



CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA

AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DO USO
SISTÊMICO DE METRONIDAZOL E AMOXICILINA COMO
COADJUVANTES À RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR
EM INDIVÍDUOS FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA

FLÁVIA MATARAZZO

1ª Orientadora: Profª. Drª. Magda Feres

2ª Orientadora: Profª. Drª. Luciene C. de Figueiredo

Guarulhos

2007



FLÁVIA MATARAZZO

AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DO USO
SISTÊMICO DE METRONIDAZOL E AMOXICILINA COMO
COADJUVANTES À RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR
EM INDIVÍDUOS FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA

Dissertação apresentada à Universidade
Guarulhos para obtenção do título de Mestre
em Odontologia, Área de Concentração em
Periodontia.

1ª Orientadora: Profª. Drª. Magda Feres

2ª Orientadora: Profª. Drª. Luciene C. de Figueiredo

Guarulhos

2007

Dedico este trabalho aos meus pais, Armando e Maura, que durante toda a minha vida foram exemplo de força, luta, garra e união. Com um toque de exigência e muita segurança, estão permitindo que todos os meus sonhos e os das minhas irmãs se tornem realidade.

Às minhas irmãs, Fernanda e Bruna, que mesmo sem tempo para conversar estiveram ao meu lado e me procuraram para que a distância não se tornasse cada dia maior.

Ao Guilherme que de forma compreensiva respeitou todos os meus limites, desejos e o meu cansaço. É o meu suporte, sempre levantando o meu espírito com carinho e provas de amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que se mostrou presente nas mínimas coisas, guiando-me pelos caminhos certos, protegendo-me de todos os perigos e fortalecendo-me na sua paz.

À Profª Drª Magda Feres pela confiança depositada deste o início. Pela oportunidade contínua de me desenvolver, e aprimorar na Periodontia. Pela paciência nos momentos em que eu estava cansada e causava preocupações e confusões. Seu entusiasmo é uma característica marcante quando reconhece o interesse no aluno e assim dá apoio e incentivo imensuráveis.

À Profª Drª Luciene C. de Figueiredo pelo tempo e paciência em esclarecer as minhas dúvidas e permitir que a pesquisa fosse conduzida de maneira correta. Muitas foram as reuniões e telefonemas nos quais, com experiência, resolvia os problemas com muita facilidade enquanto para mim pareciam difíceis.

Ao Me. Marcelo de Faveri que sem medir esforços abriu muitas portas para mim tornando muitos caminhos tortuosos mais fáceis de serem atravessados. Esta é uma característica dos grandes mestres e você é um deles. Além disso, é o responsável pela estatística do estudo.

À Profª Drª Poliana Mendes Duarte que cuidou de mim como irmã e a quem tenho um carinho e admiração especiais. Sua capacidade acolhedora permite que as pessoas se sintam bem ao seu lado e a sua dedicação à profissão é exemplo a ser seguido.

Aos Prof^{es} Me. Roberto Hayacibara e Drª Mitsue Hayacibara que acreditaram no meu potencial e me estimularam a fazer o mestrado. Vocês foram os primeiros a notarem esta habilidade em mim e trabalharam muito para que eu fosse cada dia melhor. Sinto uma satisfação imensa de poder tê-los como amigos.

Ao Me. Sérgio Eduardo Braga da Cruz que participou ativamente da pesquisa. Passava mais de 14 horas do dia ao meu lado e em nenhuma situação me abandonou. Este estudo também é seu.

À amiga e Me. Juliana Ântico Lucchesi que não me canso de conversar e sempre vem me ensinar algo novo e bom. Sua companhia e amizade me ajudaram a superar muitas dificuldades desta batalha. Você é um exemplo de mulher e me admiro quando vejo todo o seu conhecimento sobre Nosso Senhor Jesus.

Aos professores do Mestrado Acadêmico em Odontologia, Prof^a Dr^a Sheila C. Cortelli, Prof^a Dr^a Cláudia Ota Tsuzuki, Prof^a Dr^a Cristiane M. Amaral, Prof^a Dr^a Alessandra Cassoni Ferreira, Prof. Dr. Saulo Geraldeli, Prof. Dr. Jamil Shibli, Prof. Dr. José Augusto Rodrigues e Prof. Dr. André Figueiredo Reis pelos exemplos de simplicidade, humildade e respeito com os alunos.

Ao amigo e aluno de iniciação científica Fabiano Lee. Com todo este desprendimento e dedicação você alcançará seus desejos mais profundos e superará todas as barreiras da vida.

À Tânia e à Priscila que se dispuseram a me ajudar anotando os exames clínicos.

À bióloga Izilvânia Barreto pelo trabalho e dedicação em processar os dados no laboratório e positivismo me ajudando a acreditar que tudo ocorreria no tempo certo.

Aos funcionários da Universidade Guarulhos e principalmente do mestrado, Cínthia, Adriana e Cristina que torceram por mim e fizeram o possível para me ajudarem a vencer mais esta batalha.

Aos pacientes minha eterna gratidão. Foi uma ajuda mútua!

O limite de alcançar está na mesma proporção do seu acreditar.”

Nuno Cobra

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar os efeitos clínicos e microbiológicos da raspagem e alisamento radicular (RAR) associada ou não ao metronidazol ou ao metronidazol e amoxicilina no tratamento de indivíduos fumantes com periodontite crônica 90 dias pós-terapia. Quarenta e dois indivíduos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos, controle (C, $n=15$) que recebeu RAR e placebo, teste 1 (T_1 , $n=13$) que recebeu RAR e metronidazol sistêmico (400 mg) 3 x dia por 14 dias, e teste 2 (T_2 , $n=14$) que recebeu RAR, metronidazol (400 mg) e amoxicilina (500 mg) sistêmicos 3 x dia por 14 dias. Os parâmetros clínicos avaliados em 6 sítios por dente no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia foram: profundidade de sondagem (PS, mm), nível clínico de inserção (NCI, mm), placa visível (0,1), sangramento gengival (0,1), sangramento à sondagem (0,1) e supuração (0,1). Nove amostras de biofilme subgengival foram coletadas por indivíduo, 3 amostras em cada uma das seguintes categorias de profundidade de sondagem iniciais: rasas ($PS \leq 3$ mm), moderadas (PS 4-6 mm), e profundas ($PS \geq 7$ mm). As amostras foram avaliadas para a presença e níveis de 40 espécies bacterianas subgengivais pela técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization*. Os fumantes que receberam uma das terapias antibióticas tiveram as maiores reduções na PS e NCI em todas as categorias de bolsa, principalmente o grupo T_2 . Todas as terapias utilizadas levaram a uma redução nas médias de contagem, proporção e prevalência dos patógenos do complexo vermelho, porém, apenas o grupo T_2 teve redução significativa dessas 3 espécies. Todos os grupos terapêuticos reduziram algumas espécies do complexo laranja nas diferentes categorias de bolsa, mas *Eubacterium nodatum* foi significativamente reduzido apenas no grupo T_2 . As médias de proporções das espécies consideradas benéficas aumentaram principalmente nas bolsas inicialmente profundas, nos grupos T_1 e T_2 . As proporções do complexo vermelho passaram de 33,28%, 25,51% e 32% para 8,67%, 4,41% e 2,01% nos grupos C, T_1 e T_2 , respectivamente. Já as proporções do complexo laranja não foram efetivamente afetadas por nenhuma das terapias. A associação do metronidazol ou da combinação de metronidazol e amoxicilina à RAR leva a benefícios clínicos e microbiológicos na terapia de indivíduos fumantes com periodontite crônica aos 90 dias pós-terapia.

Palavras-Chaves: fumantes, periodontite crônica, metronidazol, amoxicilina.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate and compare the clinical and microbiological effects of scaling and root planing (SRP) alone or in combination with systemic metronidazole or metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis 90 days post-therapy. Forty-two subjects were randomly assigned to 3 groups, control (C, $n=15$) that received SRP and placebo, test 1 (T_1 , $n=13$) that received SRP and systemic metronidazole (400 mg) 3 x a day for 14 days, and test 2 (T_2 , $n=14$) that received SRP, systemic metronidazole (400mg) and amoxicillin (500 mg) 3 x a day for 14 days. The clinical parameters evaluated at 6 sites per tooth at baseline and at 90 days post-therapy were: probing depth (PD, mm), clinical attachment level (CAL, mm), visible plaque (0,1), gingival bleeding (0,1), bleeding on probing and suppuration (0,1). Nine biofilm samples were collected per subject, 3 samples in each of the following initial PD categories: shallow (PS \leq 3mm), moderate (PS 4-6 mm), and deep (PS \geq 7mm). The samples were evaluated for the presence and levels of 40 bacterial subgingival species using checkerboard DNA-DNA hybridization. The smokers who received the antibiotic therapies showed the greatest reductions in PD and CAL for all PD categories, mainly group T_2 . All therapies employed led to a reduction in the mean counts, proportions and prevalence of red complex species, but only group T_2 showed a significant reduction of these 3 species. All therapies reduced some orange complex species in the different PD categories, but *Eubacterium nodatum* was significantly reduced only in group T_2 . The mean proportions of the beneficial species increased mainly in the initially deep pockets, in groups T_1 and T_2 . The proportions of the red complex species changed from 33.28%, 25.51% and 32% at baseline to 8.67%, 4.41% and 2.01% at 90 days post-therapy in groups C, T_1 and T_2 , respectively. The proportions of the orange complex were not effectively affected by any therapy. The association of metronidazole or metronidazole and amoxicillin to SRP led to a clinical and microbiological benefit in the treatment of smokers with chronic periodontitis at 90 days post-therapy.

Key-words: smoking, chronic periodontitis, metronidazole, amoxicillin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão grupadas por complexos bacterianos (Socransky <i>et al.</i> , 1998; Socransky & Haffajee 2002).....	32
Tabela 2. Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgingival.....	39
Tabela 3. Média (\pm DP) dos parâmetros clínicos no exame inicial dos indivíduos nos três grupos terapêuticos.....	41

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1.** Delineamento experimental.....28
- Figura 2.** Representação gráfica do *Minislot* 30 (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de *nylon* (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).....35
- Figura 3.** Representação gráfica do *Miniblotter* 45 (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).....36
- Figura 4.** Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).....38
- Figura 5.** Média dos parâmetros clínicos da boca toda avaliados no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).....48
- Figura 6.** Alterações nas médias de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI) e no percentual de sítios exibindo placa visível, de boca toda, entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis (** $p < 0,01$). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos (Teste *U* de Mann-Whitney, $p < 0,05$).....49
- Figura 7.** Alterações das médias individuais de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI) no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina.....50

Figura 8. Média dos parâmetros clínicos avaliados em sítios inicialmente rasos no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (** $p < 0,001$).....51

Figura 9. Média dos parâmetros clínicos avaliados em sítios inicialmente moderados no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).....52

Figura 10. Média dos parâmetros clínicos avaliados em sítios inicialmente profundos no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).....53

Figura 11. Alterações nas médias de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), em sítios inicialmente rasos entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis (** $p < 0,01$). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos (Teste *U* de Mann-Whitney, $p < 0,05$).....54

Figura 12. Alterações nas médias de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), em sítios inicialmente moderados entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis (** $p < 0,01$). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos (Teste *U* de Mann-Whitney, $p < 0,05$).....55

Figura 13. Alterações nas médias de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), em sítios inicialmente profundos entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis (** $p < 0,01$). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos (Teste *U* de Mann-Whitney, $p < 0,05$).....56

Figura 14. Perfil microbiano das médias de contagem ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon ($*p < 0,05$). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.....57

Figura 15. Perfil microbiano das médias de proporção (%) de sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon ($*p < 0,05$). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.....58

Figura 16. Perfil microbiano das médias de proporção (%) de sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival de sítios com profundidade de sondagem inicial ≤ 4 mm, no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon ($*p < 0,05$). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.....59

Figura 17. Perfil microbiano das médias de proporção (%) de sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival de sítios com profundidade de sondagem inicial ≥ 5 mm, no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos

três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (* $p < 0,05$). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.....60

Figura 18. Perfil microbiano das médias de prevalência (%) de sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de de boca toda, no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (* $p < 0,05$). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.....61

Figura 19. Proporções dos complexos microbianos no início do estudo e 90 dias pós-terapia nas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos dos três grupos terapêuticos. As áreas dos gráficos foram ajustadas para refletir a quantidade total de microrganismos em cada grupo terapêutico, nos dois tempos experimentais. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).....62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Etiologia da doença periodontal.....	17
1.2. O fumo como fator de risco para as doenças periodontais.....	19
1.2.1. <i>Aspectos clínico-periodontais e microbiológicos dos fumantes.....</i>	<i>21</i>
1.2.2. <i>Resposta à terapia periodontal em fumantes.....</i>	<i>22</i>
1.3. Antibióticos no tratamento da doença periodontal.....	23
2. PROPOSIÇÃO.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Seleção de indivíduos.....	27
3.2. Critérios de inclusão e exclusão.....	27
3.3. Delineamento experimental.....	27
3.4. Avaliação clínico-periodontal.....	29
3.5. Procedimentos terapêuticos.....	30
3.5.1. <i>Terapia periodontal básica.....</i>	<i>30</i>
3.5.2. <i>Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos e placebo.....</i>	<i>30</i>
3.6. Avaliação microbiológica.....	31
3.6.1. <i>Seleção dos sítios-teste.....</i>	<i>31</i>
3.6.2. <i>Coleta das amostras de biofilme subgengival.....</i>	<i>31</i>
3.6.3. <i>Cepas bacterianas e condições de crescimento.....</i>	<i>33</i>
3.6.4. <i>Isolamento do DNA e preparo das sondas.....</i>	<i>33</i>
3.6.5. <i>Checkerboard DNA-DNA hibridization.....</i>	<i>34</i>
3.6.6. <i>Detecção das espécies.....</i>	<i>36</i>
3.7. Análise estatística.....	39
3.7.1. <i>Avaliação clínico-periodontal.....</i>	<i>39</i>
3.7.2. <i>Avaliação microbiológica.....</i>	<i>40</i>
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Achados clínico-periodontais.....	41
4.2. Achados microbiológicos.....	44
5. DISCUSSÃO.....	63

5.1. Achados clínico-periodontais.....	64
5.2. Achados microbiológicos.....	66
6. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal crônica é uma doença infecciosa que acomete as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, levando a perda de inserção, de tecido ósseo, e eventualmente do elemento dentário (AAP, 1999). A maior característica desta doença é ser causada por microrganismos específicos que colonizam os tecidos moles e duros da cavidade bucal e formam os biofilmes orais (Socransky & Haffajee, 1994; Socransky *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2005). No entanto, o indivíduo pode ser continuamente colonizado por patógenos periodontais e não demonstrar nenhuma evidência de desenvolvimento da doença (Socransky & Haffajee, 2003). Isso ocorre porque o início e progressão desta infecção são dependentes não somente do biofilme dental, que abriga os patógenos periodontais, mas também dos mecanismos de defesa do hospedeiro, que desempenham um importante papel na sua patogênese (AAP, 1999). Desta forma, fatores que alteram a prevalência ou níveis bacterianos e aqueles que modulam a habilidade do organismo em combater esses patógenos predisõem o indivíduo ao desenvolvimento da periodontite e são denominados fatores de risco para a doença periodontal.

