



LAUREN CHRISTINE GURSKY

**EFEITO DO CONTROLE DA PLACA SUPRAGENGIVAL NA  
RECOLONIZAÇÃO BACTERIANA SUBGENGIVAL APÓS  
RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULARES**

Guarulhos  
2005



LAUREN CHRISTINE GURSKY

**EFEITO DO CONTROLE DA PLACA SUPRAGENGIVAL NA  
RECOLONIZAÇÃO BACTERIANA SUBGENGIVAL APÓS  
RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Periodontia.

1º Orientador: Profª Drª Magda Feres

2º Orientador: Profª Drª Luciene Figueiredo

Guarulhos  
2005

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Magda Feres

\_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia P. Alves Mayer

\_\_\_\_\_

Prof Dr Jamil Awad Shibli

\_\_\_\_\_

Dedico este trabalho a meus pais, Lauro e Vera, que sempre incentivaram meus sonhos e me apoiaram em minhas decisões. Meu mais sincero agradecimento pela bênção de seu amor incondicional e fé infindável em minha capacidade de aprimoramento profissional e pessoal.

## AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Dra. Magda Feres, minha gratidão pela disponibilidade, incentivo e oportunidade de realização deste antigo desejo que era ingressar no Curso de Mestrado. Minha profunda admiração por seu exemplo de competência profissional e humana.

À professora e co-orientadora Dra. Luciene Cristina de Figueiredo, pela constante disponibilidade e ensinamentos transmitidos ao longo do curso, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

Aos demais professores do Curso de Mestrado em Odontologia da UnG, meu agradecimento pelos conhecimentos compartilhados e pelo apoio e receptibilidade demonstrados nestes anos de convívio.

Aos professores Dr. Ricardo Grein, Karima Jaber e Milton Sáber, pelo incentivo à continuidade dos meus estudos.

À bióloga Izilvania Q. Barreto, por sua essencial e insubstituível ajuda durante a realização da fase laboratorial do trabalho.

Ao colega Marcelo, meu agradecimento e admiração pelo companheirismo e competência durante a fase clínica desta pesquisa, bem como durante a análise de dados.

Aos demais colegas do Curso de Mestrado em Odontologia da UnG, com os quais compartilhei momentos não só de enriquecimento intelectual mas também de extrema amizade, afinidade e carinho, sentimentos estes que seguirão verdadeiros por toda a minha vida, mesmo que à distância.

Aos alunos de iniciação científica Priscila, Francine, Viviane e Lázaro, cuja ajuda foi indispensável para a realização da parte clínica da pesquisa.

À Fernanda, secretária da Pós-graduação, e aos funcionários da Clínica de Odontologia da UnG, meu agradecimento pela presença e apoio durante os anos de Curso.

Aos voluntários da pesquisa, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Acima de tudo, a Deus, por me dar a vontade, a força e os meios para a superação dos obstáculos.

*“ Ninguém o pode retirar do lugar em que se encontra guardado; não pode ser destruído pelo fogo; os maiores reis não podem privar dele as pessoas que incorrem na cólera real; é (portanto) o saber que cada um deveria legar a seus filhos. Não existe outra verdadeira riqueza.”*

**Naladyar**

Séc. III ou IV d. C.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações na composição da microbiota subgengival após raspagem e alisamento radiculares (RAR) somente ou em combinação com profilaxia profissional e/ou bochecho com clorexidina a 0,12%. Foram selecionados 57 voluntários com periodontite crônica e aleatoriamente distribuídos em 4 grupos terapêuticos: Controle (n=15): RAR + bochecho com placebo 2x/dia (P); Teste 1 (n=14): RAR + bochecho com clorexidina 0,12% 2x/dia (CLX); Teste 2 (n=14): RAR + profilaxia profissional periódica 2x/semana (PPP) e Teste 3 (n=14): RAR + CLX + PPP. Os procedimentos de controle de placa supragengival foram iniciados juntamente com a RAR e prosseguiram após seu término por 42 dias. Amostras de placa subgengival foram coletadas no início do estudo, ao final da RAR, 42 e 63 dias após e avaliadas para 38 espécies bacterianas por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Os grupos Teste 1 e 3, que utilizaram clorexidina, tiveram as alterações mais benéficas na recolonização subgengival. Além de terem apresentado redução significativa em um maior número de espécies quando comparados com os grupos Teste 2 e C, reduziram com mais efetividade a contagem total de bactérias após a terapia inicial. Todas as terapias reduziram os níveis dos 3 patógenos do complexo vermelho, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola* após RAR. Esses resultados foram mantidos de forma significativa, aos 63 dias, nos grupos Teste 1 e 3. Porém, neste tempo, não houve diferença significativa para *T. denticola* no grupo C e para *T. denticola* e *P. gingivalis* no grupo Teste 2. Os níveis de outros patógenos periodontais como *P. acnes* e *P. melaninogenica* também foram reduzidos nos grupos Teste 1 e 3. Espécies consideradas benéficas, como *V. parvula* e *S. sanguinis* foram encontradas em níveis mais altos do que no início do estudo nesses 2 grupos terapêuticos, enquanto que nos grupos C e Teste 2 foram minimamente afetadas. Estes resultados sugerem que a utilização da clorexidina tem efeito benéfico na recolonização subgengival pós-terapia periodontal, em indivíduos com periodontite crônica não tratados previamente.

**Palavras-chaves:** microbiota subgengival, clorexidina, profilaxia dentária.

## ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate changes in the composition of the subgingival microbiota after scaling and root planing (SRP) alone or combined with professional supragingival plaque removal and/or rinsing with 0,12% chlorhexidine. Fifty seven volunteers with chronic periodontitis were selected and randomly assigned to 4 therapeutic groups: Control (n=15): SRP+placebo rinses 2x/day (P); Test 1 (n=14): SRP+chlorhexidine rinses 2x/day (CHX); Test 2 (n=14): SRP+P+professional supragingival plaque removal 2x/day (PPR) and Test 3 (n=14): SRP+CHX+PPR. The PPR and the rinsing begun with the SRP therapy and continued for 42 days after the end of this procedure. Subgingival plaque samples were collected at baseline, after SRP, 42 and 63 days later and analyzed for the content of 38 bacterial species using the Checkerboard DNA-DNA Hybridization technique. Groups Test 1 and 3, which rinsed with chlorhexidine, showed the most beneficial changes in the recolonization of subgingival sites. Besides having showed a greater number of species significantly reduced when compared to groups Test 2 and C, those therapies were more effective in reducing total bacterial counts after initial therapy. All treatment modalities reduced the levels of the 3 red complex pathogens, *P.gingivalis*, *T. forsythensis* and *T. denticola*, after SRP. These results were significantly maintained up to 63 days in groups Test 1 and 3. However, at this time point there were no significant differences for *T. denticola* in group C and for *T. denticola* and *P. gingivalis* in group Test 2. The levels of other periodontal pathogens such as *P. acnes* and *P. melaninogenica* were also reduced in groups Test 1 and 3. Species considered being beneficial, such as *V. parvula* and *S. sanguinis* were found in these groups in higher levels, when compared to baseline, whereas in groups C and Test 2 these species were minimally affected. These results suggest that the use of chlorhexidine exerts a positive effect in the subgingival recolonization after periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis who have not been treated before.

**Key-words:** subgingival microbiota, chlorhexidine, supragingival plaque control.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA.....18
- Tabela 2.** Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de placa subgengival..... 24
- Tabela 3.** Média ( $\pm$  dp) dos parâmetros clínicos, no exame inicial, dos indivíduos nos grupos terapêuticos.....26

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Delineamento experimental.....13
- Figura 2.** Representação gráfica do *Minislot* (Immunitics, Cambridge, MA, USA) e resumo da preparação e deposição das amostras de placa bacteriana subgingival (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).....20
- Figura 3.** Representação gráfica do *Miniblotter* (Immunitics, Cambridge, MA, USA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgingival (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).....21
- Figura 4.** Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de placa e as sondas de DNA (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).....22
- Figura 5.** Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de placa e as sondas de DNA (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).....23
- Figura 6.** Gráfico de barras das médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgingival no início do estudo (-21), ao final da terapia inicial (0), 42 e 63 dias após, nos indivíduos do grupo controle (C).....67
- Figura 7.** Gráfico de barras das médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgingival no início do estudo (-21), ao final da terapia inicial (0), 42 e 63 dias após, nos indivíduos do grupo T1.....68
- Figura 8.** Gráfico de barras das médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgingival no início do estudo (-21), ao final da terapia inicial (0), 42 e 63 dias após, nos indivíduos do grupo T2.....69
- Figura 9.** Gráfico de barras das médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgingival no início do estudo (-21), ao final da terapia inicial (0), 42 e 63 dias após, nos indivíduos do grupo T3.....70
- Figura 10.** Alterações nas médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 3 patógenos do complexo laranja, *C. rectus*, *F. nucleatum ss vincentii* e *E. nodatum*, nos grupos terapêuticos, em todos os tempos do estudo.....71
- Figura 11.** Alterações nas médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) da espécie *A. actinomycetemcomitans*, nos grupos terapêuticos, em todos os tempos do estudo.....72
- Figura 12.** Alterações nas médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 3 espécies consideradas benéficas, *V. parvula*, *S. sanguinis* e *S. oralis*, nos grupos terapêuticos, em todos os tempos do estudo.....73
- Figura 13.** Média das proporções dos complexos microbianos descritos por Socranky *et al.* (1998), presentes nas amostras de placa subgingival dos indivíduos de cada grupo terapêutico, em todos os tempos do estudo.....74

## SUMÁRIO

<b>1 INTODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Etiologia da doença periodontal</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 Métodos para avaliação da composição da placa bacteriana</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Complexos microbianos na placa subgengival</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 Terapia periodontal</b> .....	<b>5</b>
1.4.1 Raspagem e alisamento radiculares .....	5
1.4.2 Controle de placa supragengival .....	6
1.4.3 Antissépticos orais no controle da placa bacteriana .....	8
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1 Seleção de pacientes</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2 Critérios de inclusão e exclusão</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3 Delineamento experimental</b> .....	<b>12</b>
<b>3.4 Seleção dos sítios-teste</b> .....	<b>14</b>
<b>3.5 Avaliação clínica</b> .....	<b>14</b>
<b>3.6 Procedimentos terapêuticos</b> .....	<b>15</b>
3.6.1 Terapia periodontal básica .....	15
3.6.2 Bochechos com soluções de clorexidina a 0,12% ou placebo .....	15
3.6.3 Profilaxia profissional periódica .....	16
<b>3.7 Monitoramento microbiológico</b> .....	<b>16</b>
3.7.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento .....	16
3.7.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas .....	17
3.7.3 Coleta dre amostras de placa subgengival.....	19
3.7.4 <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> .....	19
<b>3.8 Análise estatística</b> .....	<b>24</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 Efeitos das terapias nas contagens bacterianas</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2 Efeitos das terapias nas proporções dos complexos microbianos</b> ...	<b>28</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença periodontal acomete as estruturas de proteção e sustentação dos dentes e tem como fator etiológico microrganismos específicos presentes na placa bacteriana supra e subgengivais (Løe *et al.*, 1965; Socransky, 1970; Listgarten *et al.*, 1978; Loesche *et al.*, 1985; Socransky & Haffajee, 1994; Haffajee & Socransky, 1994; Socransky *et al.*, 1998). O reconhecimento da especificidade da placa dental associada a diferentes formas da doença periodontal tem levado tanto pesquisadores quanto clínicos ao estudo e elaboração de formas terapêuticas mais direcionadas.

Apesar da etiopatogenia da doença periodontal ser conhecida e há muito estudada, até os dias atuais ainda não foi estabelecida uma forma definitiva de terapia. Dentre os métodos mais comumente utilizados para o tratamento e manutenção de um periodonto saudável estão os procedimentos de raspagem e alisamento radiculares e métodos de controle de placa mecânicos (Badersten *et al.*, 1984; Lindhe & Nyman, 1985; Rams & Slots, 1996; Haffajee *et al.*, 1997a; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000a; Petersilka *et al.*, 2002) e químicos, como o uso de antissépticos orais (Briner *et al.*, 1986; Segreto *et al.*, 1986; Gjermo, 1989; Maruniak *et al.*, 1992; Eaton *et al.*, 1997; Sekino *et al.*, 2003). Dos antissépticos orais mais utilizados, destaca-se a clorexidina. Seu largo espectro antimicrobiano e excelente capacidade de adsorção auxiliam no controle da placa bacteriana levando a melhoras nos parâmetros clínicos de inflamação (Addy & Wright, 1978; Oppermann, 1979; Maruniak *et al.*, 1992; Joyston-Bechal & Hernaman, 1993; Christie *et al.*, 1998).

Estudos mostraram que a microbiota da placa supragengival exerce influência na composição da placa subgengival, e acredita-se que a recorrência da doença periodontal pode ser atribuída à recolonização por periodontopatógenos dos sítios tratados (Westfelt *et al.*, 1998; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000b). Sabe-se que o controle de placa supragengival é importante na manutenção da saúde dos tecidos periodontais (Lindhe & Nyman, 1975; Tabita *et al.*, 1981; Hellström *et al.*, 1996). Porém, o papel exato das bactérias presentes no ambiente supragengival na composição da microbiota subgengival, durante e logo após a terapia periodontal, ainda está por ser definido.

### **1.1. Etiologia da doença periodontal**

Foi demonstrado por meio de diversos estudos que a doença periodontal é uma infecção bacteriana (Ash *et al.*, 1964; Keyes & Jordan, 1964; Listgarten, 1965; Gibbons e Socransky, 1966; Newman & Socransky, 1977; Slots, 1977; Tanner *et al.*, 1979; Haffajee & Socransky, 1994; Socransky & Haffajee, 1994, Loesche e Grossman, 2001; Socransky & Haffajee, 2002). O clássico estudo de “gingivite experimental” de Løe *et al.* (1965) mostrou que o acúmulo de placa bacteriana na ausência de métodos de higiene oral, em indivíduos saudáveis, por um período de 21 dias, leva invariavelmente à instalação de um processo inflamatório gengival. Este mesmo estudo demonstrou que a remoção da placa e a reinstalação de hábitos de higiene bucal são capazes de reverter o processo inflamatório. Contudo, naquela época, acreditava-se que as doenças periodontais eram oriundas de um supercrescimento da placa bacteriana, de forma que qualquer microrganismo presente no ambiente subgengival poderia estar contribuindo ativamente para a destruição tecidual. Este conceito ficou conhecido como “Hipótese da Placa Não-específica” (Theilade, 1986). Todavia, investigações epidemiológicas realizadas na década de 80 vieram a contradizer esta hipótese (Løe *et al.*, 1986; Baelum *et al.*, 1988). Nestes estudos foram observados indivíduos que, mesmo com uma quantidade considerável de placa bacteriana, não desenvolviam a doença periodontal, enquanto outros indivíduos com quantidades menores de placa apresentavam uma rápida destruição periodontal. Nesta mesma época outros estudos microbiológicos reconheceram certas manifestações periodontais, tais como a “periodontite juvenil localizada” e a “gingivite ulcerativa necrosante”, como sendo entidades clínicas distintas, causadas por microrganismos específicos (Listgarten, 1965; Slots, 1976; Haffajee *et al.*, 1984; Mandell *et al.*, 1987). Retomou-se, então, o conceito da especificidade microbiana da doença periodontal, que ficou conhecido como “Hipótese da Placa Específica” (Loesche, 1976). Esta hipótese é aceita até os dias atuais e sugere que a placa bacteriana subgengival presente em lesões de periodontite é tanto qualitativa quanto quantitativamente diferente da placa presente em sítios saudáveis (Rosenberg *et al.*, 1981; Hinrichs *et al.*, 1985; Dzink *et al.*, 1988; Adriaens *et al.*, 1988; Albandar *et al.*, 1990; Christersson *et al.*, 1992; Loesche, 1992) e que diferentes formas da doença estão associadas a diferentes espécies bacterianas ou grupos de bactérias (Loesche *et al.* 1985; Marsh, 1992; Haffajee & Socransky, 1994; Socransky *et al.*, 1998). Sabe-se hoje que apesar de mais de 600

espécies bacterianas terem sido isoladas e identificadas na cavidade bucal (Slots, 1977; Moore *et al.*, 1987; Loesche & Kazor, 2002), nem todas possuem papel determinante na etiologia da doença periodontal.

## **1.2. Métodos para avaliação da composição da placa bacteriana**

Inúmeros métodos foram e têm sido utilizados para a identificação dos microrganismos bucais. As microscopias de contraste de fase e de campo escuro podem demonstrar diferenças de tamanho, forma e motilidade dos microrganismos presentes na placa bacteriana. Porém, estes métodos microscópicos não diferenciam as espécies bacterianas (Loesche *et al.*, 1985; Beltrami *et al.*, 1987; Omar *et al.*, 1990; Furuichi *et al.*, 1997; Dahan *et al.*, 2004). A utilização do método de cultura, considerado um *gold standard*, é capaz de identificar diversos microrganismos presentes na placa bacteriana, além de ser extremamente importante para a busca de novas espécies e para a determinação da susceptibilidade microbiana à diferentes antibióticos (Newman & Socransky, 1977; Ali *et al.*, 1992; Lie *et al.*, 1995). Entretanto, a maior parte dos estudos em periodontia que utilizaram métodos tradicionais de diagnóstico microbiológico enfrentou uma série de limitações. O método de cultura bacteriana, por exemplo, possibilita a avaliação de um número limitado de amostras e espécies bacterianas devido ao fato de ser extremamente trabalhoso e custoso. Além disso, grande parte dos patógenos periodontais é anaeróbia estrita, bactérias difíceis de serem isoladas e cultivadas em meios de ágar.

Assim sendo, foram desenvolvidas técnicas imunológicas e de biologia molecular para diagnóstico microbiológico, como anticorpos monoclonais (Kamyia *et al.*, 1994; Graber *et al.*, 1999; Booth & Lehner, 1997), oligonucleotídeos sintéticos, como os utilizados na “Reação em Cadeia da Polimerase”- PCR (Okada *et al.*, 2001) e sondas de DNA (Socransky *et al.*, 1994). O desenvolvimento destas tecnologias vem proporcionando um exame mais detalhado da composição da placa bacteriana supra e subgingivais e uma avaliação mais eficaz do efeito de diversas terapias periodontais, sobrepondo grande parte dos problemas relacionados à necessidade de cultivo dos microrganismos.

O método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi desenvolvido por Socransky *et al.* (1994) e utiliza sondas de DNA para a identificação de até 40 espécies bacterianas em 28 amostras de placa bacteriana por teste. Esta técnica

permite a elaboração de estudos microbiológicos de grande porte em periodontia, por meio da avaliação de um grande número de amostras e de microrganismos orais. As maiores vantagens deste método de diagnóstico incluem a rápida identificação e a quantificação dos microrganismos presentes nas amostras, a identificação de bactérias difíceis de serem cultivadas e o baixo custo. Sendo assim, o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* tem sido utilizado com sucesso na avaliação sistemática dos efeitos de diversas terapias periodontais na composição da microbiota subgengival (Haffajee *et al.*, 1997a, b; Feres *et al.*, 1999; Cugini *et al.*, 2000; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000a; Feres *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Papapanou *et al.* em 1997 comparou a técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* com métodos de cultura. Foi observado por estes autores que tal metodologia resultou em contagens bacterianas significativamente mais altas do que a cultura para a grande maioria das espécies testadas, como por exemplo *Tannerella forsythensis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*.

### **1.3. Complexos microbianos na placa subgengival**

Os estudos que avaliaram a composição da placa bacteriana demonstraram haver uma grande variedade de microrganismos presentes neste ecossistema (Slots, 1977; Tanner *et al.*, 1977; Rosenberg *et al.*, 1981; Moore *et al.*, 1982; Moore *et al.*, 1983; Moore *et al.*, 1987; Dzink *et al.*, 1988; Haffajee & Socransky, 1994; Socransky *et al.*, 1998; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000b). Aqueles feitos com microscopia, tanto óptica quanto eletrônica, demonstraram existir uma seqüência no padrão de colonização das espécies bacterianas nas superfícies dentárias (Listgarten *et al.* 1978; Hinrichs *et al.*, 1984; Müller *et al.*, 1986). Outras investigações que utilizaram cultura bacteriana, métodos imunológicos ou sondas de DNA demonstraram que certas espécies freqüentemente ocorrem juntas na placa subgengival (Gmur *et al.*, 1989; Sbordone *et al.*, 1990; Ali *et al.*, 1994; Socransky *et al.*, 1998; Quirynen *et al.*, 2000 ; Ramberg *et al.*, 2003).

