas estreitas e profundas, estudos demonstraram que indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada possuem níveis e proporções elevados de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, quando comparados a indivíduos com saúde periodontal (MANDELL & SOCRANSKY, 1981; YANG et al., 2005) ou quando comparados a indivíduos com doença periodontal crônica (ZAMBON et al., 1996; CORTELLI et al., 2005; YANG et al., 2005). MOMBELLI et al. (1994) observaram que a RAR isoladamente não conseguia eliminar ou reduzir significativamente estes microrganismos no ambiente subgingival, uma vez que ambos possuem capacidade de invasão celular. Com o objetivo de obter melhores resultados alguns pesquisadores propuseram a associação de metronidazol e amoxicilina no tratamento de pacientes que eram positivos para a presença de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* (MANDELL et al., 1987; NOVAK et al., 1988). Van WINKELHOFF et al. (1989) observaram que essa associação antibiótica conjugada à terapia de raspagem e alisamento radicular apresentava bons resultados contra o *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos que tinham altos níveis e proporções deste patógeno, algo que ambos os antibióticos isolados não conseguiam (PAVICIĆ et al., 1992; WINKEL et al., 1998). Aparentemente, a combinação de um antibiótico direcionado para anaeróbios estritos (metronidazol) e outro para aeróbios ou facultativos (amoxicilina), parece ter um efeito benéfico no tratamento destes indivíduos. Partindo do princípio que indivíduos com doença periodontal agressiva apresentavam uma forte colonização pelo *A. actinomycetemcomitans*, vários estudos intervencionais sem o uso de um grupo controle foram realizados

utilizando a associação de amoxicilina e metronidazol no tratamento da doença periodontal agressiva (MANDELL & SOCRANSKY, 1988; van WINKELHOFF et al., 1992, PAVICIĆ et al., 1992; GORDON et al., 1993). Entretanto, os estudos clínicos randomizados placebo controlados somente foram realizados recentemente (GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIOU et al., 2006). Apesar das terapias de RAR associada ao metronidazol e amoxicilina terem sido apontadas como promissoras no tratamento periodontal de indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada, nenhum estudo até o momento havia comparado de uma forma abrangente os efeitos microbiológicos desta associação.

5.1. Aspectos clínicos periodontais

Apesar de ambas as terapias terem levado a uma redução significativa nas médias de boca toda dos parâmetros de PS e NCI, e no percentual de sítios exibindo sangramento à sondagem (Figura 6), o grupo que recebeu a associação da RAR com antibióticos sistêmicos como parte da terapia mostrou as maiores reduções nesses parâmetros. Nossos resultados corroboram com outros estudos que também sugeriram efeitos clínicos benéficos adicionais à RAR quando indivíduos com periodontite agressiva generalizada foram tratados com a associação de metronidazol e amoxicilina sistêmicos (GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIOU et al., 2006; MOREIRA & FERES-FILHO, 2007, KANER et al., 2007).

GUERRERO *et al.* (2005) e XAJIGEORGIOU *et al.* (2006) avaliaram os efeitos do metronidazol e da amoxicilina associados a terapia mecânica em 20 e 10 indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada, respectivamente. Os autores relataram uma maior redução na PS e no percentual de sítios com SS, e um maior ganho de inserção no grupo de indivíduos que recebeu a associação de metronidazol e amoxicilina do que naqueles que receberam apenas a terapia mecânica, ou outro antibiótico. Em nosso estudo, quando os sítios foram subdivididos de acordo com a PS inicial em moderados (PS 4-6mm) ou profundos (PS>6mm), apesar dos dois grupos terem mostrado melhoras clínicas (Figura 7), a terapia que envolveu o uso dos antibióticos foi mais efetiva em reduzir PS e NCI do que a terapia de RAR

somente. Nas bolsas inicialmente moderadas a combinação do metronidazol e da amoxicilina mostrou ser superior uma vez que reduziu significativamente a PS (-2,03mm) em comparação ao grupo que utilizou somente a terapia mecânica (-1,62mm). As bolsas profundas foram as que mostraram maiores reduções nas médias de PS (-4,31mm) e NCI (-3,84mm), sendo que essas reduções também foram significativamente mais pronunciadas no grupo que utilizou a combinação de antibióticos. Esses resultados corroboram com outros estudos que mostraram melhoras clínicas adicionais da associação de metronidazol e amoxicilina à RAR em bolsas moderadas e profundas (GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIOU et al., 2006; KANER et al., 2007; MOREIRA & FERES-FILHO, 2007). XAJIGEORGIOU et al. (2006) observaram que a combinação de metronidazol e amoxicilina foi a mais eficaz em reduzir o percentual de sítios com profundidade de sondagem > 6 mm e GUERRERO et al. (2005) observaram que indivíduos tratados com a combinação de metronidazol e amoxicilina obtiveram reduções adicionais significativas na profundidade de bolsa de sítios inicialmente profundos (> 6 mm), em comparação ao grupo controle.