O fumo é considerado um importante fator de risco para a doença periodontal (Bergström & Preber, 1994; Kahldahl *et al.*, 1996; Grossi *et al.*, 1996; Tomar & Ashma, 2000; Rivera-Hidalgo, 2003; Kim *et al.*, 2004; Meisel *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2005), assim como para várias doenças sistêmicas, como o câncer e as cardiopatias (Jonhson & Hill, 2004; Nakamura *et al.*, 2005). Além disso, pacientes periodontais que fazem uso de tabaco não respondem adequadamente às terapias mais comumente utilizadas, como a raspagem e alisamento radicular (Preber & Bergström, 1985; MacFarlane *et al.*, 1992; Haber *et al.*, 1993; Bergström & Preber, 1994; Kaldahl *et al.*, 1996; Grossi *et al.*, 1996; Haffajee *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999; Winkel *et al.*, 2001; Van der Velden *et al.*, 2003; Mascarenhas *et al.*, 2005). Sendo assim, terapias adicionais, como o uso de antibióticos sistêmicos em combinação ao tratamento mecânico, estão sendo indicadas como método auxiliar no tratamento periodontal de indivíduos fumantes (Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999; Winkel *et al.*, 2001; Mascarenhas *et al.*, 2005).

1.1. Etiologia da doença periodontal

Certos microrganismos presentes nos biofilmes orais têm sido relacionados com o início e progressão da periodontite (para revisão, ver Socransky & Haffajee, 2005). Porém, a simples presença dessas bactérias na cavidade bucal não determina que o indivíduo desenvolverá a doença. O equilíbrio ecológico entre a microbiota bucal e o hospedeiro na maioria das vezes é benigna e não oferece riscos para as estruturas de suporte dos dentes. Ocasionalmente, um grupo de bactérias pode proliferar ou exibir novas propriedades que levem a destruição do periodonto. Sendo assim, pode-se considerar que a doença periodontal se desenvolve a partir de um desequilíbrio na interação entre hospedeiro e microrganismos patogênicos que possuam o potencial de colonizar os biofilmes da cavidade bucal (Socransky & Haffajee, 2005). O percentual (%) de sítios colonizados por esses patógenos, os níveis dessas bactérias nos sítios colonizados, e a capacidade do organismo em combater os microrganismos agressores são condições fundamentais para o aparecimento de sinais clínicos de perda de inserção periodontal.

A comprovação da natureza infecciosa da periodontite foi definida com os estudos epidemiológicos, clínicos e microbiológicos na década de 60 (Lovdal *et al.*, 1958; Schei *et al.* 1959; Løe *et al.*, 1965; Theilade *et al.* 1966; Russel 1967; Løe *et al.* 1967). O estudo clássico de Løe *et al.* (1965) de gengivite experimental promoveu a primeira evidência que o acúmulo de biofilme dental em superfícies limpas dos dentes leva ao desenvolvimento de um processo inflamatório envolvendo o tecido gengival. Seguiu-se um longo período de discussões científicas que questionavam se a destruição dos tecidos de suporte dos dentes era causada pela quantidade ou pela qualidade das bactérias que colonizavam o sulco gengival, teorias que ficaram conhecidas como “hipótese da placa não-específica” e “hipótese da placa específica”, respectivamente (Newman *et al.*, 1976; Slots 1976; Newman & Socransky 1977; Listgarten & Hellden 1978; Armitage *et al.* 1982).

O desenvolvimento, na década de 90, de técnicas imunológicas e de biologia molecular para a detecção dos microrganismos que compõem os biofilmes orais foi importante para uma descrição mais precisa das espécies bacterianas subgengivais relacionadas a diferentes formas de periodontite (Christersson *et al.*, 1987; Ávila-

Campos *et al.*, 1999; Socransky *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 2006). A grande vantagem dessas técnicas é a possibilidade de detecção de microrganismos fastidiosos como a *Tannerella forsythia* e as espiroquetas, espécies difíceis de serem detectadas pelos métodos tradicionais de diagnóstico, como a cultura bacteriana.

Socransky *et al.* (1994) descreveram a técnica de diagnóstico microbiológico do *checkerboard DNA-DNA hybridization* que utiliza sondas de DNA para o diagnóstico microbiológico, e analisaram as associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgengival de indivíduos com periodontite crônica (Socransky *et al.*, 1998). Os autores observaram a presença de 5 complexos bacterianos principais neste ambiente subgengival, de acordo com a relação entre as diferentes espécies. Um dos complexos, composto pelas espécies *T. forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, chamado de complexo vermelho, foi fortemente relacionado com profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem (SS). Outro complexo, o laranja, que parece preceder a colonização do complexo vermelho foi dividido em 2 grupos, um central, composto por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Peptostreptococcus micros*; e outro grupo periférico, formado por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Streptococcus constellatus*. Os outros 3 complexos, o amarelo, o verde e o roxo, demonstraram grande associação entre si e menor associação com os 2 primeiros, e são compostos por diversas espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro. O complexo verde é formado por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a; o complexo amarelo é composto por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*; e o complexo roxo inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As espécies de *Selenomonas noxia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo b não se correlacionaram com outras espécies. Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* sorotipos 1 e 2) foram agrupadas no complexo azul (Socransky & Haffajee, 2002).

1.2. O fumo como fator de risco para as doenças periodontais

O termo fator de risco é empregado para determinar uma característica comportamental do indivíduo, um evento ou estilo de vida, uma exposição ambiental ou uma condição genética ou inata que leva a um aumento na probabilidade de ocorrência de uma determinada enfermidade (Genco 1996; Page & Beck 1997). A identificação dos fatores de risco deve ser baseada na análise da relação temporal entre a presença dos fatores predisponentes e a ocorrência da doença, e isso irá permitir a avaliação das chances do evento ocorrer (Albandar, 2002). Nas doenças periodontais, assim como em todas as enfermidades de ordem infecciosa, podem-se subdividir os fatores de risco em 2 grupos principais: 1- Fatores que favorecem a colonização dos patógenos periodontais; e 2- Fatores que modulam a habilidade do organismo em combater esses patógenos (Genco, 1996).

Dentre os fatores que alteram a resposta do hospedeiro, o fumo é apontado como o principal fator de risco para as doenças periodontais (Bergström & Preber, 1994; Kaldahl *et al.*, 1996; Grossi *et al.*, 1996; Tomar & Ashma, 2000; Rivera-Hidalgo, 2003; Kim *et al.*, 2004; Meisel *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2005). Estudos longitudinais e seccionais mostraram que pacientes fumantes apresentam um risco relativo que varia de 2,0 a 6,0 para o desenvolvimento da doença periodontal em relação aos não-fumantes (Bergström, 1989; Tomar & Ashma, 2000; Kim *et al.*, 2004).

Tomar e Ashma (2000) examinaram dados do *Third National Health and Nutrition Examination Survey (III NHANES)* para estudar os efeitos do fumo na prevalência da periodontite e encontraram, após ajuste de idade, gênero, etnia, grau de escolaridade e renda, que o cigarro está associado a um alto risco de doença periodontal em fumantes (OR= 4) e ex-fumantes (OR=1,7). O risco de desenvolver periodontite aumentou de acordo com o número de cigarros consumidos. Foi observado um risco que variou de 2,79 para aqueles que fumavam até 9 cigarros/dia, até 5,88 para aqueles que consumiam mais de 31 cigarros/dia.

Grande parte dos efeitos prejudiciais dos produtos do fumo resulta da exposição sistêmica da droga, por meio da absorção pulmonar, mas pode ocorrer também pela absorção tópica na cavidade bucal (Palmer *et al.*, 2000). Mavropoulos *et al.* (2001) relataram um aumento no fluxo sanguíneo da gengiva após a aplicação

tópica de fumaça de tabaco no sulco vestibular. A pressão sanguínea e os batimentos cardíacos aumentaram e o fluxo sanguíneo do dedo polegar diminuiu, confirmando os efeitos da nicotina absorvida topicamente.

Apesar da nicotina ser o principal componente psicoativo do fumo, existem diversas outras substâncias presentes no cigarro que têm efeito nocivo direto ao organismo e às suas células. O monóxido de carbono é um destes produtos, e afeta a saturação de oxigênio da hemoglobina (Palmer *et al.*, 2005). Hanioka *et al.* (2000), examinando a tensão de oxigênio nas bolsas periodontais de indivíduos fumantes e não-fumantes encontraram uma tensão de oxigênio menor nas bolsas dos fumantes. Palmer *et al.* (2005) salientam que essa propriedade pode ter um impacto na microbiota subgingival.

Os principais mecanismos pelos quais o fumo parece afetar os tecidos periodontais são pela alteração: do ecossistema bucal (ver item 1.2.1. *Aspectos clínico periodontais e microbiológicos dos fumantes*), do calibre dos vasos sanguíneos (Mirbod *et al.*, 2001), da resposta inflamatória (Rezavandi *et al.*, 2002), da resposta imune (Sopori & Kozak, 1998) e da homeostase e do potencial cicatricial dos tecidos periodontais (Checci *et al.*, 1999; Typton & Dabbous, 1995).

Não existem fortes evidências de que o fumo causa vasoconstrição direta nos tecidos gengivais (Palmer *et al.*, 2005). Porém, Mirbod *et al.* (2001) procurando determinar o efeito em longo prazo do fumo na circunferência e na densidade dos vasos sanguíneos gengivais encontraram uma maior quantidade de vasos de pequeno calibre e uma menor quantidade de vasos de grande calibre nos fumantes. Entretanto, a densidade vascular foi semelhante a dos não-fumantes.

Rezavandi *et al.* (2002) avaliaram o efeito do fumo nos níveis de expressão das moléculas de adesão E-selectina e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) pelo endotélio dos vasos gengivais com e sem inflamação. O referido estudo demonstrou que a resposta inflamatória local em fumantes parece não ser acompanhada pelo aumento da vascularização, o que pode explicar o sangramento gengival reduzido e a pequena migração leucocitária nestes indivíduos comparados aos não-fumantes.

A exposição crônica ao cigarro ou à nicotina parece também prejudicar a

resposta do sistema imune. Sopori & Kazor (1998) sugerem que apesar dos efeitos do fumo na resposta imune serem pouco claros, as propriedades imunossupressivas ou antiinflamatórias dos seus componentes podem funcionar de 2 formas. A primeira seria o efeito direto do fumo sobre os linfócitos, alterando o equilíbrio da proporção Th1/Th2 ou tornando-os funcionalmente inertes; e a segunda seria o efeito indireto no sistema neuroendócrino, pela estimulação da secreção de catecolaminas e do hormônio ACTH, que estão associados à depressão imunológica.

Typton & Dabbous (1995) demonstraram uma diminuição significativa na proliferação de fibroblastos gengivais em altas concentrações de nicotina, de 10 a 75 µG/mL. Foi observada uma redução na produção do colágeno tipo I e fibronectina e um aumento na atividade de colagenase no meio de cultura. Achados semelhantes foram relatados por Checci *et al.* (1999) quando compararam os efeitos da nicotina sobre as células de fumantes e não-fumantes. No entanto, os autores observaram que os fibroblastos gengivais de indivíduos fumantes são mais eficientes na adesão e replicação quando comparados aos fibroblastos de não-fumantes, e sugeriram que os fibroblastos de fumantes pareciam apresentar resistência à nicotina, provavelmente na tentativa de se adaptar ao meio desfavorável ao qual estavam sujeitos.

1.2.1. Aspectos clínico-periodontais e microbiológicos dos fumantes

Apesar de estar bem definido que indivíduos fumantes possuem um maior risco de desenvolver doença periodontal do que os não-fumantes (Bergström & Preber, 1994; Kaldahl *et al.*, 1996; Grossi *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2004; Meisel *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2005), ainda não está bem estabelecido se existem diferenças substanciais na gravidade da doença ou na composição da microbiota desses 2 grupos de indivíduos.

Muitos estudos envolvendo fumantes mostraram nestes indivíduos maiores médias de PS e nível clínico de inserção (NCI) do que em não-fumantes (Stoltenberg *et al.*, 1993; Haffajee & Socransky, 2001a; Shimazaki *et al.*, 2006). Por outro lado, outros estudos não observaram essas diferenças (Apatzidou *et al.*, 2005; Cruz, 2006). Haffajee & Socransky (2001a), quando compararam o perfil clínico de pacientes com diferentes hábitos de fumar, a média de PS, NCI e o número de dentes

perdidos foram maiores nos fumantes. No entanto, os autores não encontraram diferenças significantes entre os grupos para os parâmetros de placa visível, sangramento gengival (SG) e supuração (SUP). Já o parâmetro de SS estava reduzido nos fumantes em comparação aos não-fumantes. Esta característica dos indivíduos fumantes de apresentar índices de sangramento reduzidos está de acordo com os achados de diversos autores (Lie *et al.*, 1998; Boström *et al.*, 2001; Haffajee & Socransky, 2001a; Calsina *et al.*, 2002; Dietrich *et al.*, 2004; Shimazaki *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos realizados com indivíduos fumantes com periodontite crônica, na década de 80, observaram maiores índices de placa nesses indivíduos quando comparado a não-fumantes (Ah *et al.*, 1994; Preber & Bergström, 1985). No entanto, outros estudos indicaram que o acúmulo de biofilme entre indivíduos com diferentes hábitos de fumar não difere significativamente (Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999; Haffajee & Socransky, 2001a; Winkel *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006).

Em relação à composição do biofilme subgengival, diversos estudos não encontraram diferenças substanciais entre os indivíduos fumantes e não-fumantes (Stoltemberg *et al.*, 1993; Boström *et al.*, 2001; Apatzidou *et al.*, 2005; Cruz, 2006; Gomes *et al.*, 2006); enquanto outros autores sugerem uma tendência dos fumantes em apresentar um maior número de patógenos periodontais do que os não-fumantes (Zambon *et al.*, 1996; Umeda *et al.*, 1998; Haffajee & Socransky, 2001b).