Socransky *et al.* (1998) examinaram as relações existentes entre as espécies bacterianas na placa subgengival, utilizando o método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Foram avaliadas 13.261 amostras de placa subgengival e os autores demonstraram a existência de associações entre as espécies bacterianas

estudadas, as quais foram agrupadas da seguinte forma: complexo vermelho, composto por *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *Treponema denticola*; complexo laranja, composto por subespécies de *Fusobacterium nucleatum* (*Fusobacterium nucleatum* ss *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* ss *polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum* ss *vincentii*), *Fusobacterium periodonticum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Micromonas micros*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*; complexo verde, formado por 3 espécies de *Capnocytophaga* (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*), *Eikenella corrodens* e *Actinobacillus actinomycesemcomitans* sorotipo a; complexo amarelo, formado por espécies de *Streptococcus* (*Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*) e complexo roxo, composto de *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. Espécies como *Selenomonas noxia*, *Actinobacillus actinomycesemcomitans* sorotipo b e *Actinomyces naeslundii* genospécie 2 não formaram complexos com outras espécies microbianas. Este mesmo estudo demonstrou, ainda, a existência de relações entre os complexos, de forma que, por exemplo, o complexo laranja precede a colonização do complexo vermelho. Também foram observadas as relações existentes entre certos complexos e aspectos clínicos da doença periodontal. Os parâmetros de profundidade à sondagem e sangramento à sondagem, por exemplo, mostraram relação direta com a presença das espécies do complexo vermelho e, em certa extensão, do complexo laranja.

#### **1.4. Terapia periodontal**

##### **1.4.1. Raspagem e alisamento radiculares**

O principal objetivo da terapia periodontal é a supressão dos microrganismos relacionados à doença e a subsequente recolonização dos sítios tratados por microrganismos compatíveis com saúde periodontal (Socransky & Haffajee, 1994). A maior parte dos estudos experimentais sugere que a RAR constitui-se numa terapia efetiva na remoção de depósitos bacterianos subgingivais (Listgarten *et al.*, 1978; Helldén *et al.*, 1979; Mousqués *et al.*, 1980; Rabbani *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1981; Badersten *et al.*, 1984; Hinrichs *et al.*, 1984; Lindhe & Nyman, 1985; Müller *et al.*, 1986; Sbordone *et al.*, 1990; Bollen & Quirynen, 1996; Rams & Slots, 1996; Haffajee *et al.*, 1997a, b; Haffajee *et al.*, 1999; Cugini *et al.*, 2000; Darby *et al.*, 2001;

Carvalho *et al.*, 2004). Estudos realizados com microscopia de campo escuro (Listgarten *et al.*, 1978; Hinrichs *et al.*, 1984; Müller *et al.*, 1986; Sbordone *et al.*, 1990; Quirynen *et al.*, 2000) e cultura (Sbordone *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1993; Quirynen *et al.*, 2000) observaram alterações na microbiota subgengival de indivíduos com doença periodontal tratados por meio de RAR. Estes estudos mostraram um aumento na quantidade de microrganismos Gram-positivos imóveis, como cocos, concomitantemente com uma diminuição na quantidade de microrganismos Gram-negativos móveis, como bacilos e espiroquetas, após a RAR em pacientes com doença periodontal. Em geral, os dados indicam que a instrumentação das superfícies radiculares afeta de forma benéfica os parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos (Greenstein, 1992).

Haffajee *et al.* (1997a) avaliaram, por meio da técnica do *Chekerboard DNA-DNA Hybridization*, 4.887 amostras de placa coletadas de 1 sítio subgengival por dente (máximo de 28 sítios por indivíduo) de 57 indivíduos, antes e após terapia de RAR. Os resultados desta investigação mostraram que somente as bactérias do complexo vermelho foram reduzidas de forma significativa após o tratamento, e que nenhuma das 40 espécies testadas foi completamente eliminada. Este estudo mostrou ainda que o *A. actinomycetemcomitans* foi minimamente reduzido após a RAR, em concordância com estudos prévios realizados por Sbordone *et al.* (1990) e Sato *et al.* (1993). Trinta e dois desses indivíduos receberam manutenção periodontal e monitoramento microbiológico a cada 3 meses e foram acompanhados até 1 ano pós-terapia (Cugini *et al.*, 2000). Ao final do estudo foram demonstrados aumentos significativos tanto em níveis quanto nas proporções de *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *Capnocytophaga* sp, *F. nucleatum* ss *polymorphum*, *S. mitis* e *V. parvula*, enquanto *T. forsythensis*, *P. gingivalis* e *S. noxia* mostraram decréscimo. Estes resultados foram mantidos até o 12<sup>o</sup> mês de avaliação.

#### **1.4.2. Controle de placa supragengival**

Foi demonstrado durante a década de 70 que a manutenção de um bom controle de placa supragengival é fundamental para o sucesso da terapia periodontal após a RAR (Nyman *et al.*, 1975, Rosling *et al.*, 1976; Lindhe *et al.*, 1982; Westfelt *et al.*, 1983). Estudos sobre a estrutura do biofilme bacteriano (Costerton *et al.*, 1999; Stoodley *et al.*, 1999) e sobre a composição da placa bacteriana supra e subgengivais (Socransky *et al.*, 1998; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000a e b; Socransky &

Haffajee, 2002) contribuíram para a valorização do controle da placa supragengival após a terapia periodontal.

Alguns estudos sobre o efeito microbiano do controle de placa supragengival mostraram que este procedimento pode influenciar a microbiota tanto supra quanto subgengival. Em 1981, Tabita *et al.* avaliaram, por meio de microscopia óptica, os efeitos do controle de placa supragengival no desenvolvimento da placa subgengival e na saúde gengival e concluíram que a ausência do controle da placa supragengival leva a uma rápida formação de maior quantidade de placa subgengival. Hellström *et al.* (1996) também estudaram o efeito do controle de placa supragengival na microbiota subgengival em indivíduos com periodontite do adulto moderada a severa, utilizando métodos de cultura bacteriana. Os autores observaram um efeito significativo na redução de patógenos na microbiota subgengival, como por exemplo redução nas contagens totais de *P. gingivalis*, quando foi realizado meticuloso controle profissional da placa supragengival, 2 a 3 vezes por semana, por um período de 30 dias. Esta redução foi observada em sítios rasos e profundos. Os resultados deste estudo estão em concordância com as observações de outras investigações, que demonstraram que a microbiota subgengival é, ao menos em parte, dependente do ambiente supragengival (Smulow *et al.*, 1983; McNabb *et al.*, 1992; Dahlén *et al.*, 1992; Shiloah & Patters, 1996).

Em 1998, Westfelt *et al.* estudaram os efeitos microbiológicos da instrução de higiene bucal para o controle de placa supragengival na progressão da doença em 12 indivíduos com periodontite crônica e severa, utilizando métodos de cultura. Os indivíduos receberam tratamento do tipo *split mouth* ("boca dividida"), no qual 2 quadrantes foram considerados controles, recebendo RAR e instrução para controle de placa repetida a cada 2 semanas, durante os primeiros 3 meses, e depois 1 vez a cada 3 meses, durante 3 anos. Os outros 2 quadrantes foram considerados testes e receberam raspagem supragengival e instrução para controle de placa. Os autores observaram, decorridos os 36 meses do estudo, uma mudança no perfil microbiológico, com redução das porcentagens de *P. gingivalis* e *P. intermedia* nos sítios com profundidade à sondagem entre 3 e 6mm, nos quadrantes-controle, enquanto que nos quadrantes-teste esta mudança não foi estatisticamente significativa. Nestes últimos houve, no decorrer do estudo, sítios que mostraram perda de inserção, enquanto nos quadrantes-controle o nível de inserção clínica permaneceu estável.

Ximénez-Fyvie *et al.* (2000a) estudaram o efeito da remoção de placa supragengival profissional semanal por 90 dias na composição da microbiota subgengival de pacientes com periodontite moderada que receberam tratamento de RAR. Usando o método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, estes autores observaram que a remoção semanal da placa supragengival, durante um período de 3 meses, produziu uma redução significativa tanto supra quanto subgengival nos níveis de espécies comprovadamente relacionadas a estados mais graves de doença, como *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola* (complexo vermelho). Foi interessante observar que na avaliação de 12 meses (9 meses após a suspensão do controle de placa profissional), o perfil microbiológico deste grupo de indivíduos se mantinha semelhante ao de um grupo de indivíduos periodontalmente saudáveis.

Recentemente, Carvalho *et al.* (2005) estudaram os efeitos microbiológicos da RAR apenas ou quando em associação ao controle de placa supragengival profissional, realizado semanalmente por um período de 3 meses. Estes autores observaram, por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, uma significativa diminuição na contagem das bactérias do complexo vermelho, além de 5 espécies do complexo laranja (*C. gracilis*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *F. periodonticum* e *P. nigrescens*), aos 90 dias subseqüentes à terapia, no grupo que recebeu RAR associada à profilaxia profissional.

#### **1.4.3. Antissépticos orais no controle da placa bacteriana**

As observações relativas à importância da manutenção de baixos índices de placa para a conservação de um periodonto saudável levaram ao desenvolvimento de vários estudos com o objetivo de avaliar a eficácia de métodos auxiliares, como os agentes químicos, no controle da placa bacteriana supragengival. Uma vasta gama de agentes químicos com propriedades antimicrobianas foi estudada quanto à sua capacidade de controlar a formação de placa bacteriana. Como exemplo pode-se citar os detergentes (lauril sulfato de sódio), óleos essenciais (timol, eucaliptol), íons metálicos (zinco, cobre, estanho), extratos de plantas (sanguinarina), fenóis (triclosan), compostos quaternários de amônia (cloreto de cetilpiridínio) e digluconato de clorexidina (Marsh, 1992). A clorexidina a 0,12 ou 0,2% é, até o momento, o antisséptico oral mais efetivo no controle da placa bacteriana (Lang & Brecx, 1986; Marsh, 1992, Maruniak *et al.*, 1992). Além do efeito na microbiota supragengival, estudos realizados observaram também melhora nos parâmetros clínicos

periodontais, como redução da profundidade à sondagem e sangramento à sondagem (Maruniak *et al.*,1992; Christie *et al.*, 1998).

Segreto *et al.* (1986) e Gjermo (1989) observaram que a clorexidina se mostrou eficaz na redução de placa, cáries e gengivite devido ao seu largo espectro antimicrobiano, sendo considerada um *gold standard* quando comparada a outros produtos. Os benefícios da clorexidina não se limitam apenas a seus efeitos bactericidas iniciais; ela é capaz de se adsorver às superfícies bucais e permanecer por várias horas ainda com capacidade para interferir no metabolismo das bactérias orais (Oppermann, 1979; Roges *et al.*,1987; Marsh *et al.*, 1992). Como efeitos colaterais deste antisséptico pode-se citar sensação de ardência, gosto metálico e manchamento dos dentes, língua e restaurações (Albandar *et al.*, 1994; Eaton *et al.*, 1997; Ernst *et al.*,1998; Borrajo *et al.*, 2002).

Sabe-se que a efetividade de um medicamento está diretamente relacionada à dose terapêutica utilizada. O digluconato de clorexidina está disponível para uso odontológico em duas concentrações, 0,12% e 0,2%. Diversos estudos que avaliaram a efetividade da clorexidina nessas duas concentrações obtiveram resultados semelhantes em termos de controle da placa supragengival e dos parâmetros clínicos de inflamação gengival (Bollen *et al.*, 1996; Eaton *et al.*, 1997; Ernst *et al.*, 1998; Sekino *et al.*, 2003).

Em 1997, Eaton *et al.* realizaram um estudo no qual puderam observar os efeitos do uso de bochechos com clorexidina a 0,12% no acúmulo de placa bacteriana e na inflamação gengival em 98 indivíduos com gengivite. Os indivíduos que fizeram os bochechos com clorexidina durante 12 semanas 2 vezes ao dia tiveram uma redução significativa nos índices de placa e gengivite, quando comparados aos indivíduos que fizeram bochechos com solução placebo. Sekino *et al.* (2003) demonstraram que o uso diário, durante 7 dias, de bochecho de clorexidina a 0,2%, como adjuvante a um cuidadoso controle mecânico de placa realizado pelo próprio paciente, reduziu as contagens totais de microrganismos (números totais de unidades formadoras de colônia) detectados em amostras salivares por cultura, em indivíduos com gengivite.

Ernst *et al.* (1998) realizaram um estudo com o objetivo de comparar a efetividade clínica e os efeitos colaterais de bochechos com clorexidina (manchamentos, alterações de paladar, sensibilidade na mucosa oral), utilizada 2 vezes ao dia, nas diferentes concentrações de 0,12% e 0,2%. Estes autores

observaram que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas nos efeitos antiinflamatório e antiplaca das duas soluções, bem como nos efeitos colaterais, principalmente quando relacionados ao manchamento. Desta forma, os pesquisadores sugeriram que não existem razões que justifiquem o aumento da concentração das soluções de clorexidina para bochecho de 0,12 para 0,2%.

Todos os achados relacionados aos efeitos benéficos do controle de placa supragengival na composição da placa subgengival sugerem que o acúmulo de bactérias acima da margem da gengiva durante e após a terapia periodontal pode exercer um papel fundamental na recolonização microbiana dos sítios subgengivais tratados. A maior parte dos estudos realizados até o momento que avaliou o controle da placa supragengival como forma efetiva de terapia periodontal utilizou a remoção mecânica profissional da placa, após o término da terapia de RAR, e obteve resultados microbiológicos e clínicos benéficos (Westfeld *et al.*, 1998; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000b, Carvalho *et. al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2005). Uma questão que pode ser levantada a partir destes estudos é qual seria o efeito do estrito controle de placa supragengival, obtido por meios mecânicos e/ou químicos, durante e logo após a terapia de RAR na recolonização dos sítios subgengivais tratados.

## **2. PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve por objetivo avaliar as alterações na composição da microbiota subgengival após raspagem e alisamento radiculares somente ou em combinação com profilaxia profissional e/ou bochecho com clorexidina a 0,12%.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Seleção de pacientes**

Foram selecionados para este estudo cego 60 indivíduos, portadores de doença periodontal crônica, na Clínica Odontológica da Universidade Guarulhos, SP. A seleção foi feita por 2 mestrandos em Periodontia, sob a supervisão dos professores da disciplina. A participação na pesquisa foi voluntária e os sujeitos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido segundo a Resolução nº196/96 das Normas do Conselho Nacional de Saúde, contendo informações a respeito da pesquisa, objetivos, riscos, conseqüências e tipos de terapias a serem utilizadas (Anexo A). O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos. Após sua aprovação (Anexo B), procedeu-se a seleção dos pacientes.

#### **3.2. Critérios de inclusão e exclusão**

Para a inclusão na pesquisa, a escolha dos participantes respeitou os seguintes critérios: história negativa de terapia antibiótica, tratamento periodontal e uso de antissépticos orais nos 6 meses anteriores ao início da pesquisa; história negativa de doença sistêmica que comprometesse a resposta ao tratamento ou que exigisse medicação profilática prévia; não serem fumantes; não estarem grávidas ou amamentando; terem 30 anos ou mais; possuírem um mínimo de 15 dentes com pelo menos 06 deles apresentando 01 sítio interproximal com profundidade à sondagem entre 5 e 7mm e nível clínico de inserção entre 5 e 10mm.

#### **3.3. Delineamento experimental**

No tempo inicial, todos os indivíduos (n=60) foram submetidos à anamnese, exame clínico periodontal, coleta de amostras de placa subgengival dos 6 sítios selecionados (*ver 3.4. Seleção dos sítios-teste*), instrução de higiene oral (IHO) e raspagem supragengival (RSP). Em seguida, os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos terapêuticos de 15 indivíduos, por meio de tabela de números equiprováveis, e submetidos a uma das seguintes formas de tratamento:

-Grupo controle (C): RAR + bochecho com solução placebo duas vezes ao dia (P),

-Grupo-teste I (T1): RAR + bochecho com solução de digluconato de clorexidina a 0,12% duas vezes ao dia (CLX),

-Grupo-teste II (T2): RAR + P + remoção profissional da placa supragengival (profilaxia profissional periódica) duas vezes por semana (PPP),

-Grupo-teste III (T3): RAR + CLX+ PPP.

Os procedimentos de controle químico (bochechos com clorexidina e placebo) e controle mecânico (remoção profissional da placa supragengival) foram iniciados juntamente com a terapia de RAR, que teve duração máxima de 21 dias, e prosseguiram por 42 dias após o término da RAR. A avaliação microbiológica foi repetida logo após o término do procedimento de RAR (dia 0), 42 e 63 dias depois. Dois intervalos sem a utilização dos bochechos foram instituídos, do dia 0 ao 3 e do dia 21 ao 24. O protocolo experimental está representado na Figura 1.

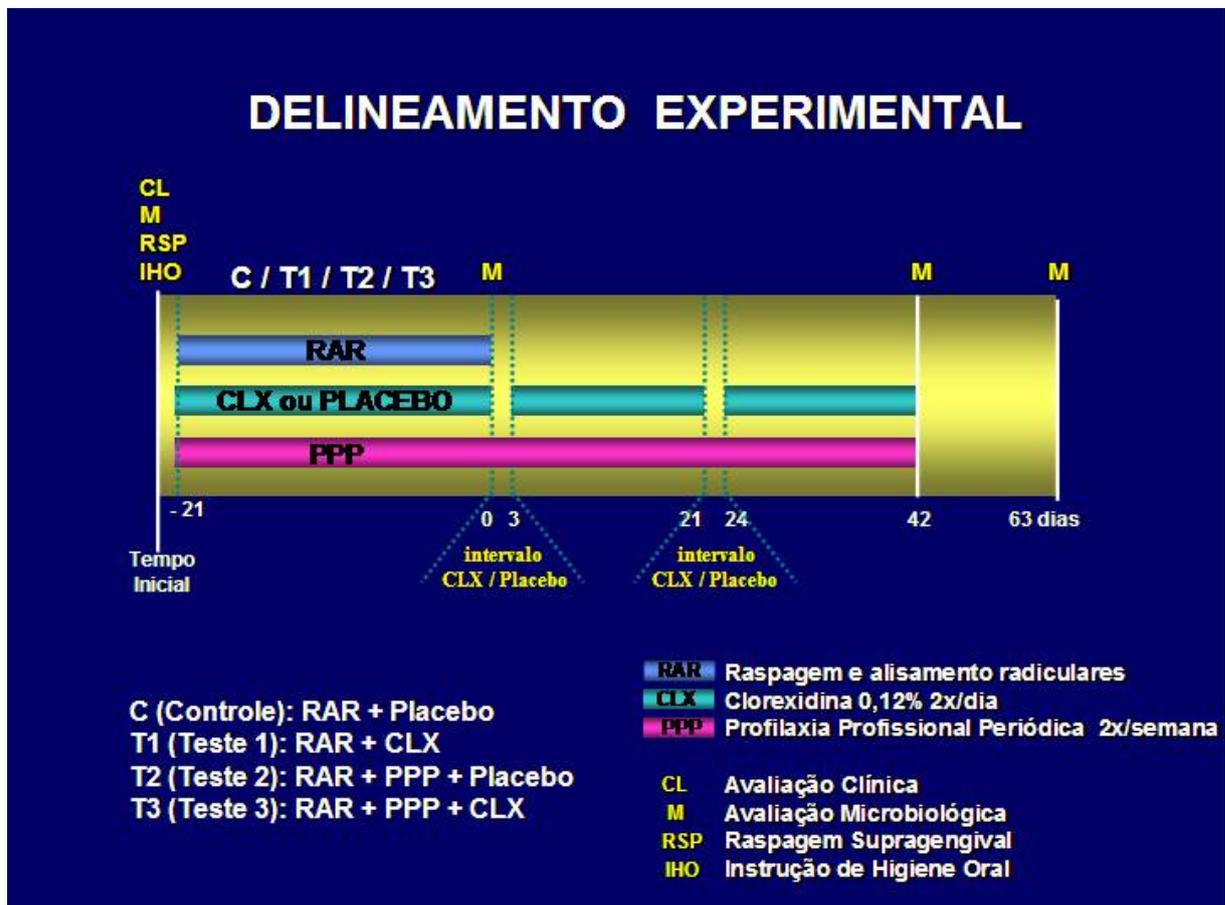


Figura 1. Delineamento experimental.

### **3.4. Seleção dos sítios-teste**

Amostras de placa subgengival foram coletadas de 6 sítios por indivíduo. Estes sítios estavam localizados em faces dentárias interproximais não-contíguas, apresentando profundidade à sondagem entre 5 e 7mm e nível clínico de inserção entre 5 e 10mm, e preferencialmente distribuídos entre os 4 quadrantes.