5.2. Aspectos microbiológicos

Essa é a primeira investigação que avaliou de forma mais abrangente os efeitos do metronidazol e da amoxicilina na composição da microbiota subgengival de indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada. A utilização de 40 sondas de DNA bacterianos pela técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* permitiu uma avaliação detalhada do efeito das diferentes terapias aqui empregadas na microbiota subgengival desses indivíduos.

Os poucos estudos que avaliaram o efeito do metronidazol em combinação com a amoxicilina sistêmicos na terapia periodontal de indivíduos com periodontite agressiva generalizada, realizaram uma avaliação microbiológica limitada nesses indivíduos. XAJIGEORGIOU et al. (2006) examinaram por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* apenas 4 espécies bacterianas: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T.*

forsythia e *T. denticola*, em um estudo clínico placebo-controlado que utilizou RAR associado ao metronidazol e amoxicilina.

As terapias empregadas no presente estudo levaram a uma redução da quantidade total de microrganismos do ambiente subgingival após o tratamento. Estes resultados eram esperados, uma vez que todos os participantes do estudo receberam RAR como parte da terapia e já esta bem demonstrado na literatura que esse procedimento é capaz de reduzir a quantidade total de bactérias no biofilme dental (HAFFAJEE et al., 1997; CUGINI et al., 2000; MATARAZZO et al., 2008).

Ambas as terapias testadas afetaram a microbiota subgingival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada 90 dias após o tratamento. Os indivíduos que foram submetidos apenas à RAR e ao controle de placa supragingival apresentaram reduções de importantes periodontopatógenos, tais como *T. forsythia* e *P.gingivalis* (Figura 9). Estes resultados corroboram com os achados de Darby et al. (2005) que avaliaram a resposta microbiológica de indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada que foram submetidos somente a RAR e observaram alterações na prevalência de *P.gingivalis* e *T. forsythia* nestes indivíduos.

É interessante observar que o grupo que recebeu a combinação dos 2 antibióticos apresentou as alterações microbiológicas mais benéficas. Os indivíduos do grupo Teste mostraram uma redução mais efetiva nos níveis e proporções dos 3 patógenos do complexo vermelho, *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que também demonstraram uma maior efetividade sobre os patógenos do complexo vermelho quando o metronidazol e a amoxicilina foram utilizados em indivíduos com periodontite agressiva generalizada (XAJIGEORGIU et al., 2006) e periodontite crônica (BERGLUNDH et al., 1998; WINKEL et al., 1997; WINKEL et al., 2001; MATARAZZO et al., 2008). Além disso, conseguiram reduzir significativamente os níveis e a proporção de 5 importantes espécies do complexo laranja (Figuras 9 e 10) e este complexo como um todo (Figura 11).

O papel de bactérias específicas, especialmente do *A. actinomycetemcomitans* na doença periodontal agressiva tem sido extensivamente estudado (ZAMBON et al., 1983; TINOCO et al., 1997; DARBY

et al., 2000; CORTELLI et al., 2005; YANG et al., 2005). No presente estudo, quando observamos os níveis e proporções de *A. actinomycetemcomitans* em todas as amostras coletadas observamos que ambos os grupos reduziram a presença deste patógeno, entretanto sem significância estatística. Estes dados corroboram com os resultados de XAJIGEORGIU et al. (2006) que também não observaram alterações significativas para este patógeno em indivíduos que foram submetidos à terapia de RAR associada ao metronidazol e amoxicilina sistêmicos. Entretanto, quando dividimos as amostras que foram coletadas conforme a profundidade de sondagem inicial, observamos que para os sítios profundos a redução da contagem de *A. actinomycetemcomitans* foi significativamente maior para o grupo Teste em comparação ao grupo Controle (Figura 12). Por meio deste achado, podemos sugerir que os bons resultados clínicos encontrados em bolsas profundas de indivíduos com doença periodontal agressiva submetidos à associação com amoxicilina e metronidazol em comparação a outras terapias (GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIU et al., 2006; MOREIRA & FERES-FILHO, 2007, KANER et al., 2007), possa ser explicado devido ao fato de que o *A. actinomycetemcomitans* tenha sido reduzido significativamente nestas bolsas, como foi o caso no presente estudo.

De uma forma geral, nosso estudo demonstrou o efeito clínico e microbiológico superior da terapia antibiótica associada à terapia mecânica de RAR em comparação à RAR isoladamente. Entretanto, cumpre salientar que os dados desta investigação são preliminares e que futuros estudos com maiores períodos de acompanhamento longitudinal dos indivíduos que participaram deste estudo, serão de extrema importância para garantir se os resultados benéficos da terapia antibiótica observados até o momento serão mantidos por longo período de tempo.