1.2.2. Resposta à terapia periodontal em fumantes

Os fumantes apresentam uma resposta menos favorável do que os não-fumantes ao tratamento periodontal mecânico (Preber & Bergström, 1985; MacFarlane *et al.*, 1992; Harber *et al.*, 1993; Bergström & Preber, 1994; Kaldahl *et al.*, 1996; Grossi *et al.*, 1996; Haffajee *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999; Winkel *et al.*, 2001; Van der Velden *et al.*, 2003; Mascarenhas *et al.*, 2005). Inúmeros estudos demonstram que o fumo compromete a melhora da PS e/ou NCI (Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999; Winkel *et al.*, 2001; Haffajee & Socransky, 2001a; Papantonopoulos, 2004). Além disso, estudos microbiológicos sugerem que os patógenos subgengivais são mais difíceis de serem eliminados em fumantes (Söder *et al.*, 1999; Van der Velden

et al., 2003). Van der Velden *et al.* (2003) avaliaram a influência do fumo no tratamento da periodontite e na composição da microbiota subgingival utilizando RAR e, se necessário, cirurgia e/ou antibióticos sistêmicos. Os autores demonstraram que os não-fumantes exibiram um maior ganho de inserção e uma redução mais acentuada na prevalência das bactérias patogênicas do que os fumantes.

Essa resposta diminuída ao tratamento periodontal tem levado a um maior interesse de clínicos e pesquisadores em estabelecer terapias adicionais, assim como o uso de antibióticos sistêmicos, para estes indivíduos.

1.3. Antibióticos no tratamento da doença periodontal

Diversos antibióticos sistêmicos, incluindo a tetraciclina (Feres *et al.*, 1999; Haffajee *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 2004), a azitromicina (Sefton *et al.*, 1996; Blandizzi *et al.*, 1999; Mascarenhas *et al.*, 2005), a amoxicilina (Feres *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002), o metronidazol (Gusberti *et al.*, 1988; Loesche *et al.*, 1992; Winkel *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999; Feres *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2005) ou a combinação de amoxicilina e metronidazol (Berglundh *et al.*, 1998; Winkel *et al.*, 1998; Serino *et al.*, 2001; Winkel *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002) têm sido utilizados com eficácia como adjuntos à terapia mecânica, no tratamento da periodontite crônica.

O metronidazol parece ser uma droga particularmente atrativa para o tratamento da periodontite crônica devido a sua efetividade seletiva para microrganismos anaeróbios estritos. Quase a totalidade dos estudos que utilizaram este agente em associação à RAR mostraram resultados clínicos e microbiológicos superiores aos observados com a terapia mecânica somente (Loesche *et al.*, 1992; Winkel *et al.* 1997; Söder *et al.*, 1999; Feres *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2004; Carvalho *et al.* 2005). Feres *et al.* (2001) compararam o efeito do uso sistêmico do metronidazol ou da amoxicilina na microbiota subgingival e nos parâmetros clínicos de pacientes com periodontite crônica. O metronidazol apresentou os melhores resultados clínicos e microbiológicos. Sua ação principal foi na redução de patógenos dos complexos vermelho e laranja. As espécies consideradas benéficas, como as do gênero *Actinomyces*, *Streptococcus* e *Capnocytophaga*, foram minimamente afetadas por este

agente. Clinicamente, a média de PS de boca toda foi significativamente reduzida e houve um considerável ganho de inserção e uma redução na porcentagem de sítios com SS. A amoxicilina associada à RAR também reduziu os níveis das 3 espécies do complexo vermelho. No entanto, aos 360 dias pós-terapia foi observada uma recolonização, especialmente pelas espécies *T. forsythia* e *T. denticola*. A amoxicilina levou a uma marcante redução nas espécies de *Actinomyces* 12 meses após a terapia, acompanhada de um aumento nas proporções de *Streptococcus* (Feres *et al.*, 2001).

Estudos recentes relatam um efeito benéfico da associação da amoxicilina e do metronidazol à RAR na composição da microbiota subgingival em indivíduos com doença periodontal crônica (Berglundh *et al.*, 1998; Winkel *et al.*, 1998; Winkel *et al.*, 2001; Serino *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002). Berglundh *et al.* (1998) observaram que a RAR em combinação com o uso sistêmico de metronidazol e amoxicilina melhorou significativamente os parâmetros clínicos periodontais em relação ao efeito observado no grupo que recebeu somente RAR. Espécies como *A. actinomycetecomitans* e *P. gingivalis* foram reduzidas ou eliminadas após a terapia mecânica e antibiótica combinada.

Todos esses dados sugerem benefícios clínicos e microbiológicos adicionais quando indivíduos com periodontite crônica são tratados com antibióticos sistêmicos, principalmente metronidazol e/ou amoxicilina. Porém, poucos estudos avaliaram sistematicamente os efeitos clínicos e, principalmente, na composição da microbiota subgingival dessas terapias em fumantes (Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999; Winkel *et al.*, 2001; Mascarenhas *et al.*, 2005). Alguns desses estudos não observaram benefícios adicionais na terapia periodontal em indivíduos fumantes que tenham recebido antibióticos sistêmicos em comparação com aqueles que receberam apenas RAR (Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999). Porém, alguns estudos recentes sugerem que os antibióticos sistêmicos melhoram a resposta clínica e microbiológica desses indivíduos ao tratamento periodontal (Winkel *et al.*, 2001; Mascarenhas *et al.*, 2005)

Mascarenhas *et al.* (2005), estudaram a eficácia da azitromicina sistêmica quando combinada à RAR no tratamento de periodontite crônica em fumantes. Os autores observaram que os pacientes tratados com azitromicina e RAR demonstraram as maiores reduções na média de PS e NCI nos sítios moderados e profundos, além

dos melhores resultados microbiológicos, avaliados pelo teste BANA, comparados à RAR.

Winkel *et al.* (2001) analisaram o efeito da associação de amoxicilina e metronidazol à RAR considerando o hábito de consumo de cigarro do paciente. Os resultados demonstraram que as maiores reduções no índice de sangramento, profundidade de sondagem e ganho de inserção foram alcançadas no grupo de fumantes que recebeu os antibióticos, em comparação com o grupo que recebeu medicamento placebo. Os autores sugerem que o fumo, entre outros fatores, pode ser importante na decisão de tratar a periodontite com antibióticos.

Esses estudos sugerem que os antibióticos sistêmicos possuem um importante papel no tratamento da periodontite crônica, e que indivíduos fumantes podem se beneficiar dessa terapia. Logo, é importante a realização de novos estudos que avaliem a resposta clínica e microbiológica de indivíduos fumantes com periodontite crônica a diferentes antibióticos sistêmicos.

2. PROPOSIÇÃO

Avaliar e comparar os efeitos clínicos e microbiológicos da RAR associada ou não ao uso sistêmico de metronidazol ou de metronidazol e da amoxicilina, no tratamento de indivíduos fumantes com periodontite crônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção de indivíduos:

Após a apreciação e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos (UnG) (ANEXO A), quarenta e cinco indivíduos fumantes portadores de periodontite crônica que compareceram à Clínica Odontológica da Universidade Guarulhos foram incluídos neste estudo. A seleção foi realizada por 2 mestrandos em odontologia, área de concentração em periodontia, sob supervisão dos professores da disciplina. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas, coletas e terapias a serem utilizadas. A participação na pesquisa foi voluntária e os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), estando de acordo com a Resolução nº 196/96 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde.

3.2. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos neste estudo 45 indivíduos fumantes que consumissem pelo menos 10 cigarros por dia por um período mínimo de 5 anos (Ammenheuser *et al.*, 1997), com idade igual ou superior a 30 anos e que possuísem um mínimo de 15 dentes. Para caracterizar a presença de doença periodontal crônica, o indivíduo deveria apresentar 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal, não contíguo, com PS entre 5 e 7mm e NCI entre 5 e 10mm.

Os critérios de exclusão empregados neste estudo foram: pacientes grávidas ou lactantes, histórico de tratamento periodontal prévio, antibioticoterapia nos últimos seis meses, doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento e alergia relatada ao metronidazol e/ou à penicilina.

3.3. Delineamento experimental

No início deste estudo duplo cego todos os indivíduos (n=45) foram submetidos à anamnese, exame clínico periodontal e coleta de amostras de biofilme subgengival dos sítios selecionados (ver 3.4. Seleção dos sítios-teste). Em seguida os

indivíduos foram aleatoriamente distribuídos por meio de uma tabela de números equiprováveis nos seguintes grupos terapêuticos (n=15 por grupo):

- Grupo controle (C): RAR + medicamento placebo sistêmico 3 vezes ao dia durante 14 dias;

- Grupo teste 1 (T₁): RAR + metronidazol sistêmico (400 mg) 3 vezes ao dia durante 14 dias.

- Grupo teste 2 (T₂): RAR + metronidazol (400 mg) e amoxicilina (500 mg) sistêmicos 3 vezes ao dia durante 14 dias;

A antibioticoterapia foi iniciada no mesmo dia da terapia básica de RAR, que foi realizada em 6 sessões e finalizada em 21 dias. A avaliação clínica e microbiológica foi repetida na consulta de reavaliação aos 3 meses do término do tratamento. O protocolo experimental está apresentado na Figura 1.

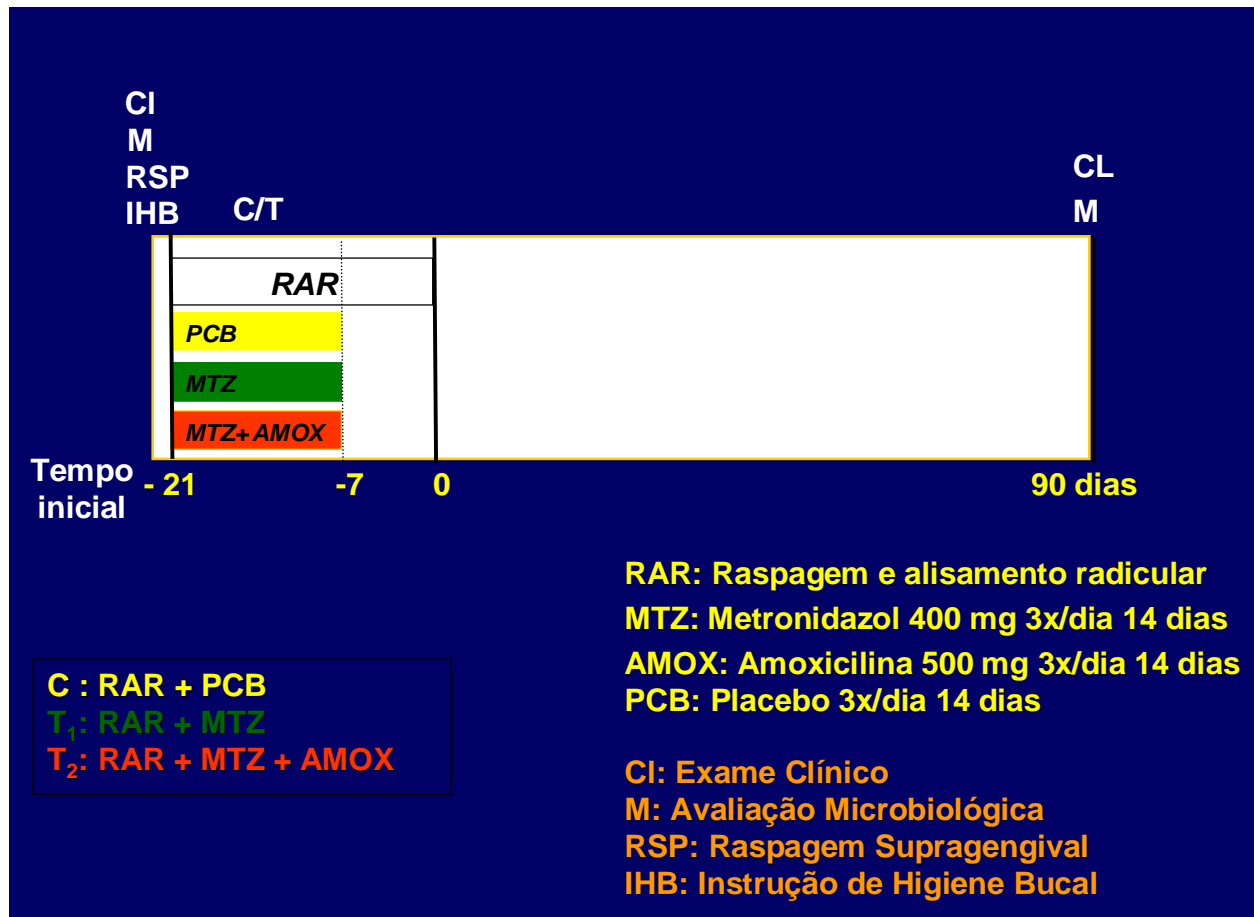


Figura 1. Delineamento experimental.

3.4. Avaliação clínico-periodontal

O exame clínico-periodontal foi efetuado no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo e selecionar os sítios-teste. Dois examinadores calibrados pelo método de erro padrão da medida e erro médio percentual (Gursky *et al.*, 2005), realizaram as medições clínicas.

As mensurações clínicas foram realizadas em 6 sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares) utilizando-se sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte PCPUNC-BR 15 (HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os parâmetros clínicos avaliados incluíram:

- Índice de placa visível (Ainamo & Bay, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa supra-gengival visível;

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

- Profundidade de sondagem (PS): distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;

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

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

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

3.5. Procedimentos terapêuticos

3.5.1. *Terapia periodontal básica*

Após o registro das medidas clínicas e coleta de placa subgengival para a análise microbiológica todos os indivíduos foram submetidos a sessões de adequação do meio bucal que incluíam instrução de higiene bucal (IHB), raspagem supragengival de todos os dentes (RSP), desgaste de restaurações em excesso, selamento provisório das lesões cariosas cavitadas, curativos endodônticos e exodontias. Durante as sessões de instrução de higiene bucal, os indivíduos foram orientados a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental Colgate Total® (Anacol Ind. E Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Em seguida, os indivíduos receberam seis sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy) sob anestesia local (Haffajee *et al.*, 1997) com Citocaína 3%® (cloridrato de prilocaína a 3%, felipressina 0,03UI/mL. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Itapira, SP, Brasil). Estas sessões de RAR tiveram duração de aproximadamente 1 hora e foram realizadas em no máximo 21 dias, por 2 alunos treinados do Mestrado em Odontologia da Universidade Guarulhos. O tratamento periodontal realizado foi inteiramente gratuito durante toda a duração do estudo. As necessidades adicionais de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da clínica odontológica da própria universidade.

3.5.2. *Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos e placebo*

Indivíduos dos grupos-teste receberam RAR e administração de 1,2 g/dia de metronidazol (400 mg de 8/8 hs) somente, ou combinado com 1,5 g/dia de amoxicilina (500 mg de 8/8 horas) via oral por 14 dias, iniciada em conjunto a terapia periodontal básica. Os pacientes do grupo controle receberam comprimidos de placebo e foram orientados a seguirem o mesmo regime dos pacientes que receberam as substâncias ativas. O antibiótico foi manipulado especialmente para este estudo na Farmácia de Manipulação Ervanário (Maringá, PR, Brasil), e foi fornecido gratuitamente aos indivíduos do estudo. Os indivíduos foram monitorados de 4 em 4 dias quanto a

reações adversas da medicação e para controle da cooperação na ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, por um aluno de iniciação científica, bolsista da UnG.