### **3.5. Avaliação clínica**

O exame clínico periodontal foi realizado por dois examinadores no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo e selecionar os sítios-teste. Os examinadores foram calibrados por meio do método do erro padrão da medida e erro médio percentual (Gursky *et al.*, 2005 - Anexo C). Todos os dentes, exceto os terceiros molares, foram avaliados em 6 sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), para os seguintes parâmetros:

- Índice de placa visível (Ainamo & Bay, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa dentária supragengival visível, após lavagem e secagem dos dentes.

- Índice de sangramento gengival (Ainamo & Bay, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento na gengiva marginal após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival.

- Profundidade à sondagem: distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

- Nível clínico de inserção: distância, em milímetros, entre a junção esmalte-cimento e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

- Sangramento à sondagem: presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento após 20 segundos da sondagem com sonda periodontal milimetrada.

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

Para este exame foram utilizadas sondas periodontais milimetradas tipo PCPUNC-BR 15 (HuFriedy do Brasil, RJ, RJ, Brasil).

### **3.6. Procedimentos terapêuticos**

#### **3.6.1. Terapia periodontal básica**

Após a coleta de placa subgengival para análise microbiológica, os indivíduos foram submetidos à raspagem supragengival (RSP) e instruções de higiene oral (IHO), realizadas por alunos de iniciação científica, bolsistas do CNPq, devidamente treinados. Durante as sessões de instrução de higiene oral, os indivíduos foram orientados a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental *Colgate Total* (Anacol Ind. e Com. Ltda- Kolynos do Brasil-Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Em seguida, os indivíduos receberam de quatro a seis sessões de raspagem e alisamento radiculares (RAR) com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy), sob anestesia local (Haffajee *et al.*, 1997) com BioPressin<sup>®</sup> -cloridrato de prilocaína a 3%, felipressina 0,03UI (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Estas sessões de RAR tiveram uma duração de aproximadamente 1 hora e foram realizadas em no máximo 21 dias, por dois alunos treinados do Mestrado em Odontologia da Universidade Guarulhos. O tratamento periodontal realizado foi inteiramente gratuito durante toda a duração do estudo. As demais necessidades de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da Clínica de Odontologia da própria Universidade.

#### **3.6.2. Bochechos com soluções de clorexidina a 0,12% ou placebo**

Os procedimentos de controle químico (bochechos com clorexidina 0,12% ou solução placebo) foram iniciados juntamente com a terapia de raspagem subgengival, prosseguindo após seu término por um período de 42 dias. Os voluntários foram orientados a bochechar 15 ml da solução duas vezes ao dia (manhã e noite), por 1 minuto, como proposto por Ernst *et al.* (1998). Foram feitos 2 intervalos de 3 dias durante o período de utilização dos bochechos, na tentativa de diminuir os efeitos colaterais da clorexidina. Recomendou-se 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 o componente flúor e a clorexidina, diminuindo assim a efetividade do mesmo. As soluções foram manipuladas especialmente para a pesquisa na Universidade Estadual de Maringá e fornecidas gratuitamente aos voluntários. As soluções apresentavam a mesma

coloração e sabor e foram estocadas em frascos plásticos leitosos de 500ml, devidamente codificados. A solução de clorexidina era composta de digluconato de clorexidina a 0,12%, 10% de glicerina, adoçante natural na quantidade de 6 gotas a cada 100ml, 0,02% de corante verde, 0,05% de essência de menta e água destilada em quantidade suficiente para completar 100%. A solução placebo possuía a mesma composição, com exceção do digluconato de clorexidina.

Os indivíduos foram orientados a retornar uma vez por semana à Clínica trazendo o frasco vazio para depois receber outro frasco contendo a mesma solução. Estas trocas foram realizadas pelos alunos de iniciação científica, os quais mantinham um registro das mesmas. Os indivíduos foram também instruídos a relatar eventuais efeitos colaterais a estes alunos, que mantinham um controle do uso correto dos bochechos por meio de constantes telefonemas.

### **3.6.3. Profilaxia profissional periódica**

Juntamente com as sessões de RAR, os pacientes dos grupos T2 e T3 receberam profilaxia profissional duas vezes por semana, além dos bochechos com solução placebo (T2) e clorexidina (T3). A profilaxia foi realizada por mais 42 dias após o término da terapia de RAR, pelos alunos de iniciação científica previamente mencionados, os quais foram treinados para a realização deste procedimento. Foram utilizadas curetas, taças de borracha, pasta profilática Herjos® (Vigodent SA Ind. e Com., Bonsucesso, RJ, Brasil), sem substâncias antimicrobianas, e fio dental Sanifil (Facilit Odontológica e Perfumaria Ltda, RJ, RJ, Brasil). A profilaxia foi limitada à remoção da placa supragengival, sem que houvesse invasão do sulco gengival.

## **3.7. Monitoramento microbiológico**

### **3.7.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento**

A lista das 38 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela 1. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EUA) ou do *Forsyth Institute* (Boston, Massachusetts, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de

ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, Maryland, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub>). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythensis*, por exemplo, foi cultivada em ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado e 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado, 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma). *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose, 400µg/ml de niaciamida, 150µg/ml espermina tetraidroclorídrica, 20µg/ml de isobutirato de Na, 1mg/ml de L-cisteína, 5µg/ml de tiamina pirofosfato e 0,5% de soro bovino.

### **3.7.2. Isolamento do DNA e preparo das sondas**

As cepas bacterianas foram anaerobicamente cultivadas na superfície de ágar-sangue contido em placas de Petri, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo de cultura, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos de microcentrífuga de 1,5ml contendo 1ml de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células das cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). As cepas Gram-positivas foram lisadas em 150µl de uma mistura enzimática contendo 15mg/ml de lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão de TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith *et al.* (1989). As sondas multi-genômicas (*whole-genomic*) foram preparadas para cada uma das 38 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indianápolis, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies bacterianas avaliadas foram selecionadas segundo sua associação com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Haffajee & Socransky, 1994).

**Tabela 1.** Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA.

<b>Espécies</b>	<b>Cepas</b>	<b>Espécies</b>	<b>Cepas</b>
<i>Actinobacillus</i>	29523 <sup>a</sup>	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 <sup>a</sup>
<i>actinomycetemcomitans a+b</i>	43718 <sup>a</sup>		
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 <sup>a</sup>	<i>Micromonas micros</i>	33270 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 <sup>a</sup>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 <sup>a</sup>	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 <sup>a</sup>	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 <sup>a</sup>
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 <sup>a</sup>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 <sup>a</sup>
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 <sup>a</sup>	<i>Propionibacterium acnes</i>	11827/11828 <sup>a</sup>
<i>Campylobacter showae</i>	33612 <sup>a</sup>	<i>Selenomonas noxia</i>	43541 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus oralis</i>	35037 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 <sup>a</sup>
<i>Eikenella corrodens</i>	51146 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 <sup>a</sup>
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus mitis</i>	49456 <sup>a</sup>
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 <sup>a</sup>
<i>Fusobacterium</i>	33693 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 <sup>a</sup>
<i>periodonticum</i>			
<i>Fusobacterium nucleatum ss.</i>	25586 <sup>a</sup>	<i>Veillonella parvula</i>	10790 <sup>a</sup>
<i>nucleatum</i>			
<i>Fusobacterium nucleatum ss.</i>	10953 <sup>a</sup>	<i>Treponema denticola</i>	B1 <sup>b</sup>
<i>polymorphum</i>			
<i>Fusobacterium nucleatum ss.</i>	49256 <sup>a</sup>	<i>Treponema socranskii</i>	S1 <sup>b</sup>
<i>vincentii</i>			
<i>Gemella morbillorum</i>	27824 <sup>a</sup>	<i>Tannerella forsythensis</i>	43037 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection)

<sup>b</sup> Forsyth Institute

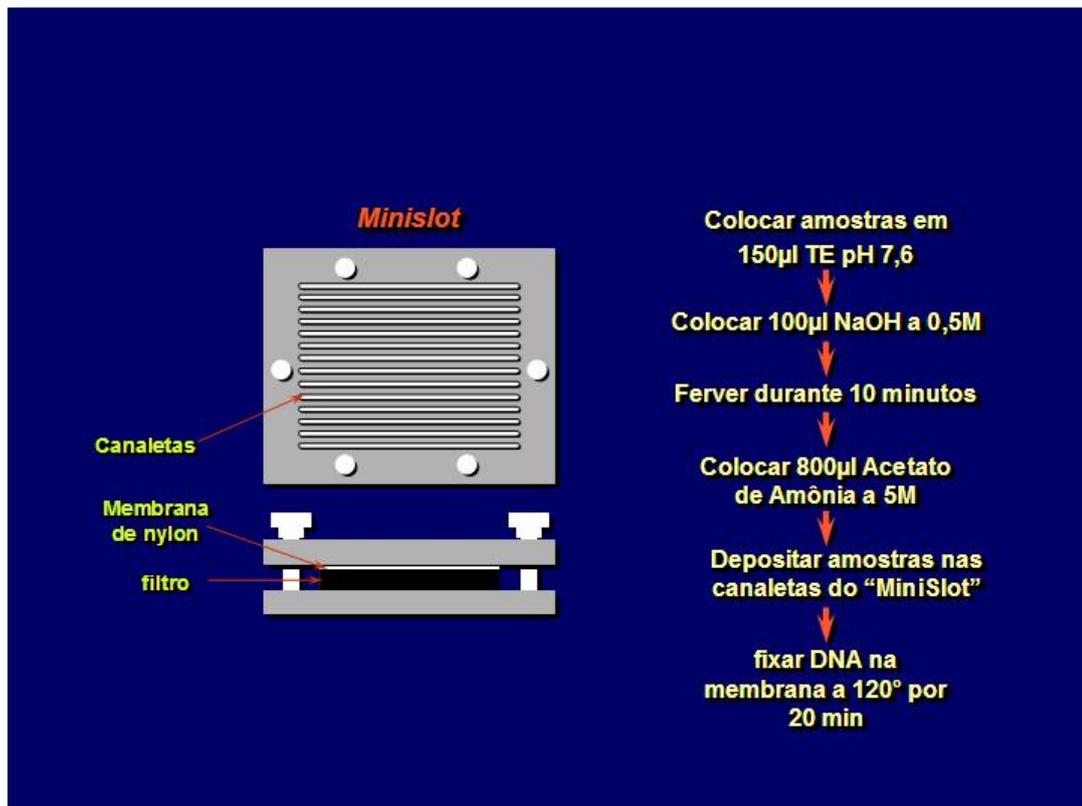
### **3.7.3. Coleta de amostras de placa subgengival**

A coleta de amostras de placa subgengival foi feita com curetas Gracey do tipo mini-five (HuFriedy), posicionadas na porção mais apical de 06 sítios interproximais não-contíguos, com profundidade à sondagem entre 5 e 7 mm (ver *Seleção dos sítios-teste*). Esta coleta foi realizada no tempo inicial (-21 dias), logo após o término da terapia inicial (tempo 0), 42 e 63 dias após. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150µl de solução TE (pH 7,6), ao qual foram adicionados 100µl de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo. Estes tubos foram então identificados e armazenados até serem analisados por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para as 38 cepas bacterianas descritas na Tabela 1, no laboratório de microbiologia da Universidade Guarulhos.

### **3.7.4. *Checkerboard DNA-DNA Hybridization***

#### Hibridização DNA-DNA

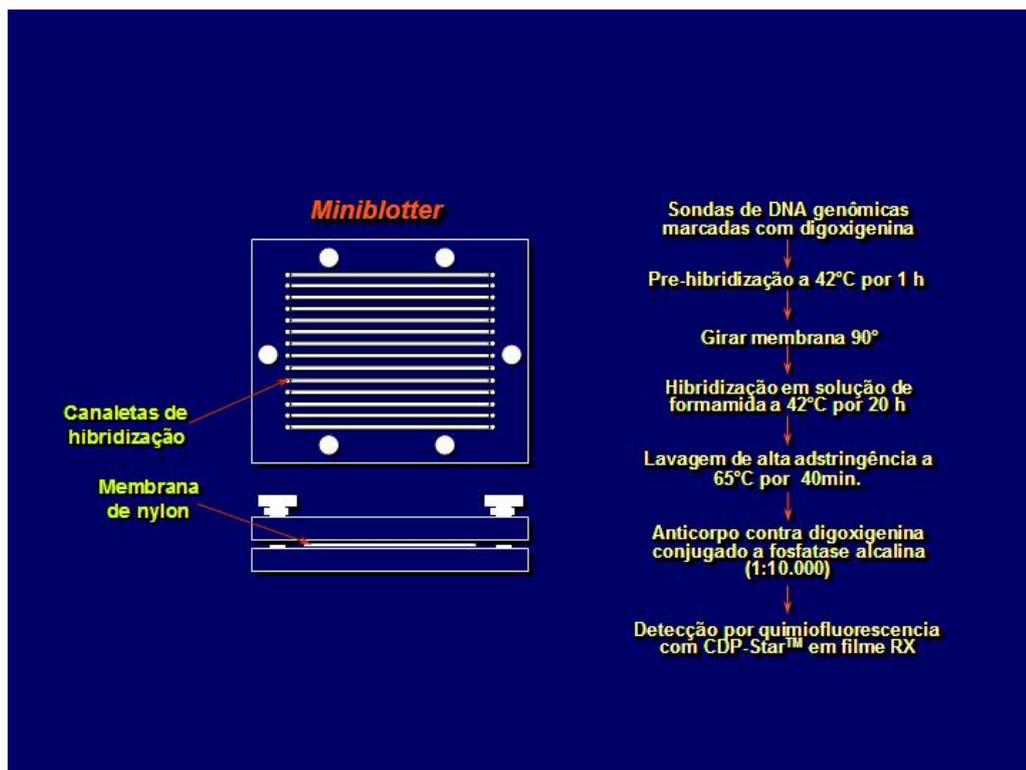
As suspensões contidas nos tubos mencionados anteriormente foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão de placa bacteriana contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* (Immunitics, Cambridge, Massachusetts, USA- Figura 2) ficando, assim, concentrada em uma membrana de *nylon* (15 x 15cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim). As duas últimas canaletas do *Minislot* (Immunitics) foram ocupadas por controles contendo uma mistura do DNA das espécies de microrganismos investigadas pelas sondas, nas concentrações correspondentes a  $10^5$  e  $10^6$  células, ou seja, 1ng e 10ng de DNA de cada espécie, respectivamente (Socransky *et al.*, 1994; Haffajee *et al.*, 1997a, b). A membrana foi então removida do *Minislot* (Immunitics) e o DNA nela concentrado foi fixado por meio de aquecimento em forno a 120° C por 20 minutos.



**Figura 2.** Representação gráfica do *Minislot* (Immunitics, Cambridge, Massachusetts EUA) e resumo da preparação e deposição das amostras de placa bacteriana subgingival (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

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

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* (Immunitics, Figura 3) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* (Immunitics) foi adicionada uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130 µl de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período mínimo de 20 horas, a 42° C.



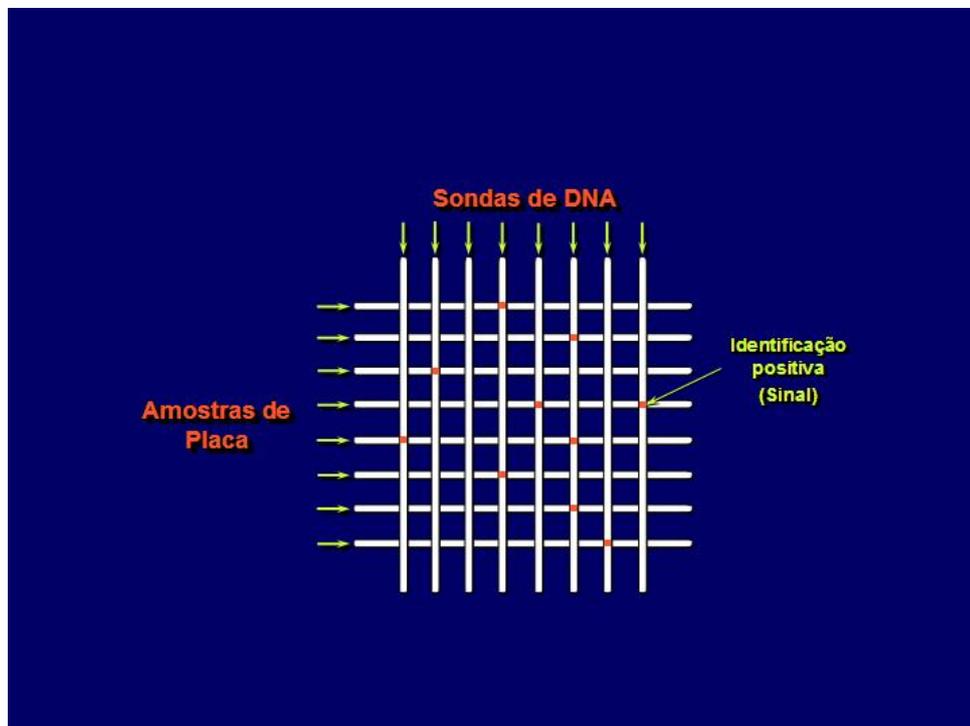
**Figura 3.** Representação gráfica do *Miniblotter* (Immunelect, Cambridge, Massachusetts, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgengival (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

### Deteccção das espécies

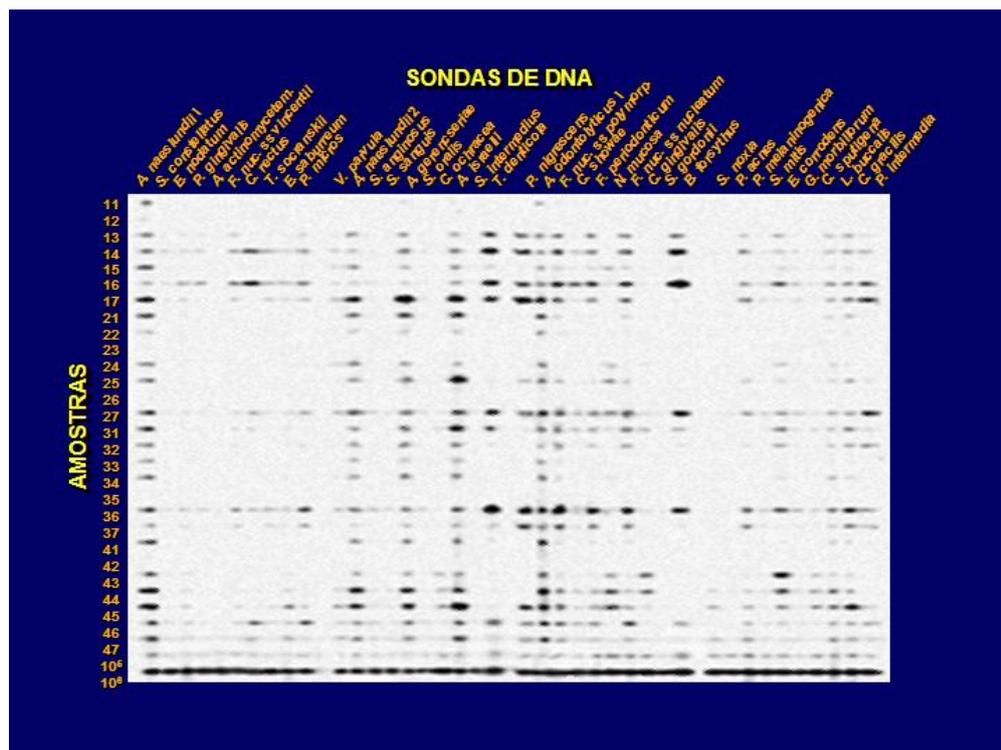
Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* (Immunelect) lavada por 40 minutos, a 65°C numa solução adstringente composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi depois lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5.

Os próximos passos foram a incubação da membrana por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection

Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra, RU). A seguir, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30x40cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca Kodak X-Omat K, 18x24cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado (Figuras 4 e 5) manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, sempre mantidas à temperatura de 20°C.



**Figura 4.** Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de placa e as sondas de DNA (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).



**Figura 5.** Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de placa e as sondas de DNA (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*). Nesta figura estão apresentadas 40 bactérias, e as amostras de placa são de todos os dentes de um mesmo indivíduo.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo  $10^5$  e  $10^6$  bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaliu a um sinal menos intenso que o controle de  $10^5$  células; 2 equivaliu a aproximadamente  $10^5$  células; 3, entre  $10^5$  e  $10^6$  células; 4 aproximadamente  $10^6$  células e 5, mais de  $10^6$  células (Tabela 2). Estes registros foram então utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nos sítios e indivíduos do estudo.