6. CONCLUSÃO

A associação de metronidazol e amoxicilina à RAR foi clínica e microbiologicamente melhor na terapia de indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada aos 90 dias em comparação à RAR apenas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol*. 2003 Dec;74(12):1736-40.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6.

Barkvoll P, Rølla G, Svendsen K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate in vivo. *J Clin Periodontol*. 1989 Oct;16(9):593-5.

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

Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect Immun*. 1994 Feb;62(2):501-8.

Califano JV; Research, Science and Therapy Committee American Academy of Periodontology. Position paper: periodontal diseases of children and adolescents. *J Periodontol*. 2003 Nov;74(11):1696-704.

Christersson LA, Slots J, Zambon JJ, Genco RJ. Transmission and colonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. *J Periodontol*. 1985 Mar;56(3):127-31.

Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy VI. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in

patients with periodontal disease. *Pesqui Odontol Bras.* 2003 Apr-Jun;17(2):183-8.

Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005 Aug;32(8):860-6.

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

Danser MM, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J Periodontol.* 1996 May;67(5):478-85.

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol.* 2000 Jun;27(6):417-24.

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2005 Feb;32(2):200-6.

DiRienzo JM, Slots J, Sixou M, Sol MA, Harmon R, McKay TL. Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun.* 1994 Aug;62(8):3058-65.

Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Müller GA. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem.* 1993 May 1;210(2):235-44.

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

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

Feres M, Haffajee AD, Goncalves C, Allard KA, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 1999 Dec;26(12):775-83.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.* 2001 Jul;28(7):597-609.

Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, Gamonal J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol.* 2005 Feb;76(2):289-94.

Gordon JM, Walker CB. Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal disease. *J Periodontol.* 1993 Aug;64(8 Suppl):760-71.

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

Guerrero A, Echeverría JJ, Tonetti MS. Incomplete adherence to an adjunctive systemic antibiotic regimen decreases clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients: a pilot retrospective study. *J Clin Periodontol.* 2007 Oct;34(10):897-902.

Haas NA, Castro GD, Moreno T, Susin C, Albandar JM, Oppermann R, Rösing K. Azitromycin as an adjunctive treatment of aggressive periodontitis: 12-months randomized clinical Trial. *J Clin Periodontol.* 2008 May;35:696-704.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997 May;24(5):324-34.

Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systemic review. *Ann Periodontol* 2003 Dec; 8:115-181.

Han NM, Xiao XR, Zhang LS, Ri XQ, Zhang JZ, Tong YH, Yang MR, Xiao ZR. Bacteriological study of juvenile periodontitis in China. *J Periodontal Res.* 1991 Sep;26(5):409-14.

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

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

Ishikawa I, Kawashima Y, Oda S, Iwata T, Arakawa S. Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. *J Periodontal Res.* 2002 Oct;37(5):324-32.

[Johansson A, Claesson R, Hanstrom L, Sandstrom G, Kalfas S.](#) Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced by leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 2000 Apr;35(2):85-92.

Kamma JJ, Nakou M, Persson RG. Association of early onset periodontitis microbiota with aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 2001 Dec;28(12):1096-105.

Kamma JJ, Nakou M, Gmür R, Baehni PC. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Oct;19(5):314-21.

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

[Kolodrubetz D, Dailey T, Ebersole J, Kraig E.](#) Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1989 May;57(5):1465-9.

[Lally ET, Golub EE, Kieba IR, Taichman NS, Rosenbloom J, Rosenbloom JC, Gibson CW, Demuth DR.](#) Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

leukotoxin gene. Delineation of unique features and comparison to homologous toxins. *J Biol Chem*. 1989 Sep 15;264(26):15451-6.

Lang N, Barthold, PM Culliman M, et al. Consensus Report: Aggressive periodontitis. *Annals of Periodontology* 1999 Dec; 4: 53.

Lee JW, Choi BK, Yoo YJ, Choi SH, Cho KS, Chai JK, Kim CK. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2003 Sep;74(9):1329-35.

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

López NJ, Mellado JC, Leighton GX. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1996 Feb;23(2):101-5.

Mandell RI, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1981 Oct;52: 593-8.

Mandell RL, Ebersole JL, Socransky SS. Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1987 Oct;14(9):534-40.

Mandell RL, Socransky SS. Microbiological and clinical effects of surgery plus doxycycline on juvenile periodontitis. *J Periodontol*. 1988 Jun;59(6):373-9.

Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):885-96.

[Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ, DiRienzo JM.](#) Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 1999 Mar;67(3):1227-37.

Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. *J Periodontol*. 1994 Sep;65(9):827-34.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:10-21.