3.6. Avaliação microbiológica

3.6.1. Seleção dos sítios testes

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

3.6.2. Coleta das amostras de biofilme subgengival

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

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

Espécies	Cepas	Espécies	Cepas
Complexo azul		Complexo laranja (cont.)	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a	<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces naeslundii stp. 1</i>	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Actinomyces naeslundii stp. 2</i>	43146 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii</i>	49256 ^a
Complexo roxo		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>Peptostreptococcus micros</i>	33270 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
Complexo amarelo		<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	Complexo vermelho	
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
Complexo verde		Outras espécies	
<i>Aggregatibacter</i>	43717 ^a	<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>actinomycetemcomitans a e b</i>	43718 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Propionibacterium acnes I e II</i>	11827 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a		11828 ^a
Complexo laranja		<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a	<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

^a ATCC (American Type Collection)

^b Forsyth Institute

3.6.3. Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela 1. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5 % de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrilado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); enquanto *P.gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrilado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

3.6.4. Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500xg por 10 minutos. Em seguida, as cepas gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C₁₂H₂₅NaO₄S, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima

(Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith *et al.* (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Socransky & Haffajee, 1994; Socransky & Haffajee, 2005).

3.6.5. Checkerboard DNA-DNA Hybridization

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA – Figura 2) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microorganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente (Socransky *et al.*, 1994; Haffajee *et al.*, 1997). A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min.

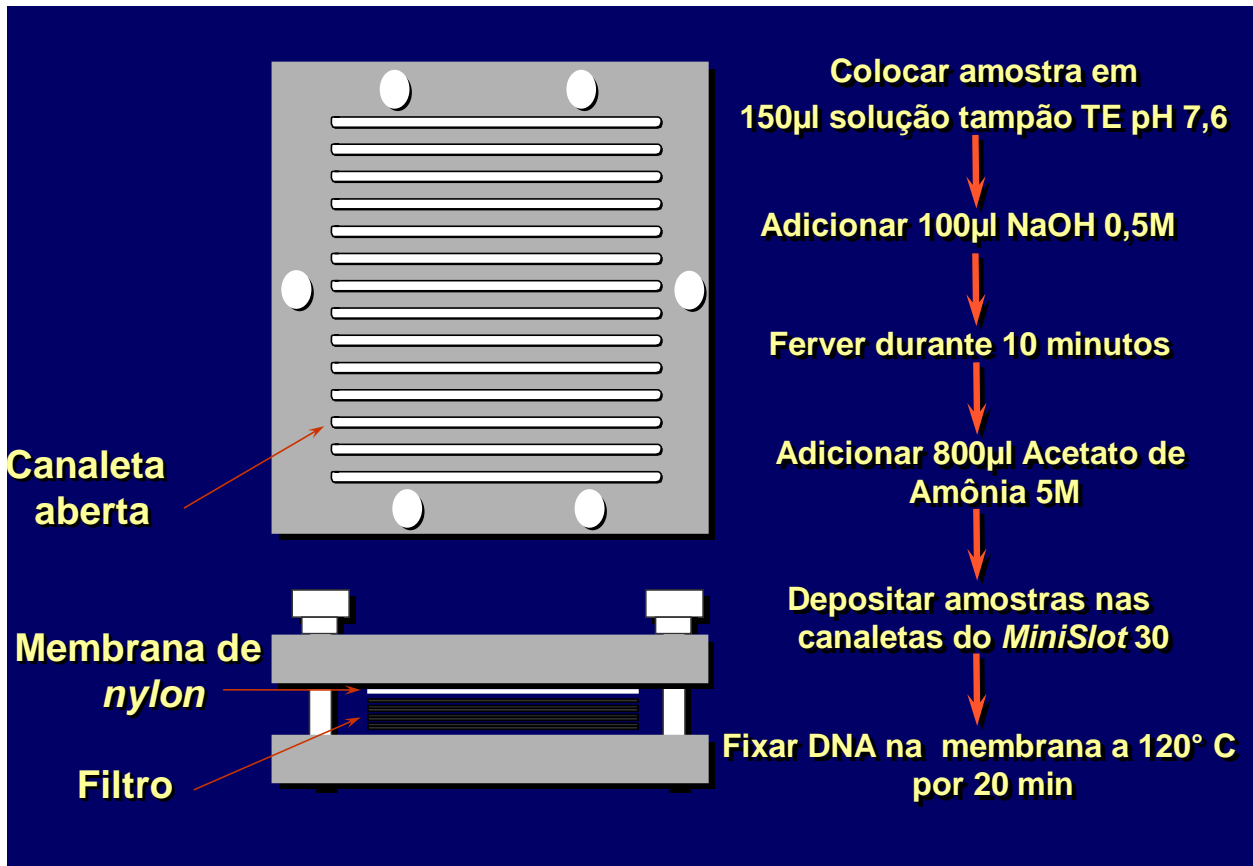


Figura 2. Representação gráfica do *Minislot 30* (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) (1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15mM de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0), 25mM de fosfato de sódio (Na₂HPO₄, Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma).

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter 45* (Immunelect, Cambridge, MA, EUA – Figura 3) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter 45* foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 ng/mL, em 130 µL de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de Na₂HPO₄ (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de

dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C.

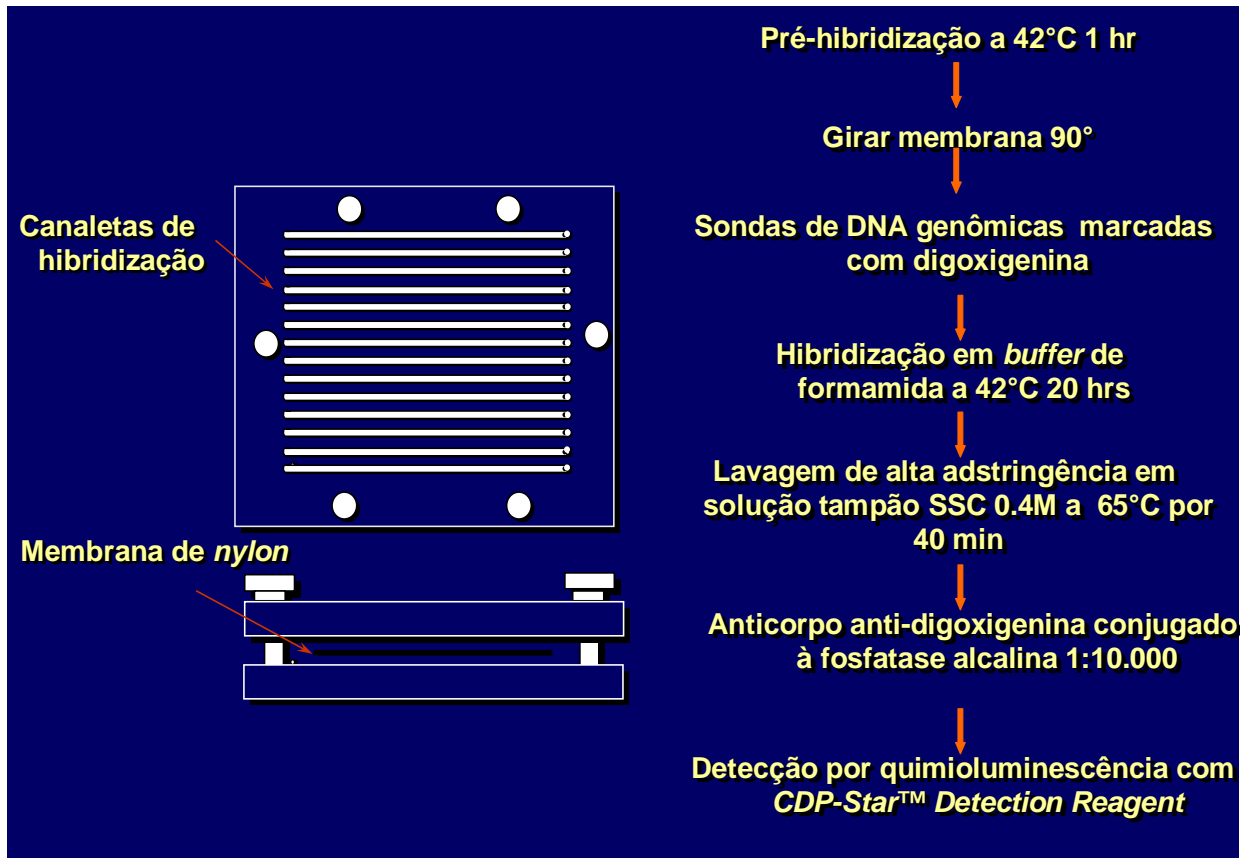


Figura 3. Representação gráfica do *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

3.6.6. Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C₄H₄O₄, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então,

lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

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

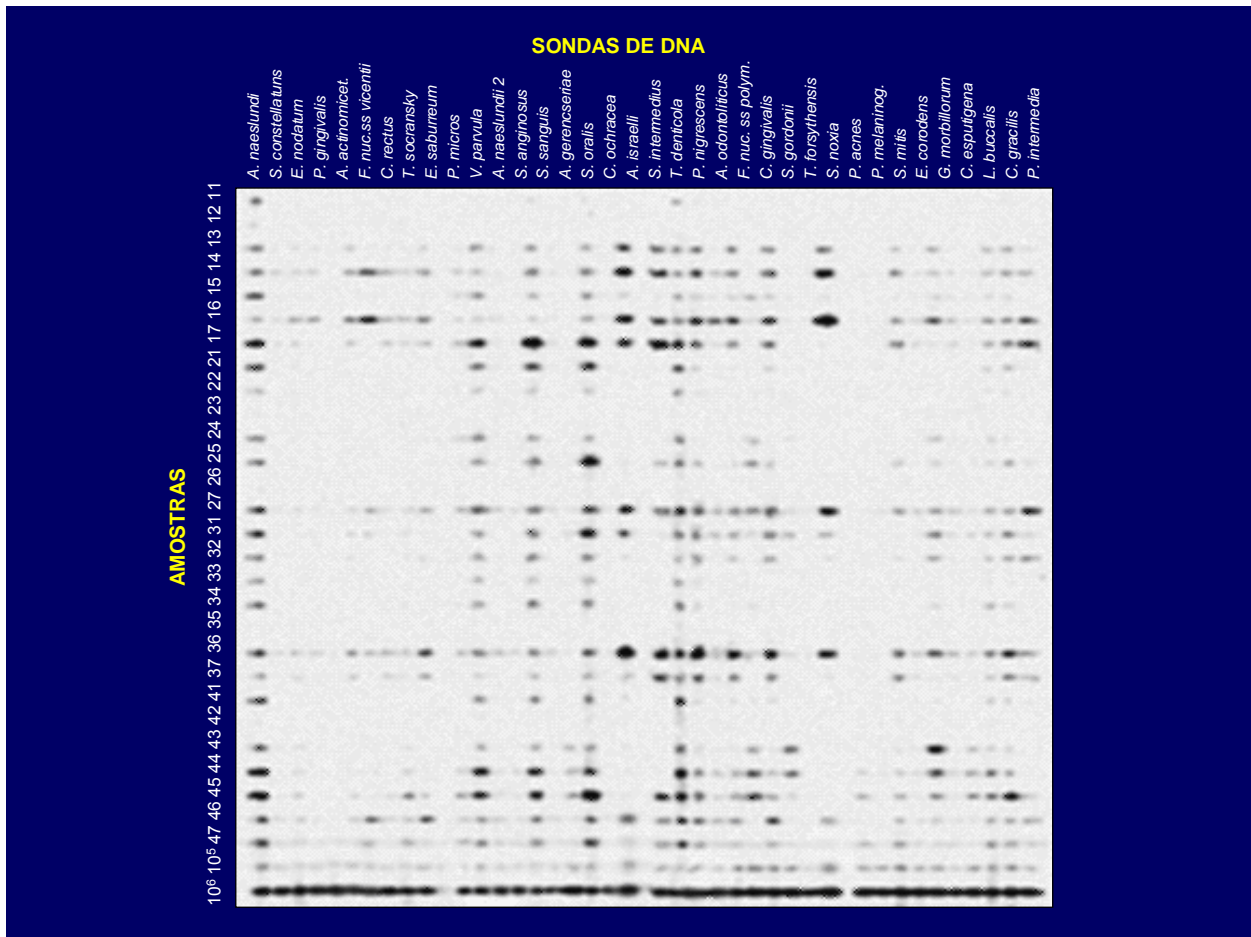


Figura 4. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

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

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

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

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.7.1. Avaliação clínico-periodontal

A média dos parâmetros clínicos avaliados foi computada para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. De maneira semelhante, as alterações nos parâmetros clínicos nos dois tempos experimentais foram examinadas separadamente nos sítios rasos ($PS \leq 3\text{mm}$), moderados ($PS 4-6\text{ mm}$), e profundos ($PS \geq 7\text{mm}$). Foram feitas as médias para cada um dos valores clínicos separadamente dentro das 3 categorias, em cada indivíduo, e então a média entre os indivíduos. As diferenças dentro de cada grupo, entre os tempos experimentais (inicial e 90 dias pós-terapia), foram avaliadas utilizando o teste Wilcoxon. Os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para examinar diferenças entre os 3 grupos terapêuticos. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$).

3.7.2. Avaliação microbiológica

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

Para comparar os níveis médios de cada uma das espécies bacterianas, os dados foram expressos como contagem x 10^5 em cada sítio, foram avaliados por indivíduo e depois entre indivíduos, dentro de cada grupo, em cada tempo do estudo.

De maneira semelhante, a proporção e a prevalência de cada espécie foram computadas para cada sítio, depois foram calculadas as médias entre os sítios em cada indivíduo, e então entre os indivíduos de um mesmo grupo terapêutico em cada tempo experimental.

Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microrganismos dentro de cada grupo, entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon. A significância estatística foi estabelecida em 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, considerando $p < 0,00125$ ($p < 0,05$), como proposto por Socransky *et al.* (1991).

4. RESULTADOS

Dos 45 indivíduos selecionados no início do estudo e aleatoriamente distribuídos entre os 3 grupos terapêuticos (n=15/grupo), 3 foram excluídos da análise dos resultados por terem faltado à consulta de reavaliação. Sendo assim, a análise final dos resultados deste estudo incluiu 42 indivíduos, dos quais 15 pertenciam ao grupo controle (C), 13 ao grupo que ingeriu metronidazol (T₁) e 14 ao grupo que recebeu a associação de metronidazol e amoxicilina (T₂).