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

ÍNDICE	NÍVEL DO MICRORGANISMO
0	Não detectado
1	Menos de $10^5$ células
2	Aproximadamente $10^5$ células
3	Entre $10^5$ e $10^6$ células
4	Aproximadamente $10^6$ células
5	Mais de $10^6$ células

### 3.8 Análise estatística

Os dados microbiológicos foram expressos em nível médio de cada espécie (contagem) em cada sítio. Estes níveis foram computados por indivíduo e depois dentro de cada grupo terapêutico, em cada tempo do estudo. Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microrganismos dentro de cada grupo, ao longo dos tempos experimentais, foram avaliadas por meio do teste Friedman. Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microrganismos dentro de cada grupo, entre dois tempos experimentais, foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon. Diferenças nos níveis ou nas proporções das diferentes espécies microbianas ou grupo de microrganismos, entre os 4 grupos terapêuticos, em cada tempo experimental, foram avaliadas por meio do teste Kruskal-Wallis. A significância estatística foi estabelecida em 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, como proposto por Socransky *et al.* (1991). Foi aplicada a fórmula  $0,05 = 1 - (1-k)^{38}$ , onde k é o valor equivalente ao  $p < 0,05$  quando ajustado para a comparação de 38 bactérias. Desta forma, as diferenças detectadas no presente estudo foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,002$ .

#### 4. RESULTADOS

Dos 60 indivíduos que foram selecionados no início do estudo e aleatoriamente distribuídos entre os 4 grupos terapêuticos (n= 15/grupo), 3 foram excluídos da análise dos resultados; um deles por ter faltado a uma das consultas de reavaliação (grupo T2) e dois por terem ingerido antibióticos durante o período experimental (grupos T1 e T3). Sendo assim, a análise final dos resultados deste estudo incluiu 57 indivíduos, dos quais 15 pertenciam ao grupo controle (C) e 14 a cada um dos grupos teste (T1, T2, T3). Amostras de placa subgengival foram coletadas de 6 sítios de cada participante do estudo no exame inicial, logo após o término da terapia inicial, 42 dias e 63 dias depois. Um total de 1.368 amostras foram avaliadas: 360 do grupo controle, 336 do grupo T1, 336 do grupo T2 e 336 do grupo T3.

As médias dos parâmetros clínicos observados no exame inicial, nos 4 grupos terapêuticos, estão apresentadas na Tabela 3. Os resultados demonstraram que os grupos eram homogêneos em relação aos parâmetros clínicos, uma vez que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no exame inicial.

**Tabela 03.** Média ( $\pm$  dp) dos parâmetros clínicos, no exame inicial, dos indivíduos nos grupos terapêuticos.

VARIÁVEIS	GRUPOS			
	C (RAR)	T1 (RAR+CLX)	T2 (RAR+PPP)	T3 (RAR+CLX+PPP)
Número H/M	8H 7M	5H 9M	3H 11M	4H 10M
Idade (anos)	42,1 $\pm$ 6,5	48,5 $\pm$ 8,8	42,4 $\pm$ 9,4	44,2 $\pm$ 5,9
PS (mm)	3,85 $\pm$ 0,66	3,49 $\pm$ 0,39	3,78 $\pm$ 0,88	3,64 $\pm$ 0,62
NCl (mm)	4,40 $\pm$ 1,02	4,27 $\pm$ 0,74	4,05 $\pm$ 1,02	4,06 $\pm$ 1,02
<b>% Sítios:</b>				
IPV 1	82,25 $\pm$ 12,01	79,74 $\pm$ 14,70	85,10 $\pm$ 11,30	82,43 $\pm$ 11,88
ISG 1	40,17 $\pm$ 19,46	33,02 $\pm$ 11,37	37,83 $\pm$ 22,39	35,8 $\pm$ 14,86
SS 1	62,05 $\pm$ 19,34	59,22 $\pm$ 16,85	61,23 $\pm$ 18,62	54,45 $\pm$ 24,07
Sup 1	2,75 $\pm$ 3,34	2,25 $\pm$ 2,09	2,42 $\pm$ 3,04	2,78 $\pm$ 3,71
Bolsas rasas (< 4mm)	52,12 $\pm$ 17,75	58,37 $\pm$ 11,53	55,47 $\pm$ 5,84	57,96 $\pm$ 16,58
Bolsas médias (4-6mm)	40,93 $\pm$ 14,72	35,73 $\pm$ 10,62	34,75 $\pm$ 10,79	34,92 $\pm$ 14,30
Bolsas profundas (>6mm)	6,95 $\pm$ 5,90	4,95 $\pm$ 3,13	7,00 $\pm$ 8,3	5,45 $\pm$ 5,36

RAR: Raspagem e Alisamento Radiculares; CLX: Clorexidina 0,12%; PPP: Profilaxia Profissional Periódica; H: homens; M: mulheres; PS: profundidade à sondagem; NCl: nível clínico de inserção; IPV 1: índice de placa visível (escore 1); ISG1: índice de sangramento gengival (escore 1); SS1: sangramento à sondagem (escore 1); Sup 1: supuração (escore 1); dp: desvio padrão; Teste Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

#### 4.1. Efeitos das terapias nas contagens bacterianas

A média de contagem ( $\times 10^6 \pm$  desvio padrão) das 38 espécies subgengivais avaliadas em todos os tempos do estudo, nos 4 grupos terapêuticos (C=RAR, T1=RAR+CHX, T2=RAR+PPP e T3=RAR+PPP+CHX) estão representadas nas Figuras 6, 7, 8 e 9, respectivamente. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Socransky *et al.* (1998). Os níveis médios de cada espécie foram computados para cada indivíduo e depois dentro do grupo, em cada tempo do estudo. As Figuras 10, 11 e 12 mostram o perfil de colonização de algumas espécies bacterianas individuais, nos diferentes tempos experimentais, para os 4 grupos terapêuticos.

Nenhuma diferença estatística foi encontrada nas médias de contagem das 38 espécies avaliadas no tempo inicial (-21) e final (63 dias) entre os 4 grupos do estudo. No tempo zero (pós-terapia inicial), 10 espécies mostraram diferenças estatísticas entre os grupos. Foram elas: *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii* 1,

*A. odontolyticus*, *V. parvula*, *S. mitis*, *C. gingivalis*, *C. showae*, *P. acnes* e *P. melaninogenica*. Em geral, essas diferenças se deram devido a uma menor quantidade desses microrganismos nos grupos T1 e T3. Aos 42 dias pós-terapia inicial, apenas a espécie *A. gerencseriae* diferiu estatisticamente entre os grupos terapêuticos (dados não apresentados).

Após o ajuste para comparações múltiplas, foi observado que as terapias utilizadas alteraram significativamente os níveis de vários microrganismos. Ao longo do estudo, foram observadas alterações em 4 espécies bacterianas nos grupos C e T2, 22 no grupo T1 e 13 no grupo T3. Logo após o término da terapia inicial, 4 espécies bacterianas foram significativamente reduzidas no grupo C e 3 no grupo T2. Os indivíduos que utilizaram clorexidina como parte da terapia (T1 e T3) tiveram redução significativa neste mesmo tempo de avaliação em 15 e 7 espécies, respectivamente (Figuras 6, 7, 8 e 9).

De modo geral todas as terapias utilizadas levaram a uma redução estatisticamente significativa na contagem dos patógenos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*) logo após o término da terapia inicial, com exceção de *P. gingivalis* no grupo T2. Esse padrão de redução foi mantido para as 3 espécies deste complexo até 63 dias pós-terapia inicial nos grupos que receberam clorexidina como parte da terapia (T1 e T3, Figuras 7 e 9). Nos grupos C e T2, apesar dos níveis desses patógenos ainda estarem reduzidos em relação ao início do estudo, aos 63 dias pós-terapia inicial não houve diferença significativa para os níveis de *T. denticola* no grupo C e para *T. denticola* e *P. gingivalis* no grupo T2 (Figuras 6 e 8).

Para as 12 espécies pertencentes ao complexo laranja, 1 foi alterada significativamente ao longo do estudo no grupo C, 8 no T1, 2 no T2 e 3 no T3. Logo após a terapia inicial observou-se as seguintes alterações significativas neste complexo bacteriano: redução de 1 espécie no grupo C (*E. nodatum*), 4 no grupo T1 (*F. nucleatum* ss *nucleatum*, *M. micros*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*), 1 no grupo T2 (*C. rectus*), e 2 no grupo T3 (*P. intermedia* e *E. nodatum*). Aos 63 dias após o tratamento inicial, os níveis da maior parte dos possíveis patógenos do complexo laranja ainda se mantinham reduzidos em relação ao início do estudo em todos os grupos terapêuticos, embora apenas a espécie *C. rectus* no grupo T2 se mostrasse estatisticamente reduzida após o ajuste. A Figura 10 mostra o níveis de 3 espécies do complexo laranja nos 4 grupos terapêuticos, *C. rectus*, *F. nucleatum* ss *vincentii* e

*E. nodatum*. É interessante observar que o perfil de colonização desses microrganismos ao longo do estudo foi similar nos 4 grupos terapêuticos.

Os indivíduos que tiveram complementação química como forma de supressão da placa supragengival (grupos T1 e T3) também mostraram reduções significativas na contagem de outros patógenos periodontais, como *P. acnes* e *P. melaninogenica*. Apesar da redução destas espécies ter sido mantida até 63 dias pós-terapia inicial, a significância estatística não se manteve até este período de observação. Já as terapias de RAR somente (C) e RAR associada à profilaxia profissional (T2) não alteraram os níveis dessas espécies.

Observou-se também que os níveis de *A. actinomycetemcomitans* não foram significativamente alterados por nenhuma das terapias empregadas, em nenhum tempo do estudo (Figuras 6-9 e 11).

Os complexos amarelo, verde e roxo, que abrigam a maior parte das espécies consideradas benéficas, e as espécies de *Actinomyces* também apresentaram alterações importantes durante o curso do estudo (Figuras 6-9 e 12). Os indivíduos dos grupos T1 e T3 tiveram reduções significativas em várias destas espécies. *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii* 1, *A. odontolyticus*, *S. mitis*, e uma espécie do complexo verde, *C. gingivalis*, foram estatisticamente reduzidas no grupo T1 logo após a terapia inicial. O mesmo ocorreu no grupo T3 para as espécies *A. gerencseriae* e *A. israelii*. Porém, aos 42 dias após terapia inicial essas espécies começaram a mostrar uma tendência à recolonização e aos 63 dias a maior parte destes microrganismos retornou aos níveis observados no início do estudo. Algumas dessas espécies benéficas estavam, no dia 63, em níveis mais altos em relação aos iniciais, como por exemplo *V. parvula*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* e *S. oralis* no grupo T1, apesar desta característica não ter significância estatística após realização do ajuste para comparações múltiplas. No grupo T3, várias espécies benéficas mostraram contagens aumentadas em relação ao início do estudo, principalmente *V. parvula*, *S. oralis* e *S. sanguinis* (Figura 12). Esses grupos de microrganismos benéficos foram minimamente afetados nos indivíduos que receberam apenas terapia mecânica (C e T2).

#### **4.2. Efeitos das terapias nas proporções dos complexos microbianos**

A Figura 13 mostra as alterações ocorridas nas proporções dos complexos microbianos e na contagem total de bactérias em relação ao início do estudo (área

dos gráficos setoriais) nas amostras de placa subgengival dos indivíduos dos grupos terapêuticos, em todas as consultas de avaliações. As 38 espécies microbianas identificadas por meio das sondas de DNA foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos (Socransky *et al.*, 1998). As espécies pertencentes a cada complexo foram somadas e a proporção de cada complexo em cada consulta de avaliação foi determinada.

Pode-se observar que as proporções dos diferentes complexos microbianos eram semelhantes entre os grupos, no início do estudo, sendo que não houve diferenças estatísticas neste tempo. O complexo presente em maiores proporções era o laranja, composto por 39,8 a 45,1% das espécies avaliadas, seguido do complexo vermelho, composto por 20,5 a 34,0% das espécies. Logo após o final da terapia inicial os grupos que receberam clorexidina mostraram uma redução mais acentuada na contagem total de microrganismos subgengivais em comparação com os grupos C e T2, que pode ser observada pela maior redução em área dos gráficos setoriais nos grupos T1 e T3 no tempo 0 em relação ao início do estudo (Figura 13). Aos 42 dias a contagem total de microrganismos nestes 2 grupos aumentou e depois foi praticamente mantida até 63 dias pós-terapia. Apesar de, logo após a terapia inicial (tempo 0), a redução total de microrganismos nos grupos C e T2 não ter sido tão marcante em relação aos grupos T1 e T3, aos 63 dias todos os grupos ainda mostravam contagens inferiores às observadas no início do estudo.

De maneira geral, nota-se que todas as formas de terapia propostas causaram modificações nas proporções dos complexos microbianos subgengivais. Os indivíduos que receberam RAR e clorexidina (T1) mostraram alterações significativas ao longo do estudo nos 7 grupos de bactérias existentes, e os indivíduos que receberam a combinação das 3 terapias (T3), em 6. Já os grupos C e T2 mostraram alterações significativas em 3 complexos bacterianos. O complexo vermelho foi reduzido em todos os grupos e se manteve em proporções mais baixas do que no início do estudo aos 63 dias pós-terapia inicial. O complexo laranja também estava em menor proporção em todos os grupos ao término do estudo. Porém, a maior redução na proporção deste complexo, do tempo inicial para 63 dias, foi observada no grupo T3 (40,2% - 32,2%), em comparação com os grupos C (42,3% - 37,3%) , T1 (45,1% - 44%) e T2 (39,8% - 35,5%). Os complexos que abrigam as bactérias consideradas benéficas, complexos verde, roxo, amarelo e o

grupo dos *Actinomyces*, mostraram aumento em proporções ao longo do estudo em todos os grupos terapêuticos.

## 5. DISCUSSÃO

A eficácia da terapia periodontal está relacionada à supressão ou à eventual eliminação dos patógenos periodontais e a concomitante recolonização desses sítios por uma microbiota compatível com saúde (Socransky & Haffajee, 1994). Apesar da RAR ser a forma mais comum de tratamento periodontal e normalmente levar a uma alteração benéfica na composição da placa subgengival e a uma melhora nos parâmetros clínicos de inflamação (Badersten *et al.*, 1981; Lindhe *et al.*, 1982; Badersten *et al.*, 1984; Greenstein, 1992; Haffajee *et al.*, 1997; Haffajee *et al.*, 1999; Cugini *et al.*, 2000), o tratamento ideal e definitivo para a periodontite crônica ainda não foi definido. Um forte indicador desta afirmação é a necessidade da manutenção do tratamento em um período de tempo relativamente curto, em média 3 meses, para que os níveis de inserção periodontal sejam mantidos estáveis (Lindhe & Nyman, 1975; Lindhe *et al.*, 1982; Rosling *et al.*, 1976). Dados de estudos que utilizaram a remoção profissional repetida de placa supragengival ou o seu controle químico como parte efetiva da terapia periodontal sugerem que este procedimento, associado à RAR, tem influência benéfica na composição da placa subgengival (Ali *et al.*, 1992; Bollen *et al.* 1996; Christie *et al.*, 1998; Westfeld *et al.*, 1998; Haffajee *et al.*, 1999; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000; Quirynen *et al.*, 2000; Carvalho, 2002; Carvalho *et al.*, 2005).

Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo realizar uma avaliação microbiológica sistemática das alterações ocorridas na composição da microbiota subgengival de indivíduos com periodontite crônica tratados com RAR e supressão adicional da placa supragengival por meio de profilaxia profissional repetida e/ou bochecho com clorexidina a 0,12%.

A frequência das consultas para o controle de placa supragengival profissional para a obtenção de melhores resultados microbiológicos ainda não está definida na literatura, sendo que diversos estudos utilizaram programas de profilaxia profissional a cada duas semanas, com duração de 6 meses (Lindhe *et al.*, 1982; Westfeld *et al.*, 1983) a 2 anos (Nyman *et al.*, 1975), ou ainda profilaxia semanal com duração de 3 meses (Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000 a, b; Carvalho, 2002; Carvalho *et al.*, 2005). O presente estudo propôs um protocolo de profilaxia supragengival 2 vezes por semana, a partir do início da RAR, com duração de 42 dias após o seu término. Para o controle químico da placa supragengival foi utilizado bochecho com

clorexidina a 0,12%, 2 vezes ao dia, de acordo com de Ernst *et al.* (1998). O protocolo aqui proposto ainda não foi descrito na literatura. Porém, diversos artigos científicos utilizaram prolongadamente este antimicrobiano, variando de 14 dias até 6 meses (Addy & Wright, 1978; Briner *et al.*, 1986; Eaton *et al.*, 1997; Christie *et al.*, 1998; Ernst *et al.*, 1998; Quirynen *et al.*, 2000; Borrajo *et al.*, 2002; Sekino *et al.*, 2003). Este estudo incluiu o intervalo de três dias justamente na tentativa de controlar possíveis efeitos colaterais causados pelo uso contínuo da clorexidina.

Todas as terapias utilizadas no presente estudo levaram a uma redução na quantidade total de microrganismos na placa subgengival, logo após o término da terapia inicial (tempo 0, Figuras 6-9 e 13). Este resultado era esperado, uma vez que todos os grupos receberam RAR como parte da terapia, e já está bem determinado na literatura que o procedimento de RAR por si só é eficaz na remoção de uma porção substancial da microbiota subgengival (Listgarten *et al.*, 1978; Mousqués *et al.*, 1980; Hinrichs *et al.*, 1985; Haffajee *et al.*, 1997; Cugini *et al.*, 2000; Dahan *et al.*, 2004). Contudo, os indivíduos que utilizaram clorexidina para controlar a formação da placa supragengival (grupos T1 e T3) mostraram alterações quantitativas e qualitativas mais evidentes na composição da microbiota subgengival em comparação aos dois grupos que receberam apenas terapia mecânica (C e T2).

Os indivíduos dos grupos T1 e T3 tiveram uma redução mais acentuada na quantidade total de microrganismos subgengivais logo após a terapia inicial (tempo 0, Figura 14), além de terem mostrado reduções significativas nos níveis de um maior número de espécies (15 e 7, respectivamente) do que os indivíduos que não utilizaram a clorexidina, grupos C e T2 (redução em 4 e 3 espécies respectivamente, Figuras 6-9). Estes resultados estão em concordância com estudos na literatura que sugerem benefícios adicionais em relação à redução da quantidade total de microrganismos no ambiente subgengival quando o controle químico da placa supragengival é associado à terapia de RAR (Bollen *et al.*, 1996; Christie *et al.*, 1998; Quirynen *et al.*, 2000).

Diferenças qualitativas no perfil de recolonização foram também observadas entre os 4 grupos terapêuticos nos níveis e proporções dos diversos microrganismos avaliados. Enquanto os grupos T1 e T3 sofreram alterações significativas nas proporções de 7 e 6 complexos bacterianos, respectivamente, ao longo do estudo, os grupos C e T2 mostraram alterações nas proporções de apenas 3 complexos (Figura 13). Alguns microrganismos patogênicos como *P. acnes* e *P. melaninogenica*

sofreram reduções significativas apenas nos grupos T1 e T3 (Figuras 6-9). Os patógenos do complexo vermelho, *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis*, sofreram uma redução inicial pronunciada nas suas contagens em todos os grupos. Porém, após 63 dias, somente nos grupos T1 e T3 as reduções foram significativamente mantidas para essas 3 espécies. Nos grupos C e T2, *T. denticola* não manteve a redução estatística 63 dias pós-terapia inicial, tampouco *P. gingivalis* no grupo T2.

Os indivíduos que receberam RAR e clorexidina apresentaram alterações nos níveis de um maior número de espécies do complexo laranja ao longo do estudo, em relação aos demais grupos. Quatro das 12 espécies desse complexo foram reduzidas no grupo T1 logo após a terapia inicial. Porém, aos 63 dias, a maioria das espécies pertencentes à esse complexo estava reduzida de forma semelhante em todos os grupos, ou seja, em níveis mais baixos do que no início do estudo, porém sem significância estatística. É interessante observar (Figura 10) como alguns membros desse complexo bacteriano reagiram de forma extremamente semelhante, independentemente da forma de terapia utilizada.