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

Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolff LF, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *J Periodontal Res*. 2000 Aug;35(4):232-41.

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

Owens J, Addy M, Faulkner J, Lockwood C, Adair R. A short-term clinical study design to investigate the chemical plaque inhibitory properties of mouthrinses when used as adjuncts to toothpastes: applied to chlorhexidine. *J Clin Periodontol*. 1997 Oct;24(10):732-7.

Paju S, Goulhen F, Asikainen S, Grenier D, Mayrand D, Uitto V. Localization of heat shock proteins in clinical *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains and their effects on epithelial cell proliferation. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Jan 15;182(2):231-5.

Pavčić MJ, van Winkelhoff AJ, de Graaff J. In vitro susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Dec;36(12):2634-8.

Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 2001 Jun;28(6):499-507.

Russo PA, Nowzari H, Slots J. Transmission and persistence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in twins with advanced periodontitis. *J Calif Dent Assoc*. 1998 Apr;26(4):290-4.

Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun*. 1980 Sep;29(3):1013-20.

Slots J; Research, Science and Therapy Committee. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol*. 2004 Nov;75(11):1553-65.

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

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

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

Sugai M, Kawamoto T, Pérès SY, Ueno Y, Komatsuzawa H, Fujiwara T, Kurihara H, Suginaka H, Oswald E. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun*. 1998 Oct;66(10):5008-19.

Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *J Periodontol*. 2003 Oct;74(10):1460-9.

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

Tinoco EM, Beldi MI, Loureiro CA, Lana M, Campedelli F, Tinoco NM, Gjermo P, Preus HR. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. *Eur J Oral Sci*. 1997 Feb;105(1):9-14.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):39-53.

Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Gonçalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002 Mar;29(3):233-9.

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

van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, de Graaff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. J Periodontol. 1992 Jan;63(1):52-7.

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Vangsted T, Van der Velden U. Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. J Clin Periodontol. 1997 Aug;24(8):573-9.

Winkel EG, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. J Clin Periodontol. 1998 Nov;25(11 Pt 1):857-64.

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. J Clin Periodontol. 2001 Apr;28(4):296-305.

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

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

Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. Eur J Oral Sci. 2005 Feb;113(1):28-33.

Zambon JJ, Christerson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J Periodontol. 1983 Dec;54(12):707-11.

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol. 1985 Jan;12(1):1-20.

Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. Ann Periodontol. 1996 Nov;1(1):879-925.

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

Guarulhos, 08 de novembro de 2007.

Exmo. Sr.
Prof. Marcelo de Faveri**PARECER Nº 156/2007**

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

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

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

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

Luciene Cristina de Figueiredo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B – QUESTIONÁRIO EFEITOS ADVERSOS (MEDICAMENTOS)			
Nome: _____		Data: ____ / ____ / ____	
Marque um X na resposta para cada uma das perguntas abaixo:	SIM C/T	NÃO C/T	NÃO SEI C/T
1) Você conseguiu tomar os medicamentos como lhe foi orientado?	14/15	1/0	0/0
2) Você sentiu algum mal-estar devido ao medicamento que tomou?	2/1	13/14	0/0
3) Sentiu náuseas ou vômito?	0/1	15/14	0/0
4) Teve diarreia neste período?	1/0	14/15	0/0
5) Sentiu algum gosto metálico na boca?	2/3	13/12	0/0
6) Sentiu dor de cabeça ou tontura?	0/0	15/15	0/0
7) Caso tenha sentido algum dos problemas das perguntas anteriores, isso atrapalhou o seu dia-a-dia?	0/0	15/15	0/0
8) Os medicamentos provocaram mau humor ou irritação?	0/0	15/15	0/0
9) Sentiu fraqueza ou falta de ânimo para o trabalho?	0/0	15/15	0/0
10) Teve sono excessivo devido aos medicamentos?	0/0	15/15	0/0
11) Os horários dos medicamentos prejudicaram o seu dia-a-dia?	0/0	15/15	0/0
12) Você tomaria os medicamentos novamente caso fosse necessário?	15/15	0/0	0/0

ANEXO C – QUESTIONÁRIO EFEITOS ADVERSOS (BOCHECHOS)

Nome: _____ Data: ___/___/___

Marque um X na resposta para cada uma das perguntas abaixo:	SIM	NÃO	NÃO SEI
1) Sentiu gosto metálico na boca?	7	22	1
2) Sentiu sensação de ardência?	18	12	0
3) Percebeu descamação na mucosa?	7	22	1
4) Sentiu alteração de paladar?	26	4	0
5) Seus dentes mancharam?	25	5	0
6) Sua língua manchou?	7	23	0
7) O uso do bochecho provocou mau humor?	0	30	0
8) Os horários prejudicaram o seu dia-a-dia?	2	28	0