4.1. Achados clínico-periodontais

As características epidemiológicas e as médias dos parâmetros clínicos avaliados no exame inicial, nos 3 grupos terapêuticos, estão apresentadas na Tabela 3 e não diferiram significativamente entre os grupos.

Tabela 3. Média (\pm DP) dos parâmetros clínicos no exame inicial dos indivíduos nos 3 grupos terapêuticos.

Variáveis	Grupos terapêuticos		
	C (RAR) N=15	T ₁ (RAR + M) N=13	T ₂ (RAR + M + AMOX) n=14
Idade (anos)	40,5+8,2	41,9+4,8	42,8+7,1
Gênero (M/F)	6/8	5/8	7/8
PS (mm)	3,9+0,6	3,7+0,7	4,0+0,7
NCI (mm)	4,7+ 1,2	4,5+1,0	4,8+0,8
% sítios:			
IPV 1	66,6+22,9	73,4+14,9	73,7+18,8
SG 1	15,5+19,1	30,5+34,9	15,1+13,9
SS 1	67,0+18,2	63,0+23,8	75,8+22,9
Sup1	3,5+5,4	1,7+ 2,5	2,9+1,7

DP: desvio padrão; PS: profundidade de sondagem; NCI: nível clínico de inserção ; IPV1: índice de placa visível positivo; SG1: índice de sangramento gengival positivo; SS1: sangramento à sondagem positivo; Sup1: supuração positiva. Testes Kruskal-Wallis e *U* de Mann-Whitney.

As médias de boca toda para os parâmetros clínicos avaliados nos 3 grupos terapêuticos no início e aos 90 dias pós-terapia estão representadas na Figura 5. Houve redução estatisticamente significativa nas médias de PS e NCI e no percentual de sítios com placa visível e SUP para todos os tratamentos. Já o parâmetro de SS só mostrou redução nos grupos-teste ($p < 0,01$), assim como o percentual de sítios com SG, com diferença significativa apenas no grupo T_1 ($p < 0,01$).

A Figura 6 apresenta as alterações nas médias de boca toda para os parâmetros de PS e NCI e no percentual de sítios exibindo placa visível entre o início e 90 dias pós-terapia. Houve redução nos valores destes 3 parâmetros em todos os grupos terapêuticos. As reduções nas médias de PS e NCI foram de $0,60 \pm 0,51$ mm e $0,44 \pm 0,38$ mm para o grupo C, $0,78 \pm 0,57$ mm e $0,62 \pm 0,54$ mm para o grupo T_1 e $1,08 \pm 0,35$ mm e $0,74 \pm 0,37$ mm para o grupo T_2 ($p < 0,01$). Observa-se que os fumantes que receberam uma das terapias antibióticas obtiveram as melhoras mais marcantes, destacando o grupo T_2 que demonstrou a maior redução. As alterações no percentual de sítios com placa visível foram semelhantes entre os grupos C, T_1 e T_2 , que obtiveram reduções de $25,9 \pm 23,4\%$; $26,9 \pm 20,1\%$ e $30,6 \pm 20,3\%$, respectivamente. Não houve diferença estatística no controle de biofilme supra-gengival entre os grupos terapêuticos, 90 dias após o término dos tratamentos.

A Figura 7 apresenta a diferença na média individual de PS e NCI no início e 90 dias pós-terapia nos 3 grupos. A melhora na PS foi evidente na maioria dos indivíduos em todos os grupos de tratamento, exceto para 1 indivíduo no grupo controle e 1 no grupo do metronidazol. As médias referentes ao NCI também reduziram independente da terapia empregada, sendo que apenas 1 indivíduo em cada grupo perdeu inserção. De forma geral os resultados mais consistentes e favoráveis em relação à melhora individual desses 2 parâmetros clínicos ocorreu no grupo T_2 , seguido do grupo T_1 e C.

Para um melhor entendimento do efeito das diferentes terapias e para permitir comparações mais claras entre os 3 grupos, os sítios foram divididos em categorias baseadas nos valores iniciais de PS em rasos ($PS \leq 3$ mm), moderados ($PS 4-6$ mm) e profundos ($PS \geq 7$ mm). As Figuras 8-10 apresentam os valores médios para cada parâmetro clínico no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia nas 3 categorias

de PS estabelecidas inicialmente para os 3 tratamentos. Quando as bolsas inicialmente rasas foram consideradas (Figura 8), observou-se que todas as terapias levaram a uma diminuição significativa no percentual de sítios com placa visível. Porém, os demais parâmetros avaliados não sofreram alterações significativas, mantendo-se estáveis na reavaliação. Nota-se apenas um discreto aumento nas médias de NCI e no percentual de sítios com SS no grupo controle. Uma diminuição significativa na média da maioria dos parâmetros clínicos foi observada aos 90 dias pós-terapia para as categorias de bolsas inicialmente moderadas (Figura 9) e profundas (Figura 10). Apenas o percentual de sítios com SS nas bolsas moderadas do grupo controle, e o de SG nas bolsas profundas, nos 3 grupos, não sofreram reduções significativas pós-terapia.

As Figuras 11 a 13 apresentam as alterações nas médias de PS e NCI nos diferentes tratamentos, nas 3 categorias iniciais de sondagem, nos 2 tempos experimentais. Nota-se em todas as categorias de bolsa que os grupos que receberam antibiótico como parte da terapia (T_1 e T_2) mostraram uma superioridade no que diz respeito à diminuição da média de PS e NCI, em relação ao grupo controle, principalmente o grupo T_2 .

A redução observada nas bolsas inicialmente rasas pós-terapia para o parâmetro de PS foi significativamente maior no grupo T_2 ($0,15 \pm 0,19\text{mm}$) do que no grupo T_1 ($0,08 \pm 0,20\text{mm}$) ou C ($0,003 \pm 0,33\text{mm}$). Quanto à média de NCI, apenas o grupo controle apresentou um pequeno aumento neste parâmetro nas bolsas inicialmente rasas, aos 90 dias pós-terapia. Os grupos-teste mostraram reduções semelhantes na média de NCI nesta categoria de bolsa.

As terapias com antibióticos também reduziram mais efetivamente a PS e o NCI das bolsas moderadas e profundas em relação à terapia mecânica ($p < 0,01$). As maiores reduções foram também observadas no grupo T_2 , que exibiu uma alteração significativamente maior do que o grupo T_1 para o parâmetro de NCI nos sítios inicialmente moderados.

4.2. Achados microbiológicos

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

A Figura 14 apresenta a média de contagem ($\times 10^5 \pm$ desvio padrão) das 40 espécies subgengivais no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia para os 3 grupos terapêuticos. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos descritos por Socransky *et al.* (1998). De um modo geral, todas as terapias utilizadas levaram a uma redução na contagem dos 3 patógenos do complexo vermelho, porém, apenas o grupo que recebeu a combinação dos 2 antibióticos reduziu significativamente as 3 espécies deste complexo. Os níveis (contagem $\times 10^5 \pm$ desvio padrão) de *T. forsythia* passaram de $3,4 \pm 2,5$ para $1,1 \pm 1,2$ ($p > 0,05$) no grupo C; de $2,9 \pm 2,5$ para $0,1 \pm 0,1$ ($p < 0,05$) no grupo T₁, e de $3,64 \pm 2,01$ para $0,26 \pm 0,73$ ($p < 0,05$) no grupo T₂; *P. gingivalis* passaram de $2,4 \pm 2,7$ para $0,6 \pm 0,9$ ($p > 0,05$) no grupo C, de $2,2 \pm 1,4$ para $0,2 \pm 0,3$ ($p < 0,05$) no grupo T₁ e de $3,32 \pm 2,21$ para $0,13 \pm 0,29$ ($p < 0,05$) no grupo T₂; e *T. denticola* passaram de $1,8 \pm 1,4$ para $0,4 \pm 0,5$ ($p > 0,05$) no grupo C, de $1,5 \pm 1,3$ para $0,3 \pm 0,7$ ($p > 0,05$) no grupo T₁ e de $1,12 \pm 1,31$ e $0,10 \pm 0,33$ ($p < 0,05$) no grupo T₂. A contagem de 3 espécies do complexo laranja foram significativamente reduzidas nos grupos T₁ (*C. rectus*, *E. nodatum* e *P. micros*) e T₂ (*E. nodatum*, *F. nucleatum ssp polymorphum* e *P. micros*). Apesar da raspagem e alisamento radicular somente (grupo C) também ter levado a redução de algumas espécies do complexo laranja, essas alterações não foram significantes. As contagens da maioria das espécies consideradas benéficas dos grupos roxo, amarelo, verde, e espécies de *Actinomyces* foram pouco afetadas após às terapias.

A média da proporção das sondas de DNA das 40 espécies subgengivais no início do estudo e 90 dias pós-terapia está apresentada na Figura 15. Mudanças substanciais ocorreram nas proporções das 3 espécies do complexo vermelho no grupo que associou metronidazol e amoxicilina, seguido pelo grupo que recebeu apenas metronidazol e pelo grupo controle. As variações entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia foram as seguintes: *T. forsythia* passou de $18,4 \pm 9,9\%$ para $4,6 \pm 5,6\%$ ($p < 0,05$) no grupo C; de $11,2 \pm 9,2\%$ para $1,1 \pm 1,0\%$ ($p < 0,05$) no grupo T₁, e de $15,0 \pm 8,6$ para

1,3±2,7 (p<0,05) no grupo T₂; *P. gingivalis* passou de 9,1±6,8% para 2,5±4,2% (p>0,05) no grupo C, de 9,0±8,4% para 1,9±4,2% (p<0,05) no grupo T₁ e de 11,6±8,2% para 0,4±0,5% (p<0,05) no grupo T₂; e *T. denticola* passou de 5,6±4,4% para 1,4±1,9% (p>0,05) no grupo C, de 5,1±6,7% (p>0,05) para 1,3±1,7% no grupo T₁ e de 3,8±2,8% para 0,3±0,68% (p<0,05) no grupo T₂. Além disso, 1 espécie do complexo laranja, *E. nodatum*, teve sua proporção reduzida significativamente no grupo T₂, de 1,4±1,7% para 0,05±0,12%. Apesar de não significativo, várias espécies consideradas benéficas sofreram um ligeiro aumento em proporções após a terapia, principalmente nos grupos T₁ e T₂. Os *Actinomyces*, as espécies do complexo roxo e algumas do complexo verde estavam aumentadas, em proporção, aos 90 dias pós-terapia, particularmente nos grupos-teste.

As Figuras 16 e 17 apresentam, respectivamente, a média da proporção das sondas de DNA das 40 espécies bacterianas subgingivais no início e aos 90 dias pós-terapia nos 3 grupos terapêuticos, nas categorias de bolsas inicialmente rasas (PS≤4mm) e profundas (PS≥5 mm). Nas bolsas inicialmente rasas, o grupo T₂ teve as médias das proporções das 3 espécies do complexo vermelho significativamente reduzidas. O grupo T₁ mostrou redução significativa nas espécies *T. forsythia* e *P.gingivalis* e no grupo C apenas a espécie *T. forsythia* estava reduzida em proporções aos 90 dias pós-terapia. O complexo laranja teve 1 espécie, *E. nodatum*, significativamente reduzida no grupo T₂. Observou-se também um aumento na proporção de espécies do complexo roxo e nas espécies de *Actinomyces* nesta categoria de bolsa, principalmente nos grupos-teste, ainda que sem significância estatística. Nas bolsas inicialmente profundas, os grupos-teste apresentaram uma alteração semelhante nas espécies do complexo vermelho, com diminuição significativa na média de proporção dos 3 patógenos. Assim como nas bolsas rasas, as proporções de *E. nodatum* também foram significativamente reduzidas, nas bolsa inicialmente profundas do grupo T₂. As médias de proporções das espécies benéficas *A. odontolyticus* e *A. naeslundii* sorotipo 1 foram significativamente aumentadas após terapia no grupo T₁; *V. parvula* no grupo T₂; e *A. naeslundii* sorotipo 2 no grupo C.

Vale destacar que as proporções de algumas espécies do complexo laranja foram reduzidas, porém outras sofreram aumento após as diferentes terapias, tanto na

avaliação conjunta quanto na análise das diferentes categorias de bolsa (Figuras 15 a 17). Esse aumento foi observado principalmente nas as espécies de *Fusobacterium*.

A Figura 18 apresenta o percentual de sítios colonizados pelas 40 espécies subgingivais nos 3 grupos experimentais no início do estudo e após 90 dias do término do tratamento. Observa-se que todas as terapias tiveram sucesso na redução de patógenos periodontais, mas que a combinação de metronidazol e amoxicilina levou aos melhores resultados, diminuindo a prevalência de *T. forsythia* de $76,1 \pm 18,8\%$ para $29,7 \pm 29,3\%$, de *P. gingivalis* de $63,4 \pm 25,5\%$ para $13,4 \pm 15,5\%$ e de *T. denticola* de $55,5 \pm 23,4\%$ para $5,5 \pm 9,5\%$ ($p < 0,05$). O grupo T₁, teve um efeito ligeiramente menor, mostrando uma redução na prevalência de *T. forsythia* de $63,0 \pm 24,8\%$ para $28,1 \pm 26,6\%$ ($p > 0,05$), de *P. gingivalis* de $55,5 \pm 27,9\%$ para $21,3 \pm 22,8\%$ ($p < 0,05$) e de *T. denticola* de $43,5 \pm 18,3\%$ para $23,1 \pm 29,7\%$ ($p > 0,05$). No grupo C, as 3 espécies do complexo vermelho foram reduzidas, porém sem significância estatística, *T. forsythia* passou de $74,5 \pm 14,6\%$ para $45,1 \pm 23,5\%$, de *P. gingivalis* de $62,1 \pm 25,8\%$ para $25,9 \pm 14,9\%$ e de *T. denticola* de $56,9 \pm 24,7\%$ para $27,3 \pm 20,0\%$ ($p > 0,05$) Os indivíduos que tomaram os 2 antibióticos também tiveram uma redução significativa no percentual de sítios colonizados por *E. nodatum* (de $40,5 \pm 22,8\%$ para $2,3 \pm 4,7\%$) e *P. micros* (de $44,4 \pm 23,8\%$ para $4,7 \pm 7,2\%$) após a terapia. Reduções na média de sítios colonizados por outras espécies do complexo laranja podem, ainda, ser observadas no grupo T₂ e também nos outros 2 grupos terapêuticos, embora sem significância estatística.