Em relação às espécies consideradas benéficas (complexos amarelo, verde e roxo e os *Actinomyces*), os resultados mostraram um perfil de colonização semelhante nos grupos que utilizaram clorexidina para controlar a formação de placa supragengival, por sua vez diferente dos grupos que não utilizaram o agente químico (Figuras 6-9). De forma geral, nos grupos C e T2, essas espécies foram minimamente afetadas, ou então mostraram um pequeno aumento logo após a terapia inicial. Porém, após 63 dias a maioria dessas espécies estavam em níveis semelhantes aos observados no início do estudo. Já nos grupos T1 e T3, ocorreu uma situação inversa. Logo após a terapia inicial, principalmente no grupo T1, grande parte dessas espécies foram drasticamente reduzidas; aos 42 dias elas já mostravam uma certa recolonização e aos 63 dias, grande parte delas se encontrava em níveis mais altos que os observados inicialmente. Duas espécies benéficas merecem destaque para o aumento aos 63 dias nestes dois grupos, especialmente no grupo T3, *V. parvula* e *S. sanguinis*, que inclusive mostraram-se estatisticamente elevadas neste tempo, antes do ajuste para comparações múltiplas (Figuras 6-9).

Esses resultados sugerem uma tendência a um perfil de recolonização subgengival mais compatível com saúde quando métodos de controle de placa supragengival foram utilizados juntamente e logo após a terapia de RAR em

indivíduos com periodontite crônica, principalmente quando a clorexidina foi utilizada. Uma observação inesperada no presente estudo foi a falta de efetividade observada na terapia de RAR em combinação com a profilaxia profissional repetida (grupo T2). Esses dados diferem dos estudos de Haffajee *et al.* (1999) e Ximénez-Fyvie *et al.* (2000a), que utilizaram a mesma técnica microbiológica do presente estudo e protocolos terapêuticos semelhantes, nos quais os indivíduos com periodontite crônica receberam remoção profissional semanal da placa supragengival por um período de 3 meses após a RAR. Os resultados apresentados por esses autores demonstraram que os níveis médios de 30 (Haffajee *et al.*, 1999) e 34 (Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000a) das 40 espécies avaliadas na placa subgengival nos dois estudos foram significativamente reduzidos pós-terapia, enquanto que na presente investigação apenas 3 das 38 espécies estavam reduzidas após a terapia inicial no grupo T2 (Figura 8). Além disso, em relação ao complexo vermelho, no estudo de Ximénez-Fyvie *et al.* (2000a) os níveis de *P.gingivalis* e *T. forsythensis* permaneceram reduzidos até 1 ano após a terapia. No presente estudo, 42 dias pós-terapia inicial, apenas os níveis de *T. forsythensis* estavam significativamente menores do que os níveis iniciais. Essas divergências nos resultados podem ter sido devido à severidade das condições clínicas entre as populações no início das investigações. Os indivíduos selecionados por Ximénez-Fyvie *et al.* (2000a) se encontravam em fase de manutenção periodontal, apresentando média de profundidade à sondagem de boca toda de  $2,8 \pm 0,4$  mm, e nível clínico de inserção de  $2,7 \pm 0,8$  mm, enquanto que a população do presente estudo apresentava doença periodontal crônica, não tratada, com média de profundidade à sondagem variando, nos 4 grupos, de  $3,49 \pm 0,39$  a  $3,85 \pm 0,66$  e nível clínico de inserção de  $4,05 \pm 1,02$  a  $4,40 \pm 1,02$ . Além disso, vale ressaltar que os sítios aqui selecionados apresentavam profundidade à sondagem entre 5 e 7mm. Esse fato pode interferir com a efetividade do controle mecânico de placa supragengival, que eventualmente pode ser mais eficaz em bolsas rasas e intermediárias do que em bolsas periodontais profundas (Westfelt *et al.*, 1998; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000a; Carvalho, 2002). Carvalho (2002), utilizando a remoção profissional semanal de placa supragengival por 3 meses após a RAR, observou que essa terapia foi mais efetiva em reduzir inflamação em bolsas rasas (< 4mm) e intermediárias (4-6mm) do que em bolsas profundas (>6mm). Os estudos de Ximénez-Fyvie *et al.* (2000a), Carvalho (2002) e a presente investigação sugerem que a remoção profissional repetida da

placa supragengival é mais eficaz quando as profundidades à sondagem indicam periodontite leve a moderada. Sendo assim, a presença de muitas bolsas periodontais profundas pode limitar o efeito benéfico desta terapia na composição da microbiota subgengival e nos parâmetros clínicos periodontais. Porém, é importante mencionar que outros autores observaram um efeito benéfico da remoção profissional de placa bacteriana supragengival também em bolsas moderadas e profundas (Smulow *et al.*, 1983; McNabb *et al.*, 1992; Hellström *et al.*, 1996).

Observou-se também no presente estudo que os níveis de *A. actinomycetemcomitans* não foram significativamente alterados por nenhuma das terapias empregadas, em nenhum tempo do estudo, em concordância com os resultados de estudos anteriores em populações com periodontite crônica não tratada, como os de Haffajee *et al.* (1997), Feres *et al.* (1999, 2001) e Carvalho *et al.* (2005).

O maior benefício na composição da microbiota subgengival foi conseguido com a utilização da clorexidina durante e após o procedimento de RAR. Uma vez que o protocolo de utilização da clorexidina em associação ao controle mecânico da placa, como forma efetiva de tratamento, não foi previamente descrito na literatura, a comparação dos resultados aqui obtidos torna-se limitada. Porém, o efeito positivo dos bochechos com clorexidina na composição da microbiota subgengival já havia sido sugerido por outros autores (Bollen *et al.*, 1996; Quirynen *et al.*, 2000) que utilizaram essa substância, como parte efetiva de terapia, em modelos de desinfecção total de boca (*full mouth disinfection*).

O protocolo de avaliação microbiológica utilizado no presente estudo, em pequenos intervalos de tempo, logo após cada etapa da terapia, gerou informações inéditas e importantes sobre as alterações que ocorrem no ambiente subgengival após os controles de placa sub e supragengivais, salientando o conceito de que este é um processo dinâmico em um ecossistema complexo. Por exemplo, deve-se observar que algumas alterações importantes ocorridas ao final da terapia inicial (tempo 0) não foram mantidas após 63 dias e que outras diferenças não observadas logo após a terapia inicial começaram a ficar mais nítidas ao final do estudo. A Figura 13 mostra como a contagem total de bactérias no ambiente subgengival logo após a terapia inicial (tempo 0) foi marcadamente reduzida quando o método químico de controle da placa supragengival foi utilizado. Porém aos 63 dias, essas diferenças foram se tornando menos evidentes. Por outro lado, logo após a terapia

inicial praticamente todas as espécies do complexo vermelho estavam significativamente reduzidas nos 4 grupos, enquanto que ao final do estudo essa redução somente foi mantida, com significância, nos grupos T1 e T3. Da mesma forma, os indivíduos desses dois grupos, principalmente do grupo T3, mostraram uma maior tendência à recolonização dos sítios tratados por bactérias compatíveis com saúde periodontal, aos 63 dias. É, portanto, de suma importância que esses indivíduos continuem a ser acompanhados clínica e microbiologicamente para que se possa confirmar as tendências aqui observadas. Esse monitoramento está sendo realizado e será essencial para a avaliação final do benefício das diversas terapias aqui propostas na recolonização dos sítios subgengivais tratados.

## **6. CONCLUSÕES**

- A utilização da clorexidina durante e após a RAR tem papel benéfico importante na recolonização subgingival em indivíduos com periodontite crônica não tratados previamente.

- A remoção profissional repetida de placa supragingival durante e após a RAR tem efeito limitado na recolonização subgingival em indivíduos com periodontite crônica não tratados previamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

Addy M, Wright R. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* antibacterial properties of povidone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses. ***J Clin Periodontol.*** 1978; 5: 198-205.

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

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

Albandar JM, Olsen I, Gjermo P. Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. ***Acta Odontol Scand.*** 1990; 48: 415-23.

Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. ***J Periodontol.*** 1992; 63: 540-47.

Ash Jr MM, Gitlin BN, Smith WA. Correlation between plaque and gingivitis. ***J Periodontol.*** 1964; 35: 424-29.

Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. ***J Clin Periodontol.*** 1981; 8: 57-72.

---

\*Baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy II. Severely advanced periodontitis. **J Clin Periodontol.** 1984; 11: 63-76.

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

Beltrami M, Bickel M, Baehni PC. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microflora in human periodontitis. **J Clin Periodontol.** 1987; 14: 161-64.

Bollen CML, Vanderckhove BNA, Papaioannou W, van Eldere J, Quirynen M. Full-versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections- a pilot study: long-term microbiological observations. **J Clin Periodontol.** 1996; 23: 960-70.

Bollen CML, Quirynen M. Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. **J Periodontol.** 1996; 67: 1143-58.

Booth V, Lehner T. Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* antigen recognized by a monoclonal antibody which prevents colonization by the organism. **J Periodont Res,** 1997; 32: 54-6.

Borrajó JLL, Varela LG, Castro GL, Rodríguez-Nuñez I, Figueroa MG, Torreira MG. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. **J Periodontol.** 2002; 73: 317-21.

Briner WW, Grossman E, Buckner RY, Rebitski GF, Sox TE; Setser RE, Ebert ML. Effect of chlorhexidine gluconate mouthrinse on plaque bacteria. **J Periodont Res.** 1986 (Suppl) 44-52.

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

Carvalho LH, D'Ávila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. I. Clinical results. **J Clin Periodontol.** 2004; doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00605x.

Carvalho LH, D'Ávila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. II. Microbiological results. **J Clin Periodontol.** 2005 *in press*.

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

Christie P, Claffey N, Renvert S. The use of 0.2% chlorhexidine in the absence of a structured mechanical regimen of oral hygiene following the non-surgical treatment of periodontitis. **J Clin Periodontol.** 1998; 25: 15-23.

Costerton JW, Cook G, Lamont R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: Newman HN, Wilson M. **Dental Plaque Revisited: oral biofilms in health and disease.** Cardiff: Bioline, 1999; 5-14.

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

Dahan M, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U: The effect of periodontal treatment on the salivary bacterial load and early plaque formation. **J Clin Periodontol** 2004; 31: 972–77.

Darby I, Mooney J, Kinane D. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. **J Clin Periodontol,** 2001; 28: 796-805.

Dahlén G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okamoto H. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. **J Clin Periodontol**, 1992; 19: 802-9.

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. **J Clin Periodontol**. 1988; 15: 316-23.

Eaton KA, Rimini FM, Zak E, Brookman DJ, Hopkins LMA, Cannell PJ *et al*. The effects of a 0,12% chlorhexidine-digluconate-containing mouthrinse versus a placebo on plaque and gingival inflammation over a 3-month period. **J Clin Periodontol**. 1997; 24: 189-197.

Ernst CP, Prockl K, Willershausen B. The effectiveness and side-effects of 0.1% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses: a clinical study. **Quint Int**. 1998; 29 (7): 443-48.

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

Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard K, Som S, Smith C, Goodson M, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. **J Clin Periodontol**. 1999; 26: 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; 28: 597-609.

Furuichi Y, Ramberg P, Krok L, Lindhe J. Short-term effects of triclosan on healing following subgingival scaling. **J Clin Periodontol**. 1997; 24: 777-82.

Gibbons RJ, Socransky SS. Enhancement of alveolar bone loss in gnotobiotic mice harboring human gingival bacteria. **Arch Oral Biol.** 1966; 11: 847-48.

Gjermeo P. Chlorhexidine and related compounds. **J Dent Res.** 1989; 68: 1602-8.

Gmur R, Strub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* on subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. **J Periodont Res.** 1989; 24: 113-20.

Gräber HG, Wilharm J, Conrads G. Monoclonal antibodies against integrin subunits  $\alpha 6$  and  $\beta 1$  inhibit migration of gingival epithelium in organ culture. **J Periodontol.** 1999; 70: 388-93.

Greenstein G. Periodontal response to mechanical non-surgical therapy: a review. **J Periodontol.** 1992; 63: 118-30.

Gursky LC, Faveri M, Figueiredo LC, Feres M, Araujo MWB. Reprodutibilidade de parâmetros clínicos periodontais mensurados por sondas manuais: erro intra- e inter-examinadores. **Rev Paul Odontol.** 2005 (*in press*).

Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features associated with the treatment of active periodontosis lesions. **J Clin Periodontol.** 1984; 11: 600-18.

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

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

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. **J Clin Periodontol.** 1997; 24: 767-76. (b)

Haffajee AD, Ximénez-Fyvie LA, Som S, Socransky SS. Effect of supragingival plaque control on supra and subgingival species [IADR abstract 235]. **J Dent Res.** 1999; 78: 135.

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

Hellén LB, Listgarten MA, Lindhe J. The effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. **J Clin Periodontol,** 1979; 6: 222-30.

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

Joyston-Bechal S, Hernaman N. The effect of a mouthrinse containing chlorhexidine and fluoride on plaque and gingival bleeding. **J Clin Periodontol.** 1993; 20: 49-53.

Kamyia I, Okuda K, Hara K. Flow-cytometric identification and detection of *Porphyromons gingivalis* by a LPS specific monoclonal antibody. **J Periodontol.** 1994; 65: 309-15.

Keyes P, Jordan HV. Periodontal lesions in the Syrian hamster. III. Findings related to an infectious and transmissible component. **Arch Oral Biol.** 1964; 9: 377-400.

Lang NP, Brex MC. Chlorhexidine digluconate- an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. **J Period Res,** 1986; 21(supl. 16), p.74-89.

Lie MA, Danser MM, van der Weijden GA, Timmerman MF, de Graaf J, van der Velden U. Oral microbiota in subjects with a weak or strong response in experimental gingivitis. **J Clin Periodontol.** 1995; 22: 642-47.

Lindhe J, Nyman S. The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. **J Clin Periodontol.** 1975; 2: 67-79.

Lindhe J, Westfeld E, Nyman S, Socransky S, Heijl L, Bratthall G. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. A clinical study. **J Clin Periodontol.** 1982; 9: 115-28.

Lindhe J, Nyman S. Scaling and granulation tissue removal in periodontal therapy. **J Clin Periodontol.** 1985; 12: 374-88.

Listgarten MA. Electron microscopic observations of the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. **J Periodontol.** 1965; 36: 328-39,.

Listgarten MA, Lindhe J, Helldén L. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1978; 5: 246-71.

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

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **J Clin Periodontol.** 1986; 13: 431-45.

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

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

Loesche W. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. **J Periodontol.** 1992; 63: 1102-9.

Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. ***Clin Microb Rev.*** 2001; 14(4): 727-52.

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

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

Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. ***J Dent Res.*** 1992; 71(7): 1431-8.

Maruniak J, Clark WB, Walker CB, Magnusson I, Marks RG, Taylor M *et al.* The effect of 3 mouthrinses on plaque and gingivitis development. ***J Clin Periodontol.*** 1992; 19: 19-23.

McNabb H, Mombeli A, Lang NP. Supragingival cleaning three times a week. The microbiological effects in moderately deep pockets. ***J Clin Periodontol,*** 1992; 19: 348-56.

Moore WEC. Microbiology of periodontal disease. ***J Periodont Res,*** 1997; 22: 335-41.

Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. ***Infection and Immunity,*** 1983; 42: 510-15.

Moore WEC, Holdeman LV, Smibert RM, Hash DE, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. ***Infection and Immunity,*** 1982; 38: 1137-48.

Mousqués T, Listgarten MA, Phillips RW. Effects of scaling and root planing in the composition of human subgingival microflora. ***J Periodont Res.*** 1980; 15: 144-51.

Müller HP, Hartmann J, Flores-de-Jacoby L. Clinical alterations in relation to the morphological composition of the subgingival microflora following scaling and root planing. **J Clin Periodontol.** 1986; 13: 825-32.

Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. **J Periodont Res.** 1977; 120-28.

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

Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. **J Clin Periodontol.** 2001; 28(6): 576-82.

Omar AA, Newman HN, Bulman J, Osborn J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. **J Clin Periodontol.** 1990; 17: 364-70.

Oppermann RV. Effect of chlorhexidine on acidogenicity of dental plaque *in vivo*. **Scand J Dent Res.** 1979; 87: 302-8.

Papapanou PN, Madianos PN, Dahlén G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. **Eur J Oral Sci.** 1997; 105: 389-96.

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

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

Rabbani GM, Ash M, Caffese R. The effectiveness of subgingival scaling and root planing in calculus removal. *J Periodontol.* 1981; 52:119-23.

Ramberg P, Sekino S, Uzel NG, Socransky SS, Lindhe J. Bacterial colonization during de novo plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 990–95.

Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000.* 1996; 10: 139-59.

Rogers AH, Zilm PS, Gully NJ, Pfennig AL. Chlorhexidine affects arginine metabolism as well as glycolysis in a strain of *Streptococcus sanguis*. *Oral Microbiol Immunol.* 1987; 2: 178-82.

Rosenberg E, Evian CI, Listgarten MA. The composition of the subgingival microbiota after periodontal therapy. *J Periodontol.* 1981; 52: 435-41.

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

Sato K, Yoneyama T, Okamoto H, Dahlen G, Lindhe J. The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol,* 1993; 20: 359-65.

Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J Periodontol,* 1990; 61(9): 579-84.

Segreto VA, Collins EM, Beiswanger BB, De La Rosa M, Isaacs RL, Lang NP *et al.* A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. *J Periodont Res.* (suplemento) 1986; 23-32.

Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky SS, Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and de novo plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 919-25.

Shiloah J, Patters MR. Repopulation of periodontal pockets by microbial pathogens in the absence of supportive therapy. **J Periodontol.** 1996; 67: 130-39.

Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. **Scand J Dent Res.** 1976; 84: 1-10.

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

Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. **J Periodont Res** 2002; 37: 389–98.

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

Smulow JB, Turesky SS, Hill RG. The effect of supragingival plaque removal on anaerobic bacteria in deep periodontal pockets. **J Amer Dent Res.** 1983; 107: 737-42.

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

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

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

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster JB, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard DNA-DNA Hybridization". **Biotechniques,** 1994; 17: 788-92.

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; 8: 766-75.

Socransky SS. Microbiology of periodontal disease- present status and future considerations. **J Periodontol.** 1977; 48: 497-504.

Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. **J Dent Res.** 1970; 49: 203-22.

Stoodley P. Biofilm structure and behaviour: influence of hydrodynamics and nutrients. In: Newman HN, Wilson M. **Dental Plaque Revisited:** oral biofilms in health and disease. Cardiff: Bioline, 1999; 63-72.

Tabita PV, Bissada NF, Maybury JE. Effectiveness of supragingival plaque control on the development of subgingival plaque and gingival inflammation in patients with moderate pocket depth. **J Periodontol.** 1981; 52: 83-93.

Tanner ACR, Haffer C, Brathall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. **J Clin Periodontol.** 1979; 6: 278-307.

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

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

Westfeld E, Rylander H, Dahlén G, Lindhe J. The effect of supragingival plaque control on the progression of advanced periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1998; 25: 536-41.

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

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

## ANEXOS

### ANEXO A



## Mestrado Acadêmico em Odontologia

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE

Por esse instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu (nome) \_\_\_\_\_, (nacionalidade) \_\_\_\_\_, (profissão) \_\_\_\_\_, portador do R.G. \_\_\_\_\_, C.I.C. \_\_\_\_\_, residente \_\_\_\_\_ e \_\_\_\_\_ domiciliado \_\_\_\_\_ à rua \_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_, Estado de \_\_\_\_\_, concordo em participar dessa pesquisa. Estou ciente que essa pesquisa pretende estudar o efeito do uso de bochechos antimicrobianos e do controle da higiene oral associados ao tratamento tradicional de raspagem na eliminação da doença periodontal. A doença periodontal é uma inflamação das gengivas e pode levar até à perda dos dentes. É causada pela presença de placa dentária, uma camada localizada na superfície dos dentes e composta por microrganismos (germes) que causam a inflamação nas gengivas. Para participar deste estudo é necessário ter a doença periodontal, estar com boa saúde geral, não ter sofrido tratamento nas gengivas, nem tomado antibióticos ou utilizado bochechos nos últimos 6 meses, e quando mulheres, não estar grávida ou amamentando.

Os participantes serão submetidos a um exame completo dos dentes e das gengivas que serão efetuados por profissionais formados em Odontologia, sob a supervisão de professores na Clínica Odontológica da UnG. Nesta oportunidade, amostras de placa dentária serão coletadas para a realização do exame microbiológico e identificação dos microrganismos envolvidos na doença periodontal. O tratamento utilizado será de raspagem das superfícies dos dentes: coroa e raiz, e uso de dois bochechos diários com solução antimicrobiana ou com placebo (sem efeito terapêutico) que ajuda na eliminação dos microrganismos (germes) presentes na placa dentária causadora da doença nas gengivas. Alguns pacientes também receberão controle profissional da higiene bucal (profilaxia) duas vezes/semana. Estes procedimentos são simples, além de serem completamente indolores. O estudo terá duração de aproximadamente 3 meses e envolverá várias consultas (10 visitas em média) de aproximadamente 1 hora. Pacientes que necessitarem de outros tratamentos serão encaminhados às diferentes especialidades na Clínica de Graduação.