A Figura 19 apresenta as proporções dos complexos microbianos no início e aos 90 dias pós-terapia nas amostras de biofilme subgingival dos indivíduos dos 3 grupos terapêuticos. As áreas dos gráficos foram ajustadas para refletir a contagem total de microrganismos em cada grupo terapêutico, nos 2 tempos experimentais. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos propostos por Socransky *et al.* (1998). Pode-se observar que as proporções dos diferentes complexos microbianos foram semelhantes no início do estudo sem diferenças estatísticas entre os 3 grupos experimentais. Os complexos presentes em maiores proporções no início do estudo foram o vermelho e o laranja. Todas as terapias levaram a uma redução significativa nas proporções do complexo vermelho; sendo que essa redução foi ainda

mais marcante nos grupos T₂ (32% para 2,01%, p<0,001) e T₁ (25,51% para 4,41%, p<0,01) do que no grupo C (33,28% para 8,67%, p<0,05). Já a proporção do complexo laranja não foi afetada por nenhuma das 3 terapias. Este grupo de bactérias mostrou inclusive um pequeno aumento aos 90 dias pós-terapia, passando de 29,11% para 36,73% no grupo controle, de 32,94% para 35,19% no grupo que recebeu metronidazol e de 30,97% para 32,24% no grupo que associou o metronidazol à amoxicilina. As proporções dos complexos considerados benéficos, verde, roxo, amarelo, e das espécies de *Actinomyces*, representados em azul, aumentaram após as terapias, sendo que esse aumento foi mais pronunciado, e significativo no grupo T₂ (de 28,3% para 54,9% p< 0,05), seguido do T₁ (de 32,1% para 54,8%, p>0,05), e do C (de 28,6% para 43,4%, p>0,05).

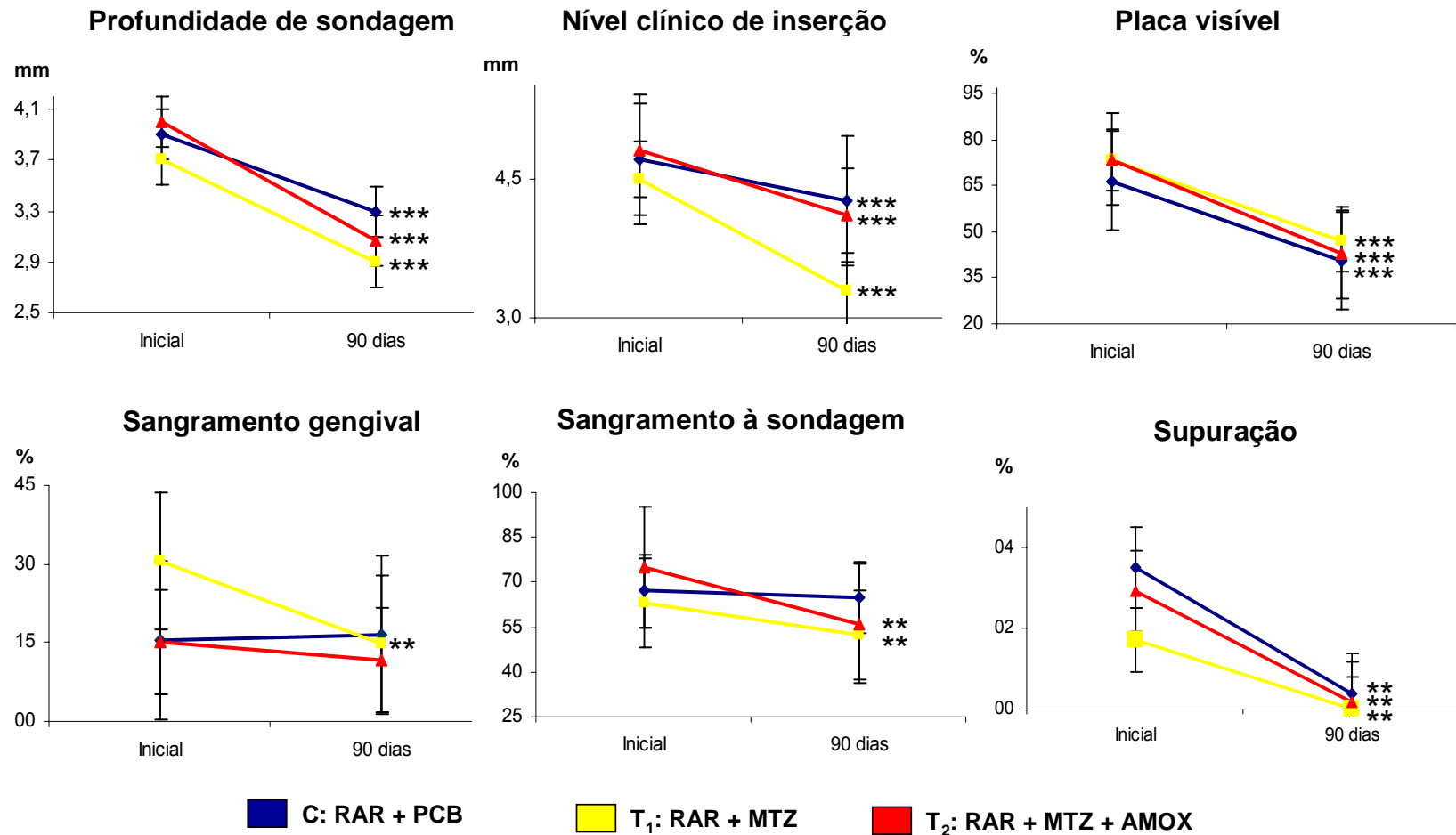


Figura 5. Média dos parâmetros clínicos de boca toda avaliados no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (**p<0,01 e ***p<0,001).

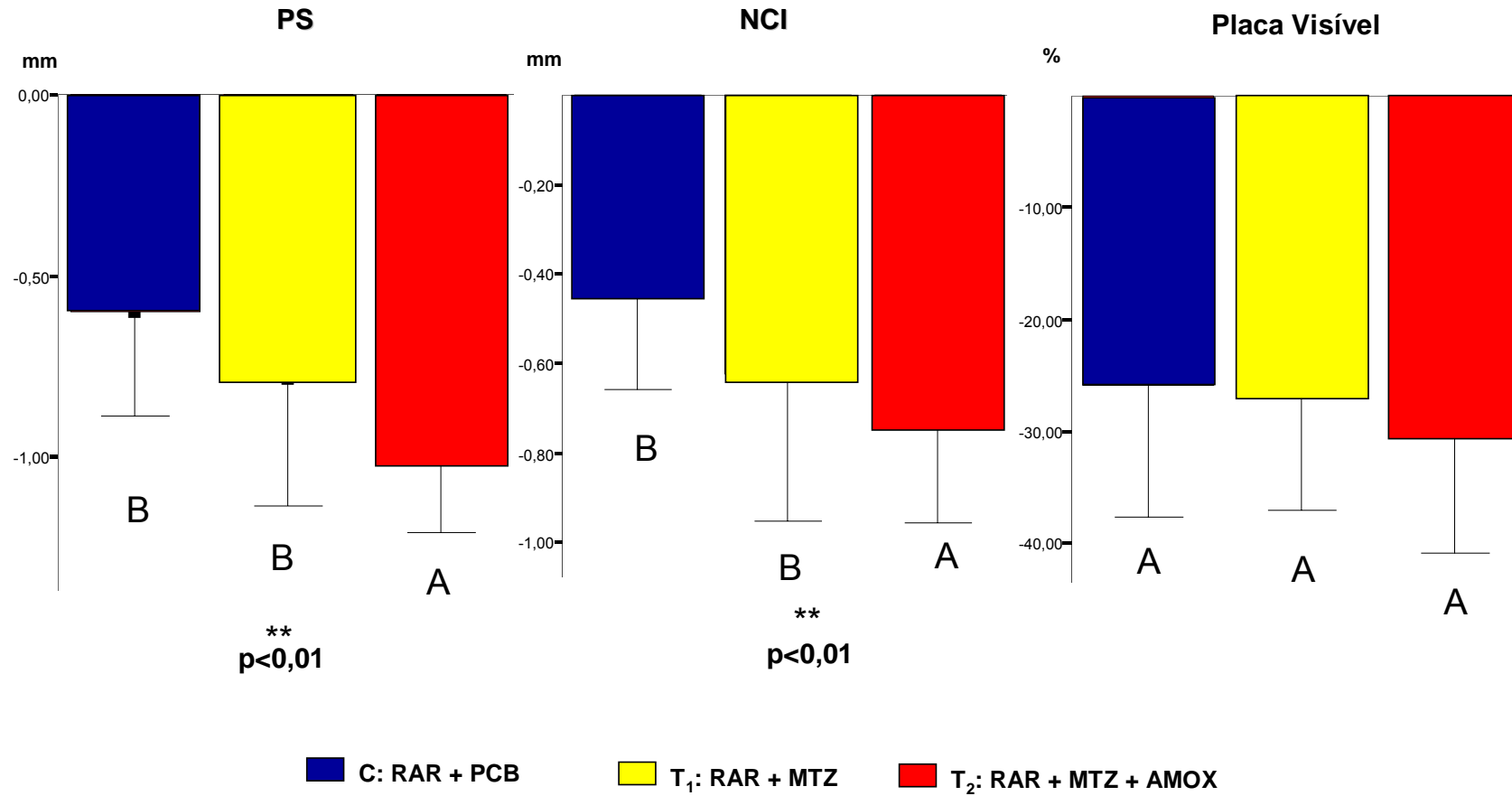


Figura 6. Alterações nas médias de profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI) e no percentual de sítios exibindo placa visível, de boca toda, entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis (** $p < 0,01$). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos (Teste *U* de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

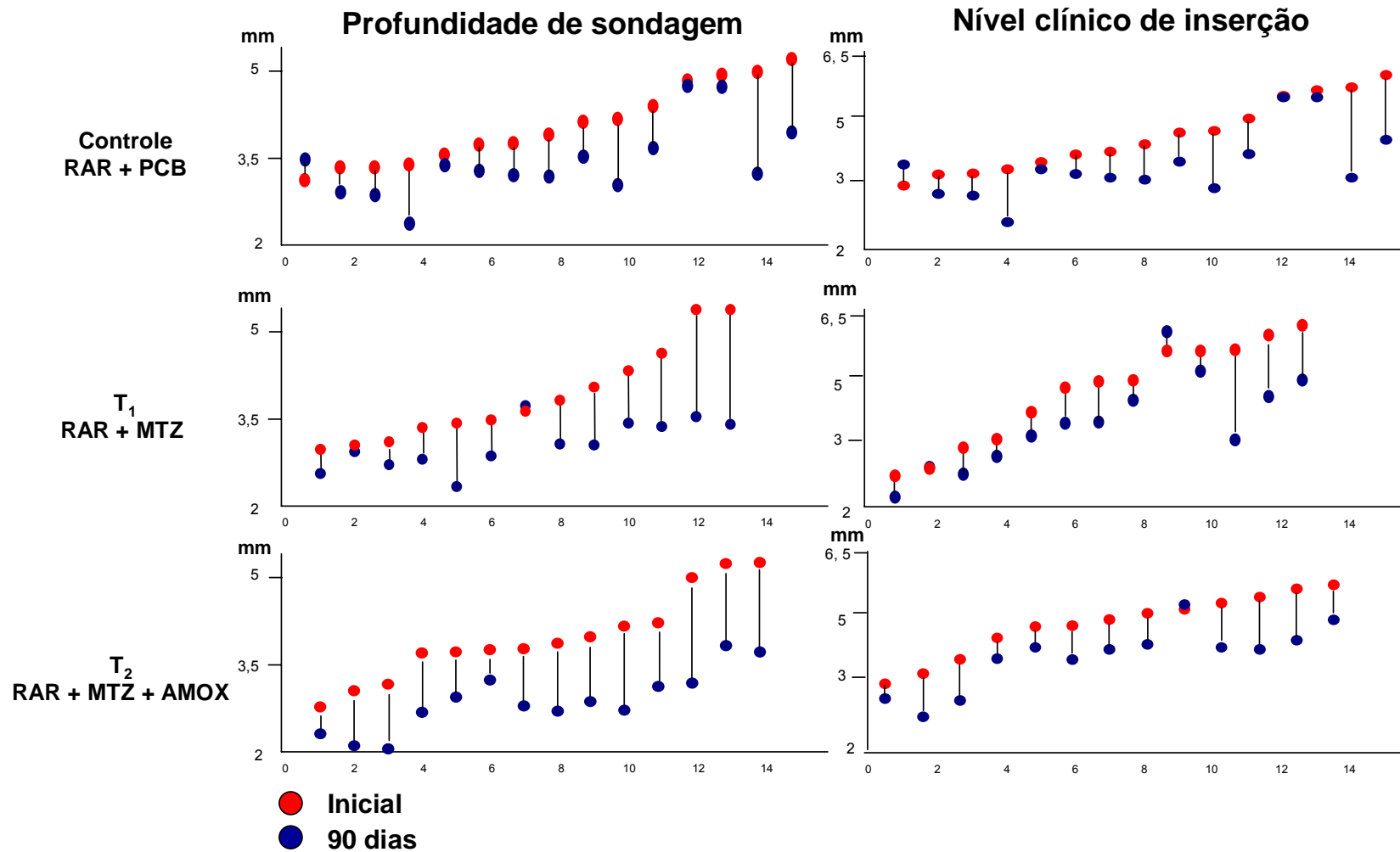


Figura 7. Alterações das médias individuais de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI) no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina.