Esclareço que recebi todas as informações sobre a minha participação nesse estudo, e a garantia de que receberei novos esclarecimentos que julgar necessários durante o decorrer da pesquisa. Esclareço também que fui verbalmente informado sobre os possíveis benefícios e riscos, assim como todos os passos deste experimento serão acompanhados por um Pesquisador Responsável. Como já foi dito acima, fui informado que os procedimentos são simples, que não oferecem risco aos pacientes e serão realizados por profissionais com experiência.

Tomei conhecimento de que não terei custos extras e que tenho plena liberdade para recusar a participação na referida pesquisa a qualquer momento, sem penalização alguma. Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e a publicação dos dados e resultados obtidos do relatório geral da pesquisa, a qual estou em concordância. Entretanto, recebi a garantia do sigilo que assegura a privacidade dos participantes do estudo, uma vez que os dados obtidos são confidenciais.

Por estar em pleno acordo com o presente termo, assino abaixo o mesmo.

Guarulhos, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente

\_\_\_\_\_  
Dra. Magda Feres - CRO-SP 77.854  
Pesquisador Responsável

Dúvidas: Universidade Guarulhos- Telefone: 6464-1684.

## **ANEXO B**

### **Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa**

## ANEXO C

### REPRODUTIBILIDADE DE PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS MENSURADOS POR SONDAS MANUAIS: ERRO INTRA- E INTER-EXAMINADORES.

### REPRODUCIBILITY OF CLINICAL PERIODONTAL PARAMETERS MEASURED BY MANUAL PROBES: INTRA- AND INTEREXAMINER ERROR.

Lauren Christine GURSKY<sup>1</sup>; Marcelo de FAVERI<sup>1</sup>; Luciene Cristina de FIGUEIREDO<sup>2</sup>; Magda FERES<sup>3</sup>; Marcelo Werneck Barata de ARAUJO<sup>2</sup>.

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade inter- e intra-examinadores de parâmetros clínicos de profundidade à sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), utilizando-se sondas periodontais manuais, usando o erro padrão da medida (e.p.m.) e o erro médio percentual (erro%), propondo-se assim um método para a calibração de estudos clínicos. Foram selecionados 10 indivíduos com periodontite crônica, de ambos os gêneros, com idade superior a 30 anos. Durante a calibração de 2 examinadores (A e B), foram utilizadas sondas periodontais manuais, com as quais foram mensurados a PS e o NCI em 6 sítios de todos os dentes presentes no quadrante superior direito. As mensurações foram feitas em 2 seqüências, com um intervalo de 10 minutos entre as mesmas, repetindo-se este procedimento após 30 minutos. Os dados foram analisados estatisticamente para a determinação do e.p.m. e erro% para os 2 parâmetros (PS e NCI). Os resultados inter-examinadores demonstraram e.p.m. PS=0,14 mm e erro% PS=4,30%; e e.p.m. NCI=0,31mm e erro% NCI=7,86%. Em relação ao erro intra-examinador, os dados mostram que o examinador A obteve e.p.m. PS=0,12mm e erro% PS=3,66%, e.p.m. NCI=0,14mm e erro% NCI=3,42%, e o examinador B obteve e.p.m. PS=0,15mm e erro% PS=4,65%, e e.p.m. NCI=0,17mm e erro% NCI=4,31%. Os valores de e.p.m. e erro% indicam uma reprodutibilidade aceitável dentro dos parâmetros de pesquisa clínica periodontal. Ainda, este tipo de análise de dados permite um monitoramento longitudinal mais preciso dos parâmetros periodontais.

#### ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the variability and reproducibility inter and intra-examiner of measurements currently used in Periodontology, such as probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL), by determining the standard error of measurement (s.e.m.) and mean percent error (%error).proposing a new method of calibration for clinical trials. Ten volunteers of both genders, older than 30 years of age, with chronic periodontitis were examined. During the calibration procedures, 2 trained examiners measured PD and CAL in 6 sites of all teeth present at the right quadrant of the patients' mouths. The measurements were taken with a manual periodontal probe by examiners A and B with an interval of 10 minutes, and again after 30 minutes. Data were analyzed in order to determine s.e.m. and %error. Results showed s.e.m. inter-examiner for PD=0.14mm and %error=4.30%; and CAL s.e.m.=0.31mm and %error=7.86%. When determining the s.e.m. intra-examiners for examiner A, the results indicated PD s.e.m.=0.12mm and %error=3.66%, while the measurements of CAL resulted in s.e.m.=0.14mm and %error =3.42%. Examiner B had s.e.m. PD=0.15mm, %error PD =4.65%, s.e.m. CAL=0.17mm and %error =4.31%. Values of s.e.m. and %error indicated an acceptable reproducibility for clinical periodontal research. The determination of the s.e.m. and %error is important when monitoring the data collection and is important to increase the validity of results.

ESPECIALIDADE: **PERIODONTIA**

PALAVRAS-CHAVE: **Diagnóstico periodontal; sondas periodontais reprodutibilidade de resultados.**

KEY WORDS: **Periodontal diagnosis; periodontal probes; reproducibility of results.**

#### INTRODUÇÃO E REVISTA DA LITERATURA

<sup>1</sup> Alunos do Curso de Mestrado Acadêmico em Odontologia, Área de Concentração: Periodontia, Universidade Guarulhos.

<sup>2</sup> Professores Doutores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração: Periodontia, Universidade Guarulhos.

<sup>3</sup> Professora Doutora, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração: Periodontia, Universidade Guarulhos.

Nos últimos anos, vários métodos foram apresentados e utilizados para descrever os aspectos clínicos da doença periodontal (RUSSEL<sup>27</sup>, 1956; RAMFJORD<sup>24</sup>, 1959; LÖE<sup>15</sup>, 1967; AINAMO e BAY<sup>1</sup>, 1975). As formas mais utilizadas para acessar o dano provocado aos tecidos periodontais são a detecção visual dos sinais clínicos de destruição tecidual, a mensuração da profundidade da bolsa e do nível clínico de inserção através da sondagem e a detecção radiográfica da perda óssea alveolar (ARMITAGE<sup>3</sup>, 1996).

Na clínica, a profundidade à sondagem (PS) indica a distância entre a margem gengival e a base do sulco ou da bolsa periodontal, e o nível clínico de inserção (NCI) indica a distância da junção cimento-esmalte à base do sulco sondável. Estas medidas são parte essencial de um exame periodontal completo, posto que bolsas com PS aumentada representam reservatórios bacterianos potenciais, enquanto o nível clínico de inserção representa uma medida aproximada da inserção conjuntiva na raiz, sendo considerado a medida padrão para diagnóstico da doença periodontal (ARMITAGE<sup>3</sup>, 1996).

No contexto epidemiológico, a validade e a confiabilidade das mensurações periodontais referem-se basicamente à reprodutibilidade e à variabilidade, respectivamente capacidade de repetição dos valores de mensuração de um índice periodontal indicador da condição clínica e obter-se a mesma medida em mais de uma vez (SPOLSKY E GORNBEIN<sup>28</sup>, 1996). O uso de índices de medida por múltiplos examinadores pode ser difícil, devido às diferenças na interpretação dos critérios, o que por sua vez pode gerar resultados não passíveis de comparações entre si. Ainda, mesmo quando os critérios estão bem estabelecidos, problemas podem ocorrer devido aos erros casuais ou sistemáticos cometidos por diferentes examinadores, ou seja, viés de examinador (MEDRONHO<sup>17</sup>, 2002). Isto indica que é extremamente necessário que os investigadores apresentem um nível de reprodutibilidade aceitável.

A sondagem apresenta erros de medida inerentes de uma grande variedade de fatores, como aqueles relacionados ao instrumento (sonda periodontal), paciente, examinador e severidade da doença (van der VELDEN e de VRIES<sup>30</sup>, 1980; BADERSTEN<sup>5</sup> et al., 1984; MACHTEI<sup>16</sup> et al., 1993). Medidas feitas com sondas periodontais manuais estão sujeitas à experiência do examinador, ao seu correto posicionamento (angulação) e à correta localização da

junção cimento-esmalte, ainda possuindo variações quanto à sua fabricação, por exemplo, podem ocorrer diferenças nas marcações de até 0,5mm, dependendo da marca comercial (ARMITAGE<sup>3</sup>, 1996).

Além da experiência do examinador, a sondagem depende também da distribuição da doença na população em estudo. Por exemplo, se a população em questão possui um grau de doença mais avançado, com bolsas profundas, isto implicaria em uma maior possibilidade de erro durante as medições (GLAVIND e LÖE<sup>8</sup>, 1967; NYMAN<sup>18</sup> et al., 1975; ROSLING<sup>26</sup> et al., 1976; BADERSTEN<sup>5</sup> et al., 1984). Além disto, existem variações devido à sondagem feita por múltiplos examinadores, e até mesmo variações entre duas seqüências de sondagem feitas pelo mesmo examinador (HAFFAJEE<sup>12</sup> et al., 1985; PIHLSTROM<sup>21</sup>, 1992). Como as sondas manuais são o principal instrumento da clínica de Periodontia, por fornecer ao clínico informações importantes como a severidade da doença e a resposta ao tratamento, torna-se clara a importância da reprodutibilidade das medidas. As conseqüências do erro de mensuração em estudos clínicos são em geral o aumento da variância da estimativa do parâmetro e estimativas errôneas de prevalência e incidência da doença, fatores que reduzem a sensibilidade do estudo (KINGMAN<sup>13</sup> et al., 1991).

Os erros de reprodutibilidade descritos na literatura normalmente variam entre 0,40 mm e 0,80 mm para examinadores com experiência (GLAVIND e LÖE<sup>8</sup>, 1967; BADERSTEN<sup>5</sup> et al., 1984; GOODSON<sup>9</sup> et al.; 1986), sendo que uma diferença média de 1mm é aceita para variações quanto aos parâmetros clínicos (HAFFAJEE<sup>11</sup> et al., 1983), principalmente quando uma sonda periodontal manual é usada durante o exame (ARMITAGE<sup>4</sup> et al., 1977; BADERSTEN<sup>5</sup> et al., 1984). Em 1983, HAFFAJEE<sup>11</sup> et al. propuseram o “Método de Tolerância” para determinar a reprodutibilidade das mensurações clínicas usadas para o diagnóstico da doença periodontal. Neste método, a diferença existente entre mensurações repetidas foi usada para calcular um erro padrão do próprio examinador. A mensuração foi considerada confiável se estivesse dentro de um intervalo de três vezes o erro padrão do examinador. De acordo com ARAUJO<sup>2</sup> et al. (2003), o valor desta mensuração pode ser considerado tanto quando se estabelece o erro intra-examinador, quanto o erro inter-examinador.

Protocolos clínicos de projetos de pesquisa periodontal requerem, portanto, uma concordância inter- e intra-examinadores para todos os parâmetros clínicos. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade inter- e intra-examinadores de parâmetros clínicos de PS e NCI, utilizando-se sondas periodontais manuais, propondo-se assim um método para a calibração de estudos clínicos, por meio de erro padrão da medida (e.p.m.) e erro percentual (erro%).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Seleção da amostra – Critérios de inclusão e exclusão:**

Foram selecionados 10 voluntários apresentando doença periodontal crônica, entre aqueles que procuraram atendimento odontológico na Universidade Guarulhos. Foram incluídos todos os pacientes que possuíam as seguintes características: idade superior a 30 anos e mínimo de 20 dentes, excluindo-se os terceiros molares.

A adesão do paciente à pesquisa foi obtida por meio de um termo de consentimento livre e esclarecido contendo informações detalhadas a respeito da pesquisa, seus objetivos, conseqüências, riscos e desconfortos, segundo as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96), o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos.

### **Método**

A metodologia foi similar àquela empregada por ARAUJO<sup>2</sup> et al. (2003), onde as mensurações clínicas foram realizadas em apenas um quadrante, o superior direito (quadrante 1). Os exames clínicos foram realizados por dois examinadores diferentes, em duas seqüências, realizadas no mesmo dia. Na primeira seqüência, o exame clínico foi realizado pelo examinador “A”, e após 10 minutos o examinador “B” realizou seu exame, no mesmo quadrante, do mesmo paciente. Um intervalo de 30 minutos foi estabelecido para que a segunda etapa de mensurações

fosse realizada. Nesta segunda etapa o mesmo protocolo foi usado, e o mesmo quadrante examinado, enquanto que as mensurações seguiram uma ordem inversa quanto ao examinador “A” e “B”, para diluir possíveis erros devido à ordem de sondagem.

### **Avaliação Clínica**

As avaliações clínicas foram realizadas utilizando-se sondas periodontais manuais (PC15-BR – HU-FRIEDY) na mensuração de profundidade à sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI). Foram avaliados seis sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual). Todas as mensurações clínicas foram realizadas no mesmo momento, conforme supracitado. Os dados obtidos nos exames clínicos periodontais foram anotados em fichas clínicas elaboradas para tal finalidade e analisados com o programa Microsoft Excel.

### **Análise dos Dados**

A variabilidade intra e inter-examinadores foi calculada utilizando as médias dos e.p.m. dos operadores. O cálculo para o erro padrão da medida foi feito por meio da raiz quadrada da variabilidade do sítio específico, que foi calculada pela divisão da soma da diferença entre duas medidas elevada ao quadrado, dividida pelo número de pares de mensuração, da seguinte forma:

$$\text{Erro padrão da medida (e.p.m.)} = \sqrt{(\sum D^2 / 2N)}$$

(onde D= Diferença entre os dois valores médios para cada dente por sujeito entre examinadores, e N= Número de sujeitos).

A variabilidade intra-examinadores foi determinada por valores de medida do mesmo examinador em duas ocasiões diferentes. A variabilidade entre examinadores foi determinada pela diferença obtida por dois examinadores na mesma ocasião, com intervalos de 10 minutos, a um nível de significância de 95%.

## RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os valores para variabilidade intra-examinadores quanto aos parâmetros clínicos de PS e NCI. A média das mensurações para PS foi de 3,14 (0,61)mm para o examinador A, e de 3,18(0,54)mm para o examinador B. O e.p.m. e o erro% foram de 0,12mm e 3,66%, e 0,15mm e 4,65%, para os examinadores A e B, respectivamente. Em relação à variabilidade intra-examinador para as mensurações do parâmetro clínico de NCI, o examinador A teve uma média de 4,04(0,93)mm. O e.p.m. e o erro% para este examinador foram de 0,14mm e 3,42%. Para o examinador B, a média foi de 3,86(0,85)mm, com e.p.m. de 0,17mm e erro % de 4,31%.

	<b>Tabela 1</b>	
--	-----------------	--

A variabilidade inter-examinadores para PS mostrou e.p.m. de 0,14mm, com erro% de 4,30%. Quanto ao NCI, o e.p.m. para os examinadores foi de 0,31mm, com erro% de 7,86% (Tabela 2).

	<b>Tabela 2</b>	
--	-----------------	--

## DISCUSSÃO

Apesar do desenvolvimento de sondas automatizadas, a sonda periodontal manual ainda é a mais utilizada na clínica Odontológica (OSBORN<sup>19</sup> et al., 1990).

O primeiro estudo baseado em dados obtidos de mensurações feitas com sondas manuais na literatura é o de GLAVIND e LÖE<sup>8</sup>, de 1967, no qual os autores então sugeriam que as medidas obtidas com sondas periodontais manuais poderiam ser reprodutíveis com diferenças de até 1mm entre os examinadores. Os resultados deste estudo mostram reprodutibilidades de 99,6% para PS e 94,8% para NCI, com erros de 0,36mm para PS e 0,41mm para NCI.

Em 1995, WANG<sup>31</sup> et al. realizaram um estudo no qual dois examinadores realizaram mensurações de PS e NCI relativo (NCIR), utilizando uma sonda manual. Repetições das mensurações foram feitas com intervalos de 7 a 10 dias, e as medidas foram estimadas a cada 0,5mm (apesar da sonda ser calibrada a cada 1mm). Este estudo mostrou resultados altamente reprodutíveis, apesar das estimações serem feitas a cada 0,5mm. Para diferenças de 1,0mm entre as mensurações intra-examinador, os resultados foram reprodutíveis em 98,6% das vezes, e para inter-examinadores, 99,2%, demonstrando a alta reprodutibilidade das mensurações feitas com sonda manual.

GROSSI<sup>10</sup> et al., num estudo realizado em 1996, reportaram medidas de PS e NCI com uma sonda automatizada (*Florida Probe*<sup>®</sup>) e sondas manuais, em pacientes com doença periodontal crônica moderada a severa. Estes examinadores (previamente calibrados) fizeram mensurações duplicadas de 5771 sítios com a *Florida Probe*<sup>®</sup> e de 1488 sítios com sondas manuais. A confiabilidade das mensurações realizadas com a *Florida Probe*<sup>®</sup> resultou em um e.p.m. intra-examinador de 0,46mm para PS e 0,57mm para NCI, enquanto com a sonda convencional o e.p.m. intra-examinador foi de 0,44mm para PS e 0,56mm para NCI.

ARAUJO<sup>2</sup> et al. (2003) utilizaram uma sonda automatizada, de pressão constante de 20g, para acessar a reprodutibilidade da mensuração da PS, tanto intra- quanto inter-examinador. Os examinadores realizaram mensurações em 20 voluntários com saúde periodontal. Os resultados deste estudo mostraram e.p.m. de 0,40 mm para os 3 examinadores envolvidos, e e.p.m. de 0,38mm, 0,39mm e 0,42mm para os examinadores A, B e C, respectivamente.

Os resultados do presente estudo mostraram e.p.m.s intra-examinadores para PS de 0,12mm para o examinador A e de 0,15mm para o examinador B. Para NCI os e.p.m.s foram de 0,14mm para o examinador A e 0,17mm para o examinador B. O e.p.m. inter-examinador foi 0,14mm para PS e 0,31mm para NCI. Estes resultados mostraram e.p.m.s menores que os de resultados previamente reportados (GLAVIND e LÖE<sup>8</sup>, 1967; ARMITAGE<sup>4</sup> et al., 1977; HAFFAJEE<sup>11</sup> et al., 1983; BADERSTEN<sup>5</sup> et al., 1984; GOODSON<sup>9</sup> et al.; 1986; GALGUT e WAITE<sup>7</sup>, 1990; VILLATA e BAELUM<sup>29</sup>, 1996; ARAUJO<sup>2</sup> et al., 2003), sugerindo que a

reprodutibilidade intra e inter-examinadores com sondas periodontais manuais pode ser obtida a níveis menores de 0,40mm tanto para o parâmetro de PS quanto para o de NCI.

A determinação da variabilidade e reprodutibilidade de medidas de índices periodontais utilizando-se diferentes tipos de sondas foi relatada por diversos autores (BADERSTEN<sup>5</sup> et al., 1984; CLARK<sup>6</sup> et al., 1992; POLSON<sup>22</sup>, 1997; ARAUJO<sup>2</sup> et al., 2003) e na maioria das investigações verificou-se que a sonda eletrônica, principalmente a de força constante e computadorizada, tal como a *Florida Probe*<sup>®</sup>, têm vantagens sobre a sonda manual, por sua capacidade de diminuir o erro durante as mensurações (OSBORN<sup>19</sup> et al., 1990; PIHLSTROM<sup>21</sup>, 1992; REDDY<sup>25</sup>, 1997; ARAUJO<sup>2</sup> et al., 2003). Observa-se também por estudos que utilizaram os dois tipos de sonda um erro maior obtido com a sonda manual, além de uma freqüência maior de fatores supracitados para erro. As medidas de PS e NCI feitas com este instrumento podem sofrer variações dependentes do examinador, posto que geralmente são arredondadas para a próxima maior medida (PERRY<sup>20</sup> et al., 1994). QUIRYNEN<sup>23</sup> et al. (1993) destacaram que os examinadores tendem a reportar valores maiores para os índices de PS e NCI. Entretanto, este erro não é grande o suficiente para impossibilitar o uso do instrumento na clínica diária ou mesmo em pesquisas (BADERSTEN<sup>5</sup> et al., 1984; KINGMAN<sup>13</sup> et al., 1991; PIHLSTROM<sup>21</sup>, 1992; GROSSI<sup>10</sup> et al., 1996; KOCH e PAQUETTE<sup>14</sup>, 1997; REDDY<sup>25</sup>, 1997).

Vale salientar que os resultados apresentados neste estudo são válidos e de acordo com a literatura (BADERSTEN<sup>5</sup> et al., 1984; GOODSON<sup>9</sup> et al.; 1986; GALGUT e WAITE<sup>7</sup>, 1990; VILLATA e BAELUM<sup>29</sup>, 1996; ARAUJO<sup>2</sup> et al., 2003). Contudo, os níveis de erro aqui descritos só devem explicar a variabilidade de mensurações feitas em indivíduos com as características deste grupo. Os examinadores que participaram do estudo mostraram-se aptos para realizar avaliações clínicas em estudos periodontais que utilizam a PS e o NCI mensurados com sondas periodontais manuais como métodos de diagnóstico e progressão da doença periodontal.

## CONCLUSÃO

Os valores de e.p.m. e erro% indicam uma reprodutibilidade aceitável dentro dos parâmetros de pesquisa clínica periodontal. Ainda, este tipo de análise de dados permite um monitoramento longitudinal mais preciso dos parâmetros periodontais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int. Dent. J.*, v.25, p.229-35, 1975.
2. ARAUJO M.B.W.; HOVEY, K.M.; BENEDEK, J.R.; GROSSI, S.G.; DORN, J.; WACTAWSKI-WENDE, J.; GENCO,R.J.; TREVISAN, M. Reproducibility of Probing Depth Measurements Using a Constant Force Electronic Probe: Analysis of Inter- and Intra-Examiner Variability. *J. Periodontol.* 2003; 74:84.
3. ARMITAGE, G.C. Periodontal diseases: diagnosis. *Ann. Periodontol.*; 1996; 1(1):52-98.
4. ARMITAGE, G.C.; SVANBERG G.K.; LÖE, H. Microscopic evaluation of clinical measurements of connective tissue attachment levels. *J. Clin. Periodontol.* 1977; 4: 173-190.
5. BADERSTEN, A.; NILVEUS, R.; EGELBERG, J. Reproducibility of probing attachment levels measurements. *J. Clin. Periodontol.* 1984; 11:475-485.
6. CLARK, W.B.; *et al.* Measuring clinical attachment: reproducibility of relative measurements with an electronic probe. *J. Periodontol.*, 1992; 63: 831-838.
7. GALGUT, PN; WAITE, IM. A comparison between measurements made with a conventional periodontal pocket probe, an electronic pressure probe and measurements made at surgery. *Int. Dent. J.*, 1990; 40(6): 333-338.
8. GLAVIND, L.; LÖE, H. Errors in the clinical assessment of periodontal disease destruction. *J. Periodont. Res.* 1967; 2: 180-184.
9. GOODSON, J.M. Clinical measurements of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 1984; 13: 466.

10. GROSSI, S.G.; DUNFORD, R.G.; HO, A.; MACHTEI, E.E.; GENCO R.J. Sources of error for periodontal probing measurements. *J. Periodont. Res.* 1996;31:303-336.
11. HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; GOODSON, J.M. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J. Clin. Periodontol.* 1983;10:298-310.
12. HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; GOODSON, J.M.; LINDHE, J. Intraclass correlations of periodontal measurements. *J. Clin. Periodontol.* 1985; 12:216-224.
13. KINGMAN, A.; LÖE, H.; ANERUD, A.; BOYSEN, H. Errors in measuring parameters associated with periodontal e health disease. *J. Periodontol.* 1991;62:477-86.
14. KOCH, G.C.; PAQUETTE, D.W. Design principles and statistical considerations in periodontal clinical trials. *Ann. Periodontol.*, 1997; 2:42-63.
15. LÖE, H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.*, 1967; 38-610-616.
16. MACHTEI, E.E. *et al.* A stepwise approach to determine periodontal attachment loss in longitudinal studies. *J. Periodont. Res.*, 1993; 28: 536-539.
17. MEDRONHO, R.A. *Epidemiologia*. Editora Atheneu, 2002, RJ. 601p.
18. NYMAN, S.; ROSLING, B.; LINDHE, J. Effect of professional tooth cleaning on healing after periodontal surgery. *J. Clin. Periodontol.*, 1975, 2:80-86.
19. OSBORN, J.B.; STOLTENBERG, J.L.; HUSO, B.A., AEPPLI, D.M., PIHLSTROM, B.L. Comparison of measurement variability in subjects with moderate periodontitis using conventional and constant force periodontal probe. *J. Periodontol.* 1992;63:283-289.

20. PERRY, D.A.; TAGGART, E.J.; LEUNG, A.; NEWBRUN, E. Comparison of a conventional probe with electronic and manual pressure regulated probes. *J. Periodontol.*, 1994; 65: 908-913.
21. PIHLSTROM, B.L. Measurement of Attachment level in clinical trials: Probing methods. *J. Periodontol.* 1992; 63:1072-1077.
22. POLSON, A.M. The research team, calibration, and quality assurance in clinical trials in periodontics. *Ann. Periodontol.*, 1997; 2:75-82.
23. QUIRYNEN, M.; CALLENS, A.; van STEENBERGHE, D.; NYS, M. Clinical evaluation of a constant electronic probe. *J. Periodontol.*, 1993; 64:35-39.
24. RAMFJORD, S.P. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. *J. Periodontol.*, 1959; 30:51-56.
25. REDDY, M.S. The use of periodontal probes and radiographs in clinical trials of diagnostic tests. *Ann. Periodontol.*, 1997; 2:113-122.
26. ROSLING, B.; NYMAN, S.; LINDHE, J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. *J. Clin. Periodontol.*, 1976; 3:38-53.
27. RUSSEL, A.L. A system of classification and scoring for prevalence surveys of periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 1956; 35:350-355.
28. SPOLSKY, V.W.; GORNBEIN, J.A. Comparing measures of reliability for indices of gingivitis and plaque. *J. Periodontol.*, 1996; 67:853-859.
29. VILLATA, L.; BAEUM, V. Reproducibility of attachment level recordings using an electronic and a conventional probe. *J. Periodontol.* 1996;67:1292-1300.
30. VAN DER VELDEN, U.; DE VRIES, J.H. The influence of probing force on the reproducibility of pocket depth measurements. *J. Clin. Periodontol.*, 1980, 7: 414-420.

31. WANG, S.; LEKNES, K.N.; ZIMMERMAN, G.J.; SIGURDSSON, T.J.; WIKESJÖ, U.M.E.; SELVIG, K.A. reproducibility of periodontal probing using a conventional manual and an automated force-controlled electronic probe. *J. Periodontol.*, 1995; 66:38-46.

**Tabela 1:** Resultados intra-examinadores para profundidade à sondagem e nível clínico de inserção.

Variável	Examinador	Média (mm) das mensurações		Média Total (DP) (mm)	e.p.m. (mm)	erro%
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>			
PS	A	3,138	3,151	3,14 (0,61)	0,12	3,66
	B	3,103	3,259	3,18 (0,54)	0,15	4,65
NCI	A	4,003	4,080	4,04 (0,93)	0,14	3,42
	B	3,814	3,888	3,86 (0,85)	0,17	4,31

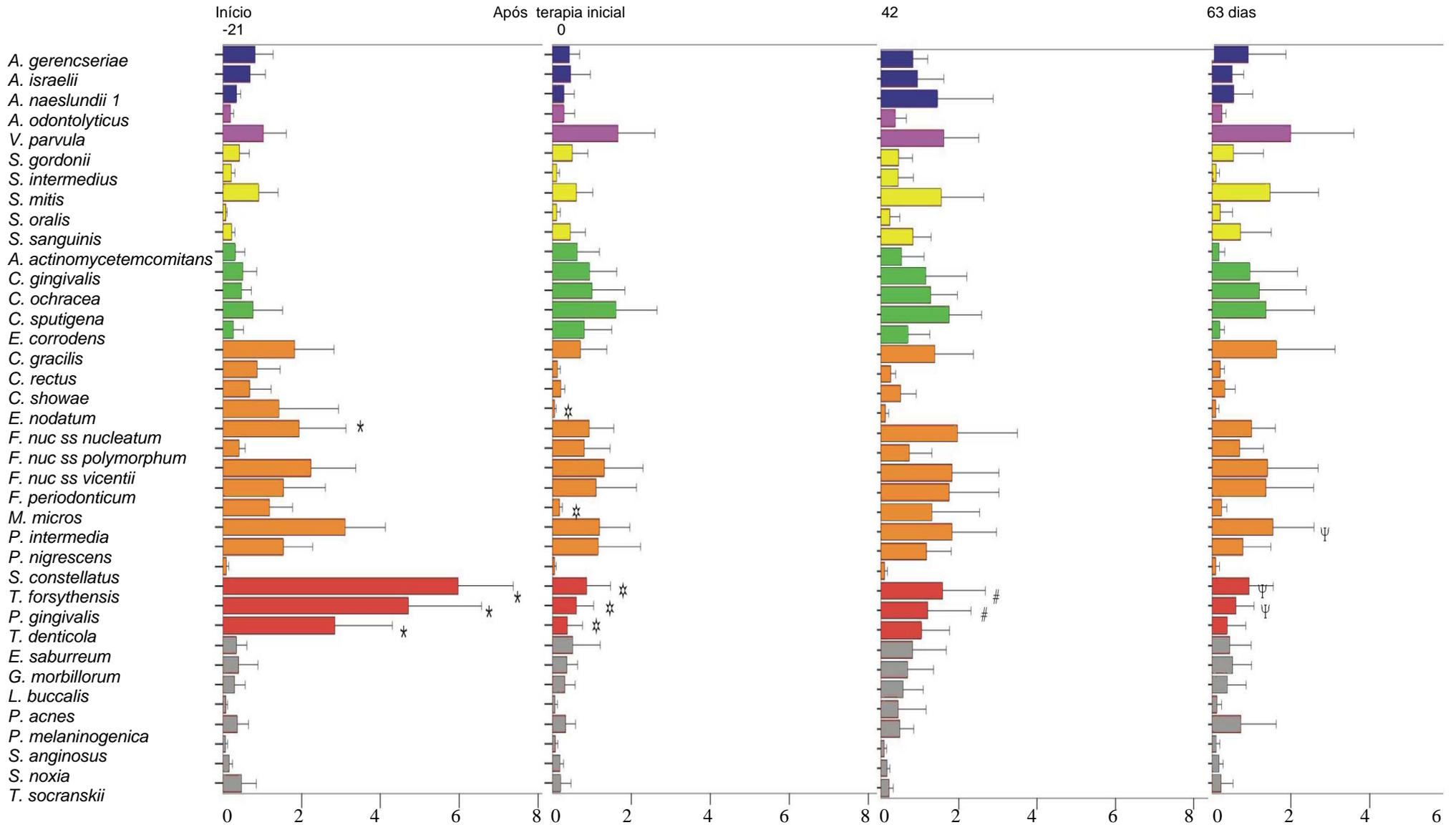
DP= desvio padrão; PS= profundidade à sondagem; NCI= nível clínico de inserção

**Tabela 2:** Resultados inter-examinadores para profundidade à sondagem e nível clínico de inserção.

Variável	Média (DP) das mensurações (mm)		Média A e B (DP) (mm)	e.p.m. (mm)	erro %
	Examinador A	Examinador B			
PS	3,14 (0,61)	3,18 (0,54)	3,17 (0,57)	0,14	4,30
NCI	4,04 (0,93)	3,86 (0,85)	3,95 (0,87)	0,31	7,86

DP= desvio padrão; PS= profundidade à sondagem; NCI= nível clínico de inserção

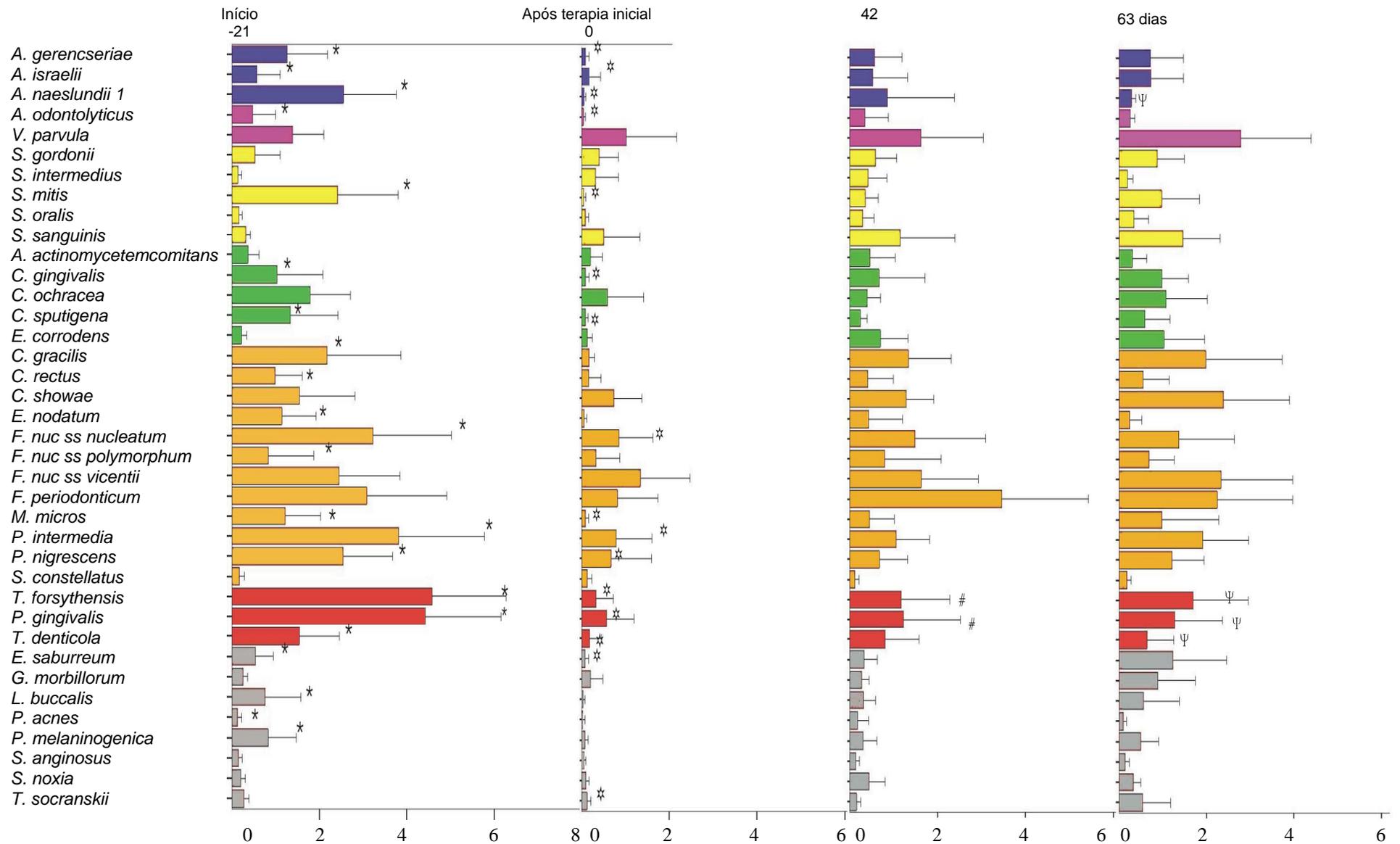
## GRUPO C (RAR)



**Figura 6.** Gráfico de barras das médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgingival no início do estudo (-21), ao final da terapia inicial (0), 42 e 63 dias após, nos indivíduos do grupo controle (C). Teste Friedman: diferenças ao longo do período experimental, \* $p < 0,05$ . Teste Wilcoxon: diferenças entre dois tempos experimentais; após terapia inicial (0) e início (-21), \*  $p < 0,05$ ; 42 dias e início (-21), #  $p < 0,05$ ; 63 dias e início (-21),  $\Psi$   $p < 0,05$ . Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: ■ Actinomycetes. ■ roxo. ■ verde. ■ amarelo. ■ laranja. ■ vermelho. ■ outros microrganismos.

## T1 (RAR + CLX)

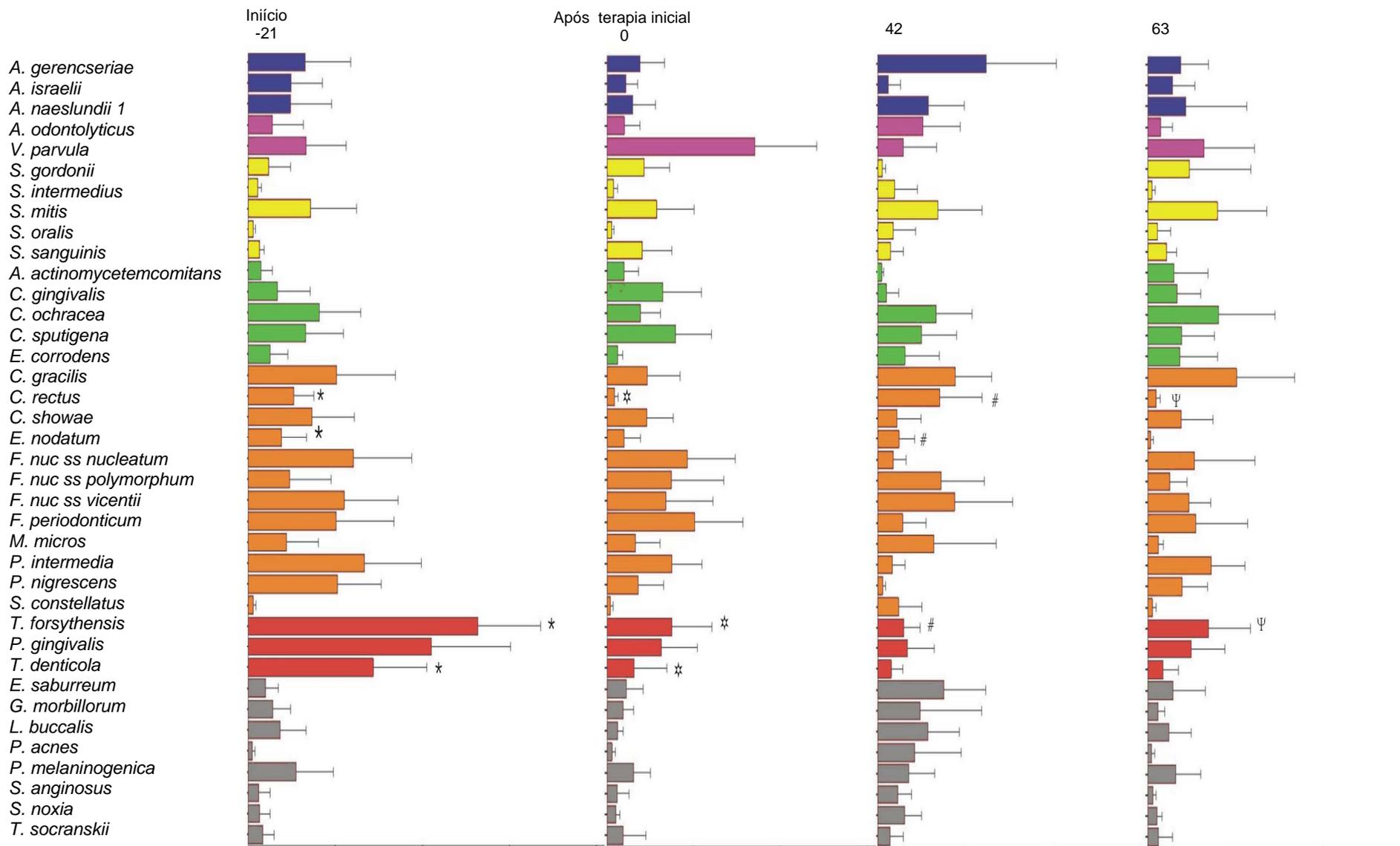


**Figura 7.** Gráfico de barras das médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgengival no início do estudo (-21), ao final da terapia inicial (0), 42 e 63 dias após, nos indivíduos do grupo T1. Teste Friedman: diferenças ao longo do período experimental, \* $p < 0,05$ . Teste Wilcoxon: diferenças entre dois tempos experimentais; após terapia inicial (0) e início (-21), \* $p < 0,05$ ; 42 dias e início (-21), # $p < 0,05$ ; 63 dias e início (-21),  $\Psi p < 0,05$ . Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: *Actinomycetes* verde roxo amarelo laranja vermelho outros microrganismos