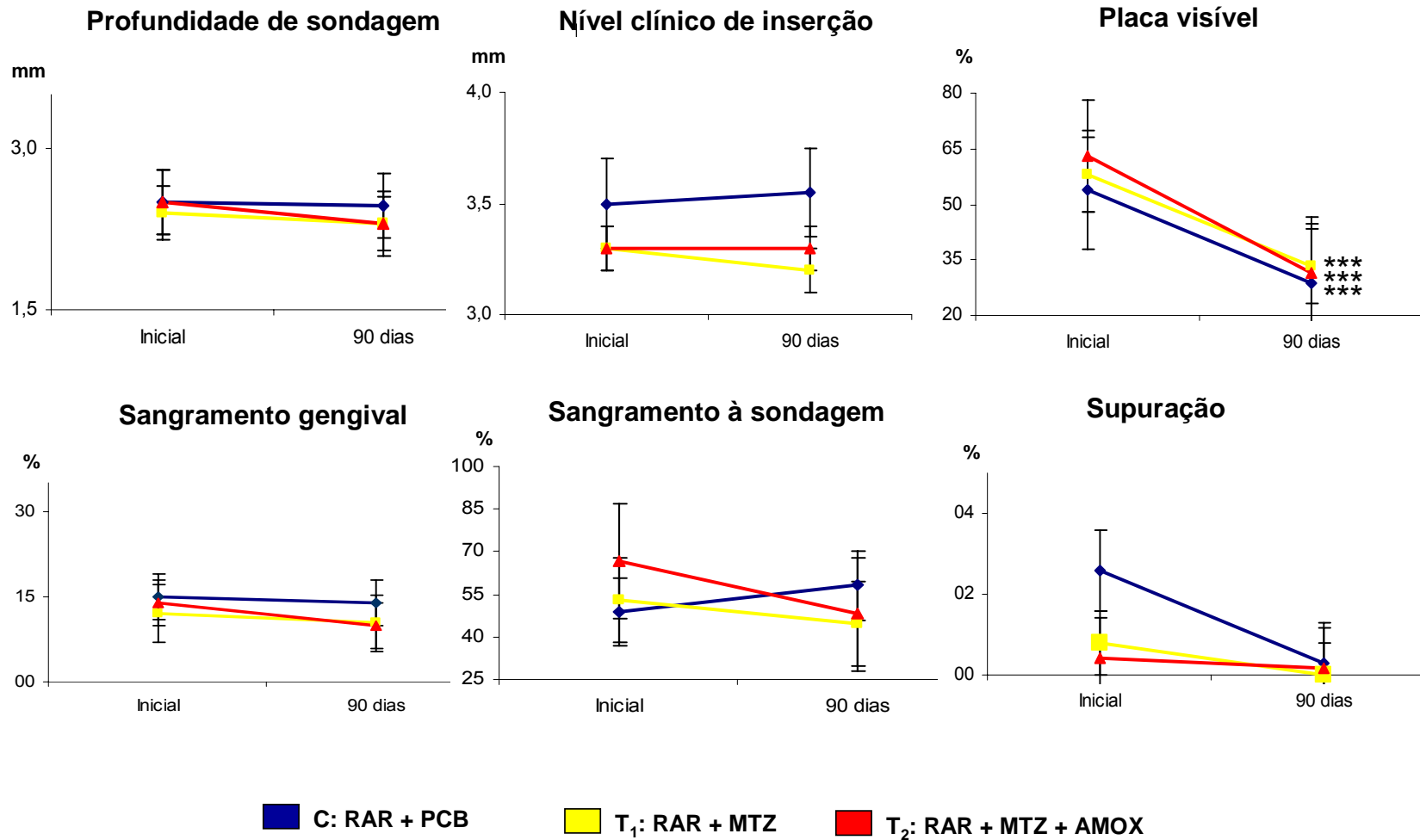


Figura 8. Média dos parâmetros clínicos avaliados em sítios inicialmente rasos no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (***) $p < 0,001$).

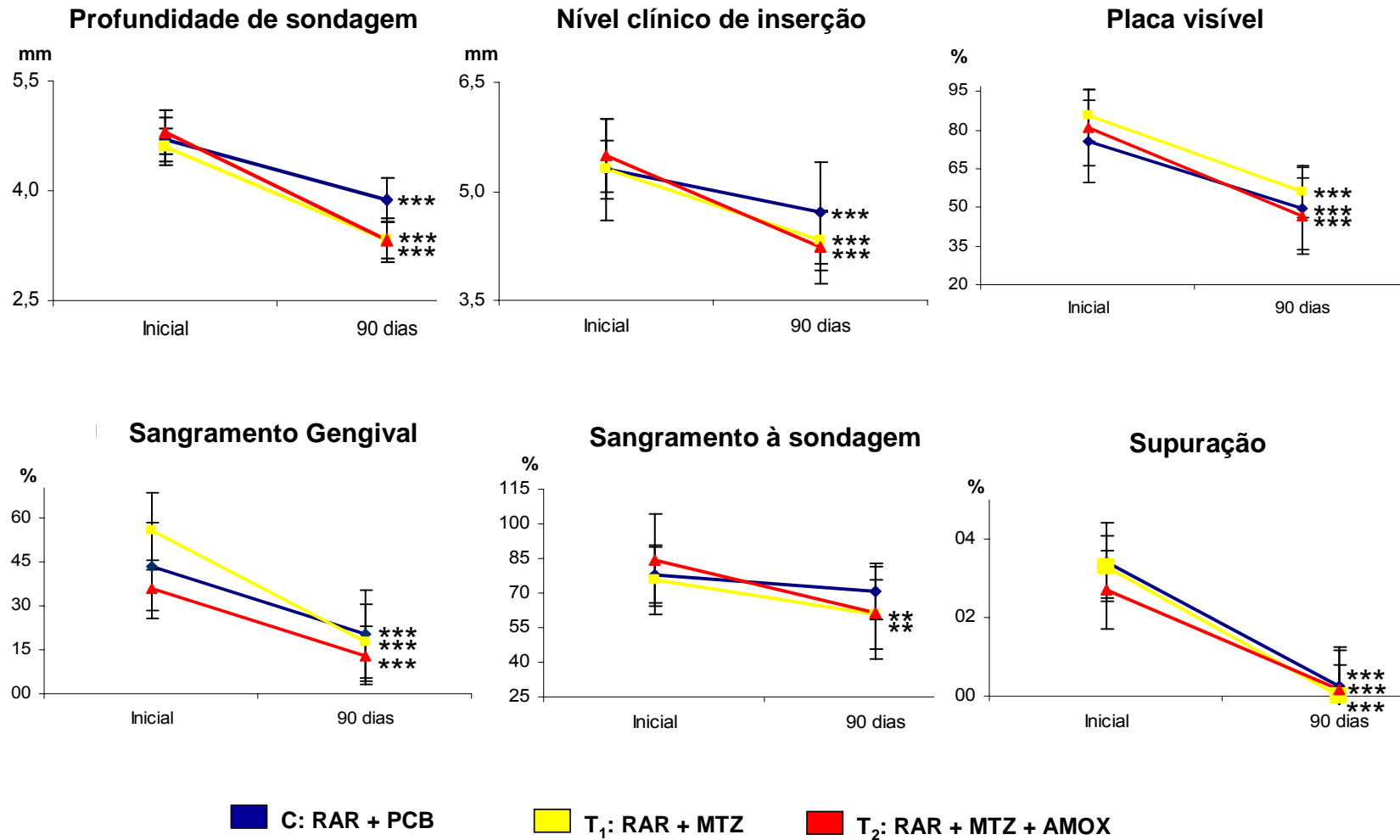


Figura 9. Média dos parâmetros clínicos avaliados em sítios inicialmente moderados no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

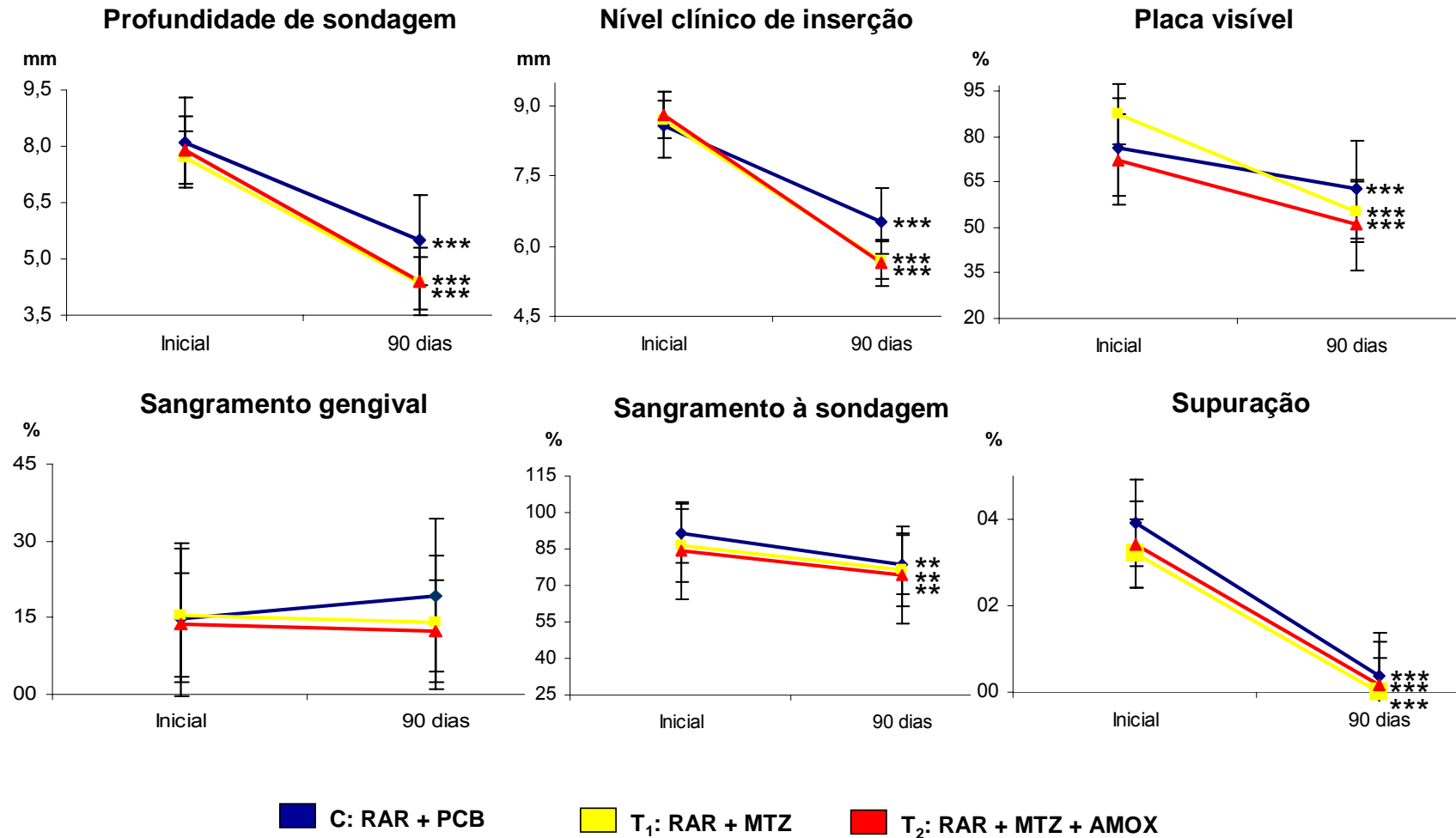


Figura 10. Média dos parâmetros clínicos avaliados em sítios inicialmente profundos no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

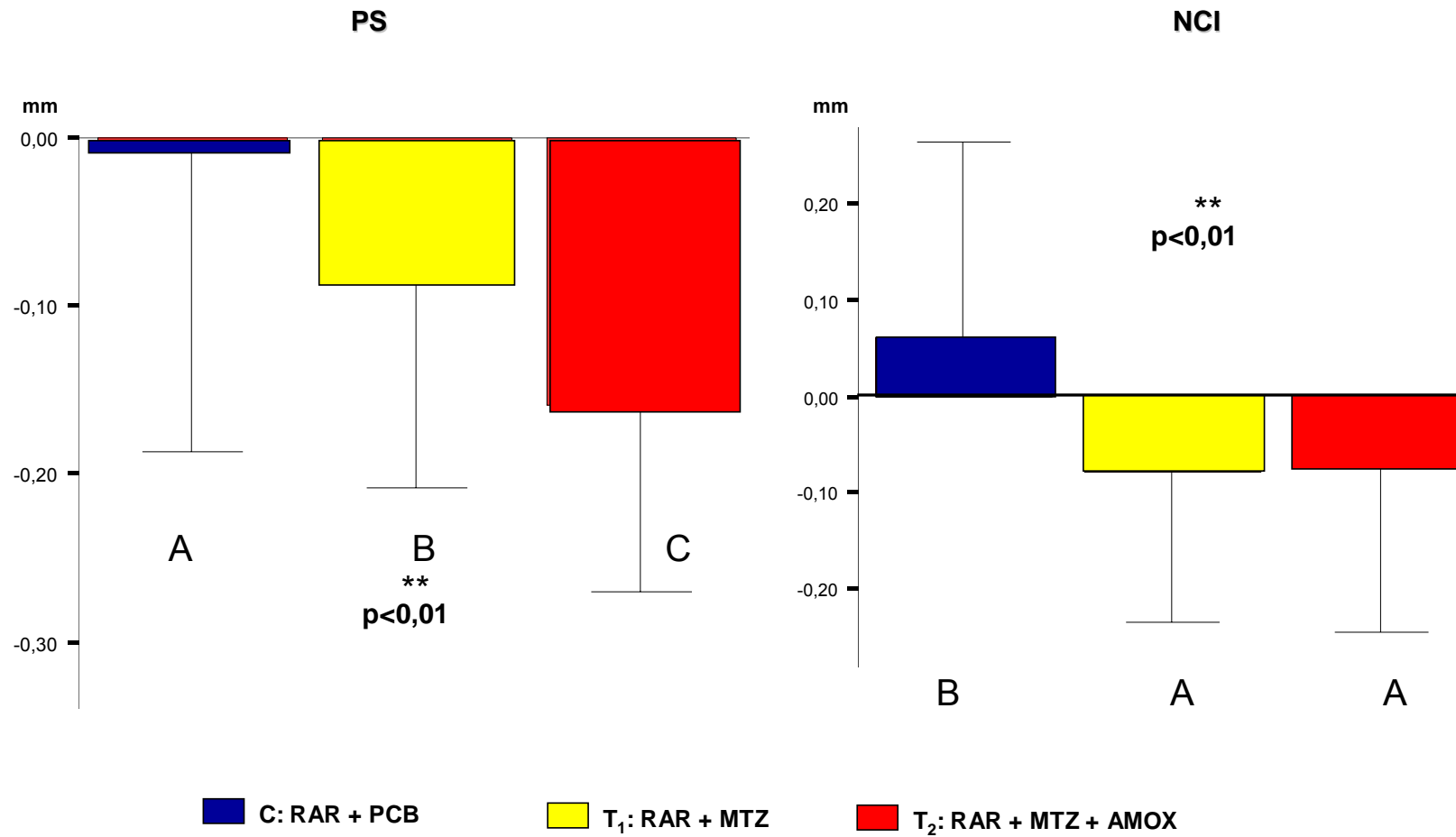


Figura 11. Alterações nas médias de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), em sítios inicialmente rasos entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis (** $p < 0,01$). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos (Teste *U* de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