## T2 (RAR + PPP)

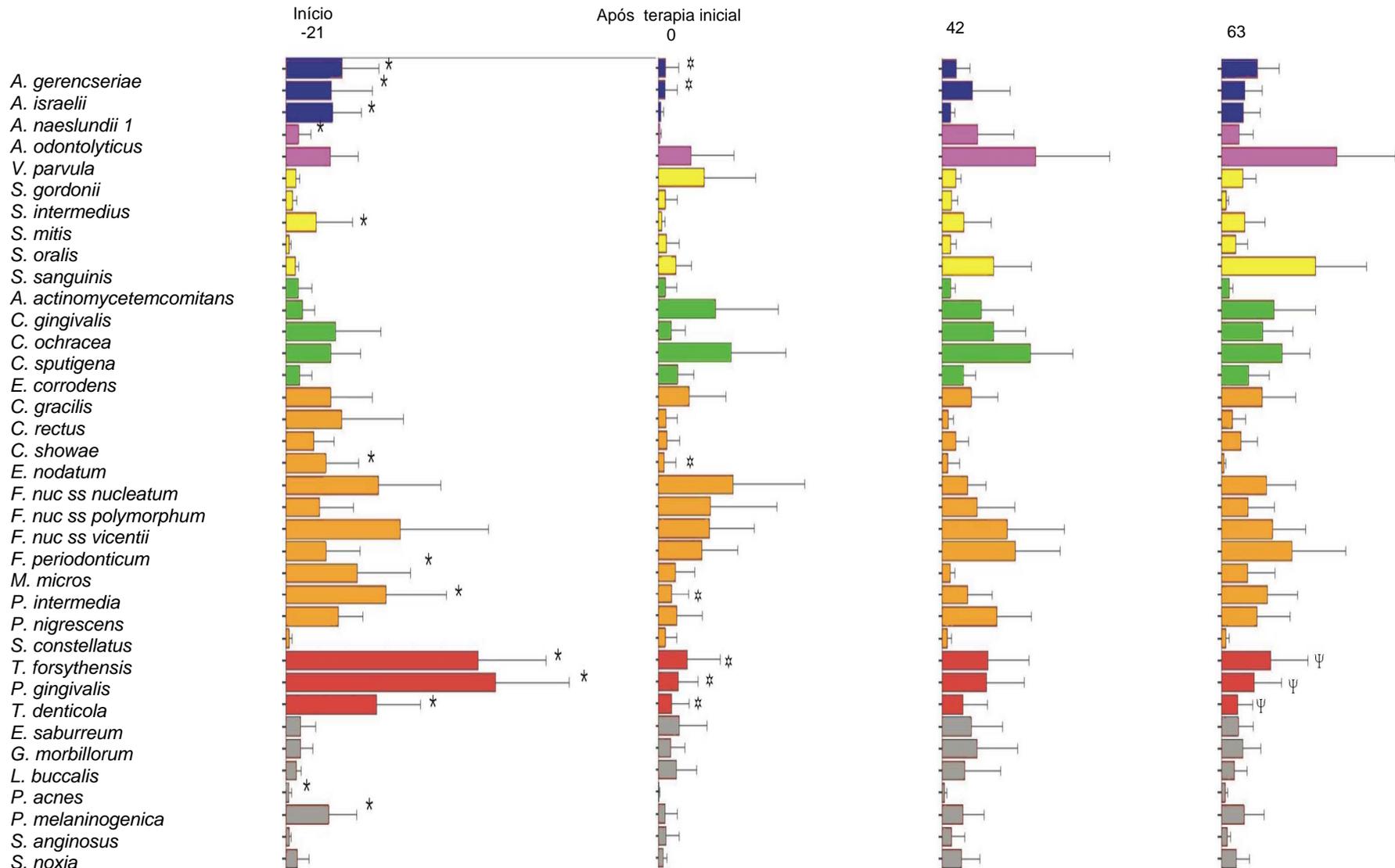


0 2 4 6 8 0 2 4 6 0 2 4 6 0 2 4 6

**Figura 8.** Gráfico de barras das médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgengival no início do estudo (-21), ao final da terapia inicial (0), 42 e 63 dias após, nos indivíduos do grupo T2. Teste Friedman: diferenças ao longo do período experimental, \* $p < 0,05$ . Teste Wilcoxon: diferenças entre dois tempos experimentais; após terapia inicial (0) e início (-21), \*  $p < 0,05$ ; 42 dias e início (-21), #  $p < 0,05$ ; 63 dias e início (-21),  $\psi$   $p < 0,05$ . Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

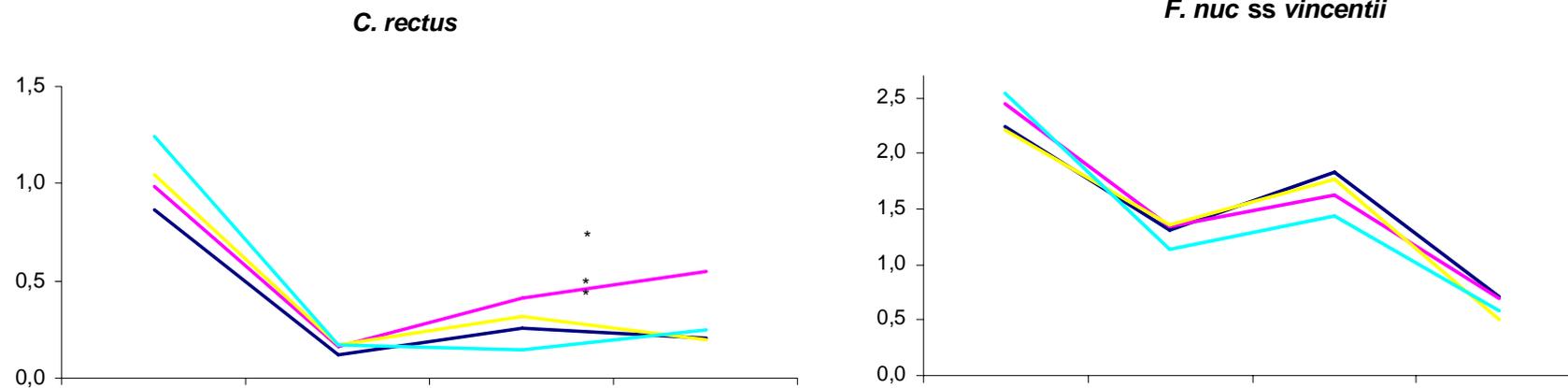
Complexos microbianos: ■ Actinomyces ■ roxo ■ verde ■ amarelo ■ laranja ■ vermelho ■ outros microrganismos

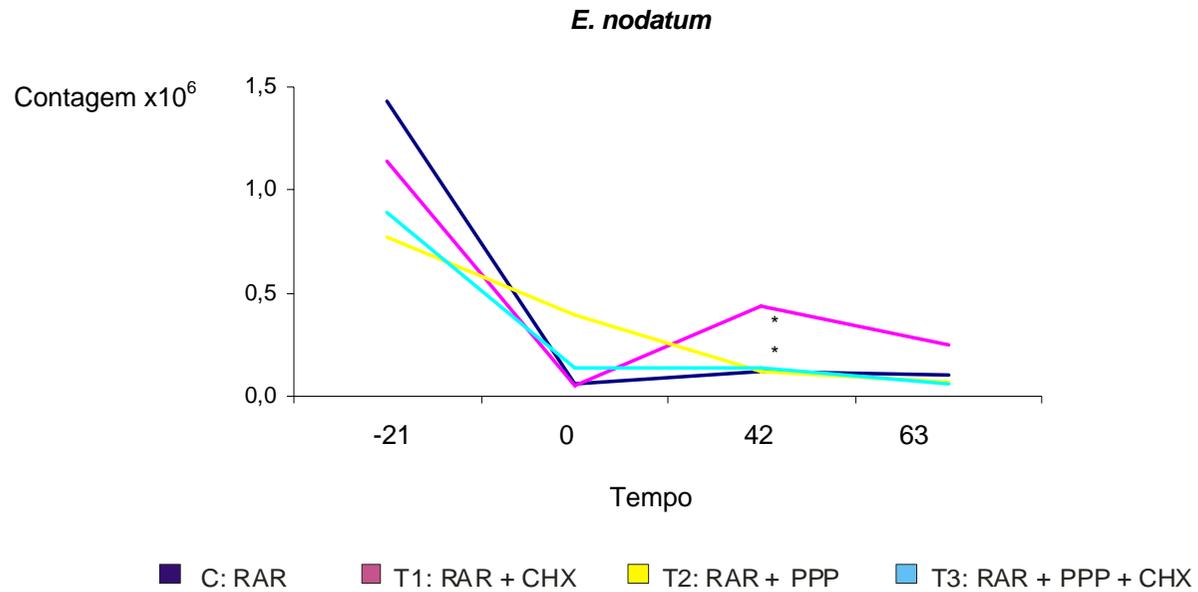
### T3 (RAR + PPP + CLX)



**Figura 9.** Gráfico de barras das médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de placa subgingival no início do estudo (-21), ao final da terapia inicial (0), 42 e 63 dias após, nos indivíduos do grupo T3. Teste Friedman: diferenças ao longo do período experimental, \* $p < 0,05$ . Teste Wilcoxon: diferenças entre dois tempos experimentais; após terapia inicial (0) e início (-21), \*  $p < 0,05$ ; 42 dias e início (-21), #  $p < 0,05$ ; 63 dias e início (-21),  $\nu$   $p < 0,05$ . Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: ■ *Actinomyces*, ■ roxo, ■ verde, ■ amarelo, ■ laranja, ■ vermelho, ■ outros microrganismos.

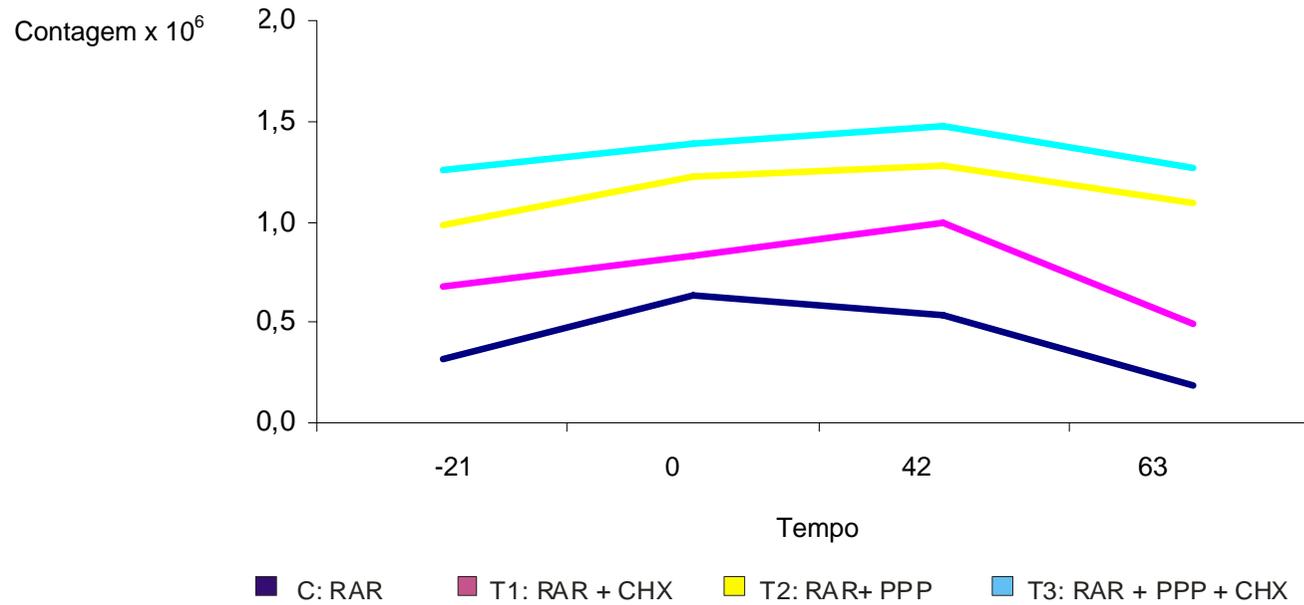




**Figura 10.** Alterações nas médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 3 patógenos do complexo laranja, *C. rectus*, *F.nucleatum* ss *vincentii* e *E. nodatum*, nos grupos terapêuticos, em todos os tempos do estudo.

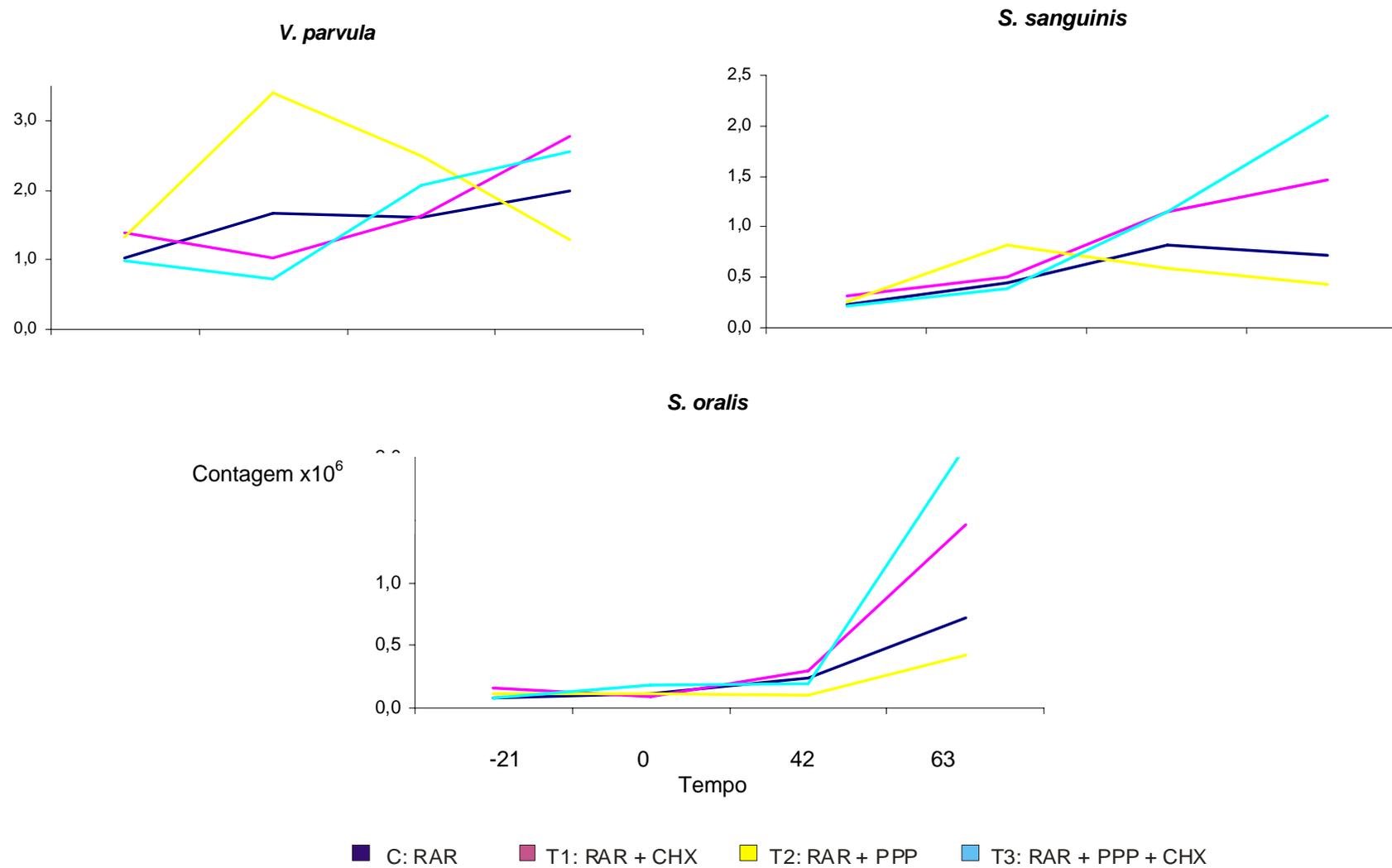
Teste Friedman: diferenças nos níveis de cada espécie ao longo do período experimental (\* $p < 0,05$ ).

### *A. actinomycetemcomitans*



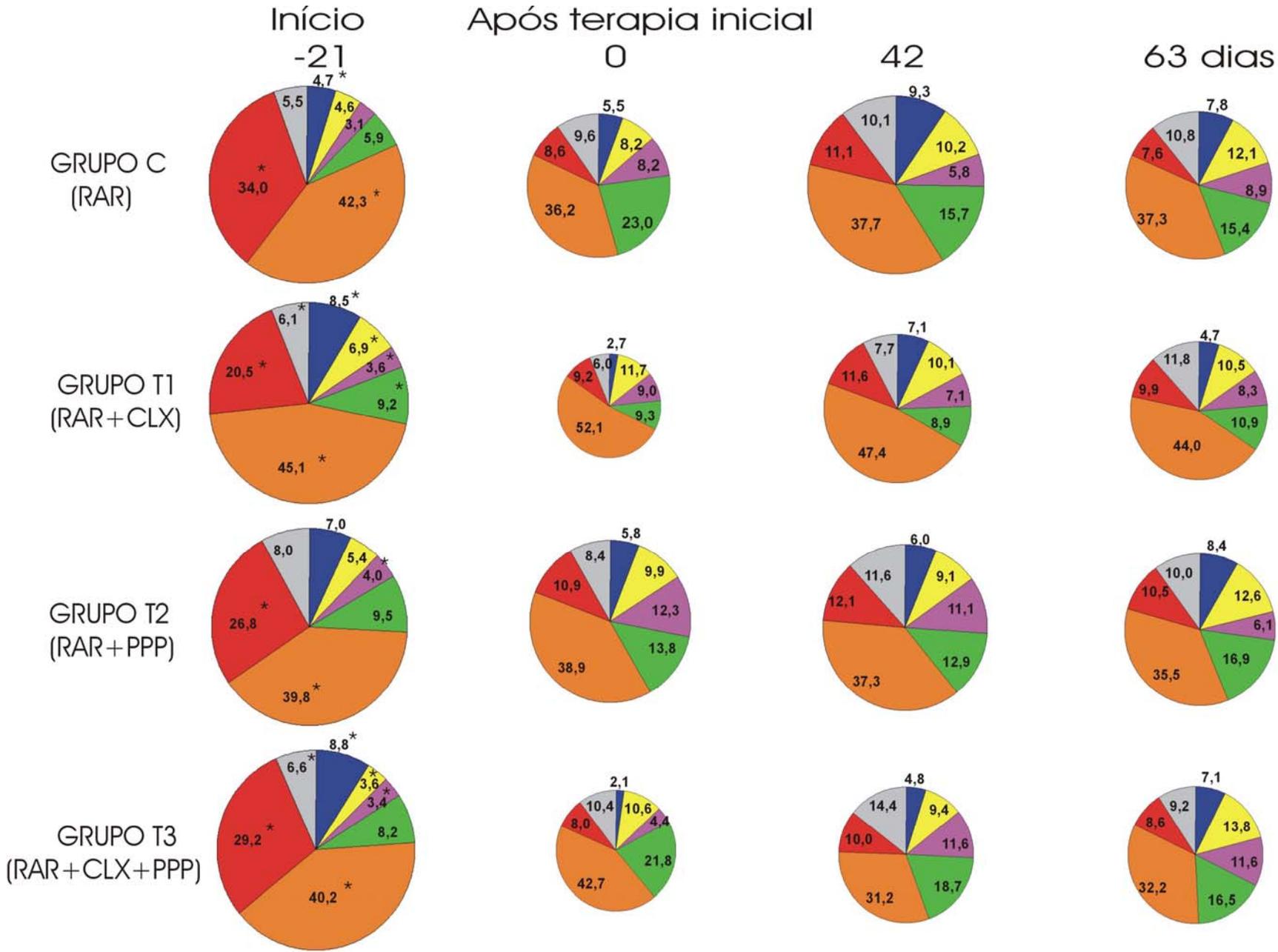
**Figura 11.** Alterações nas médias de contagem ( $x 10^6 \pm dp$ ) da espécie *A. actinomycetemcomitans*, nos grupos terapêuticos, em todos os tempos do estudo.

Teste Friedman: diferenças nos níveis de cada espécie ao longo do período experimental ( $p > 0,05$ ).



**Figura 12.** Alterações nas médias de contagem ( $\times 10^6 \pm dp$ ) de 3 espécies consideradas benéficas, *V. parvula*, *S. sanguinis* e *S. oralis*, nos grupos terapêuticos, em todos os tempos do estudo.

Teste Friedman: diferenças nos níveis de cada espécie ao longo do período experimental ( $p > 0,05$ ).



**Figura 13.** Média das proporções dos complexos microbianos descritos por Socranky *et al.* (1998), presentes nas amostras de placa subgengival dos indivíduos de cada grupo terapêutico, em todos os tempos do estudo. O grupo azul é constituído por 3 espécies de *Actinomyces*. A área dos gráficos foi ajustada para refletir a diferença da contagem total de bactérias entre os tempos 0, 42, 63 e o inicial. Teste Friedman: \* $p < 0,05$ .