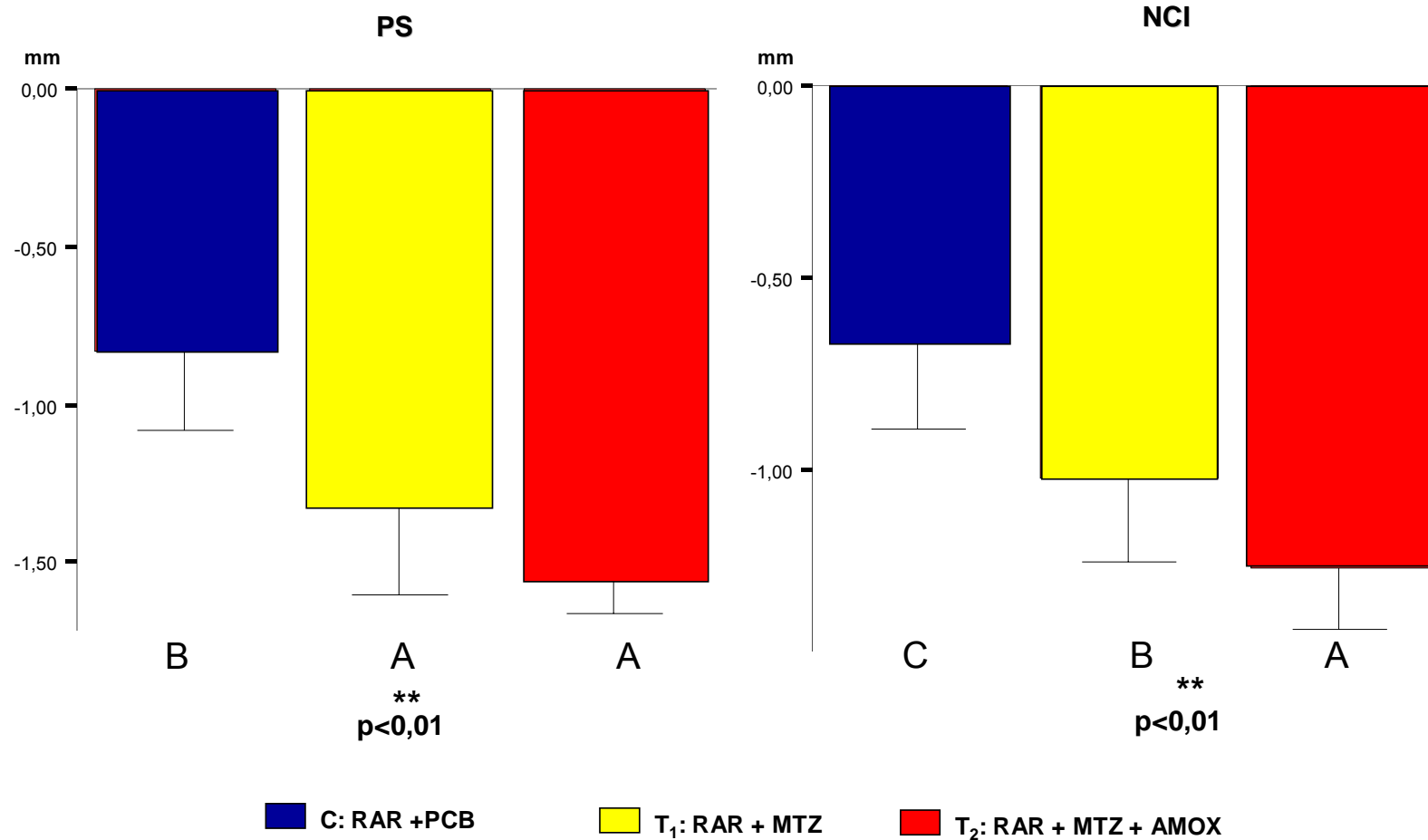


Figura 12. Alterações nas médias de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), em sítios inicialmente moderados entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis (** $p < 0,01$). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos (Teste *U* de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

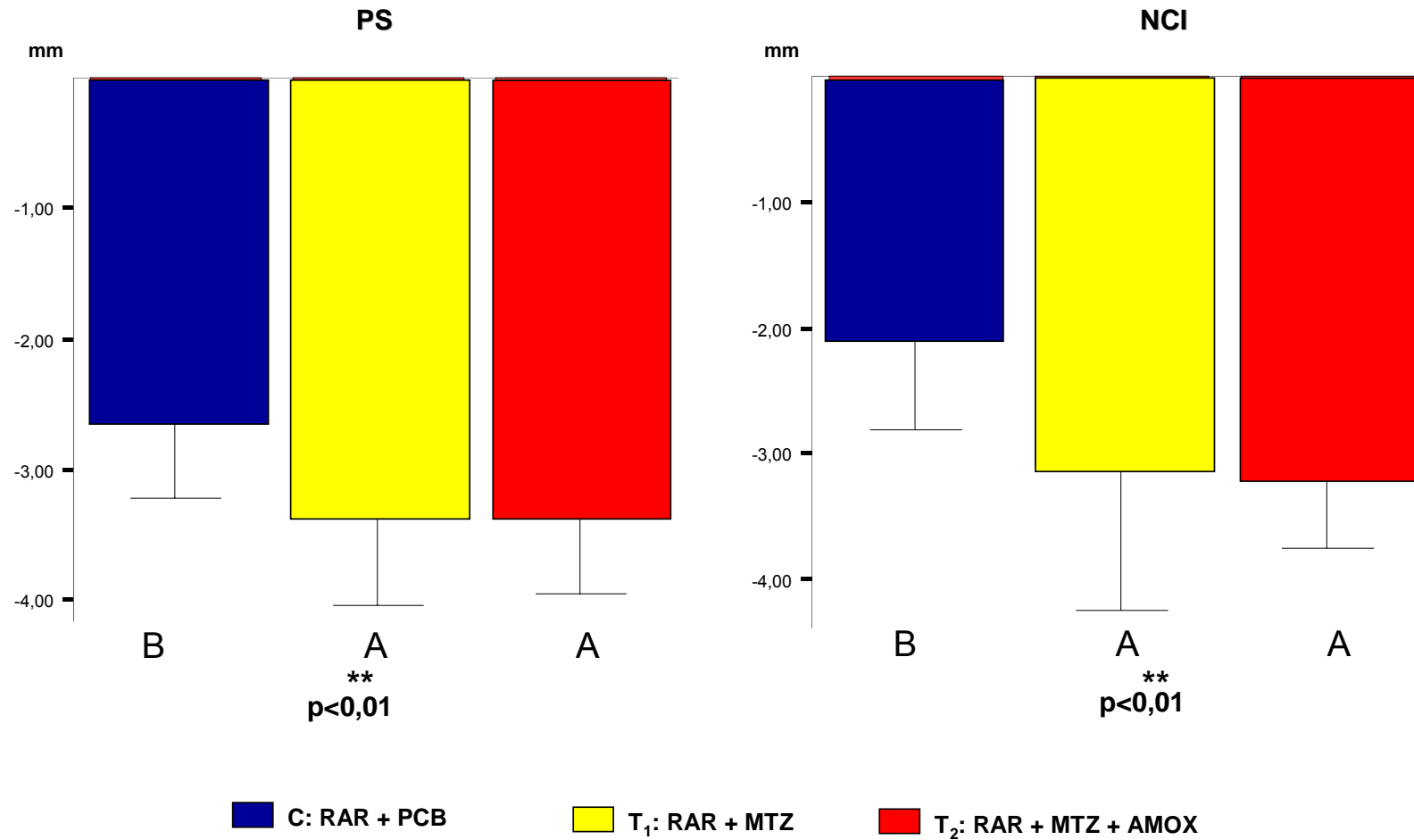


Figura 13. Alterações nas médias de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), em sítios inicialmente profundos entre o início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis (**p<0,01). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos (Teste U de Mann-Whitney, p<0,05) .

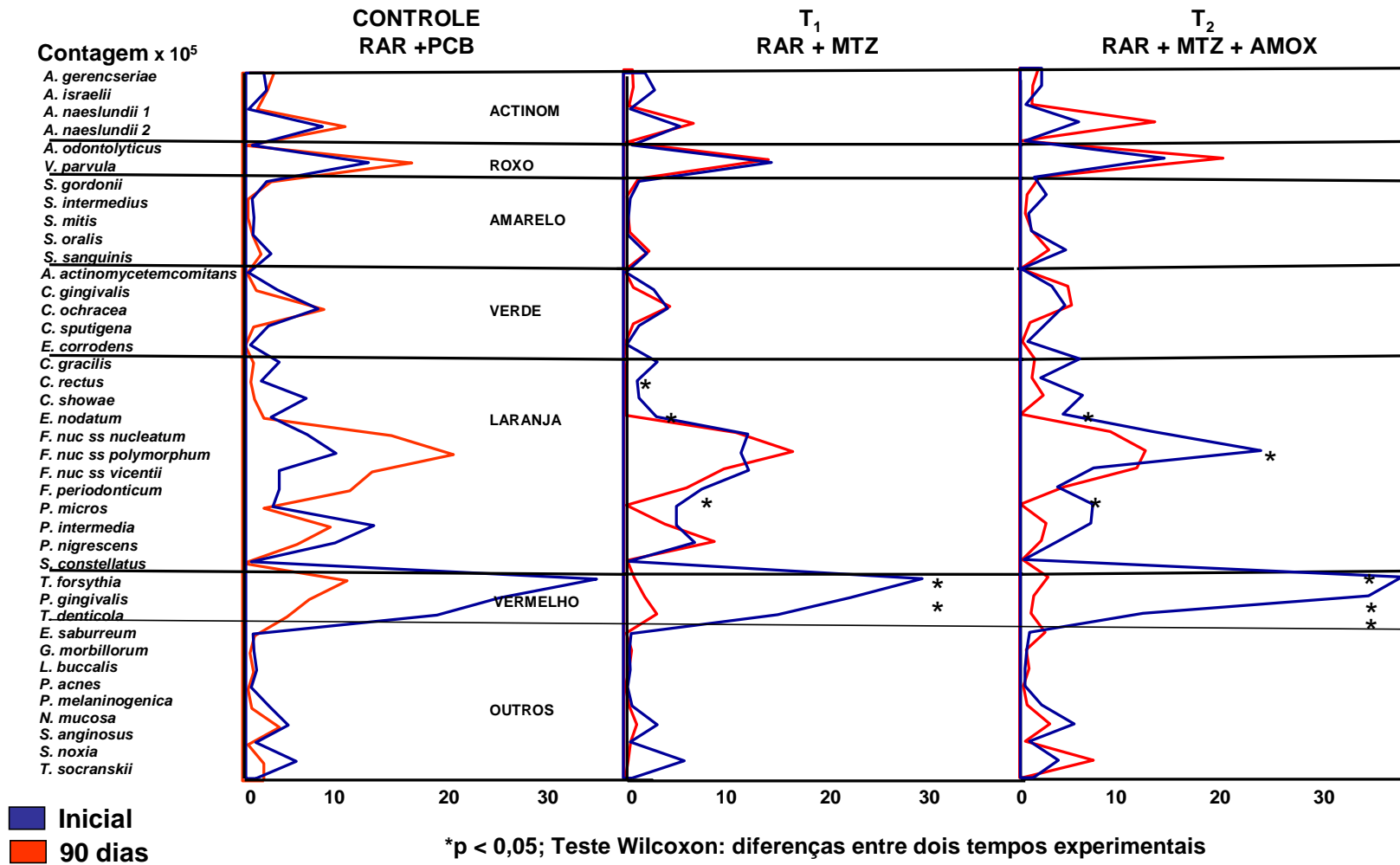


Figura 14. Perfil microbiano das médias de contagem (X10⁵) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (*p<0,05). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

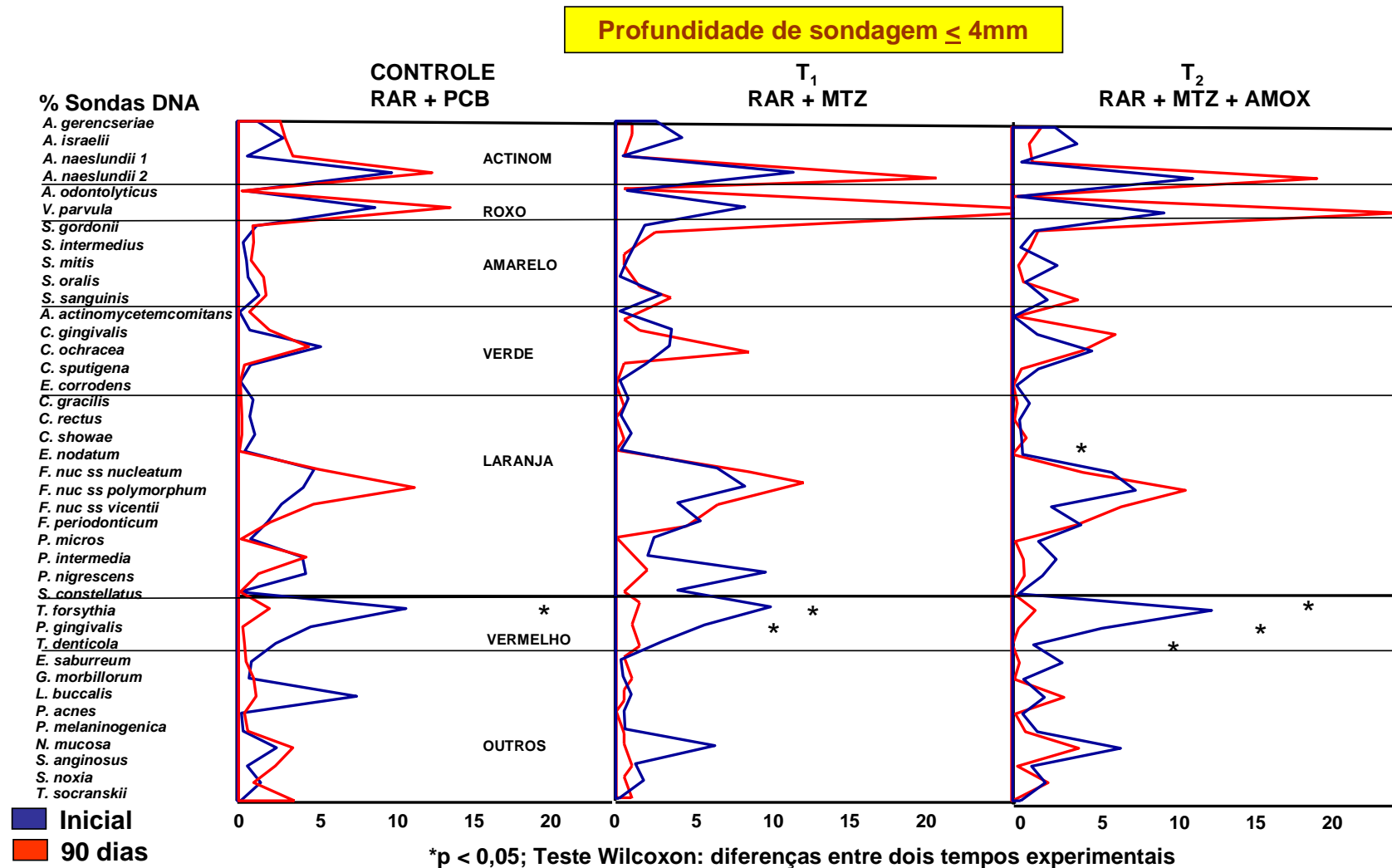


Figura 16. Perfil microbiano das médias de proporção (%) de sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival de sítios com profundidade de sondagem inicial $\leq 4\text{mm}$, no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (* $p < 0,05$). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

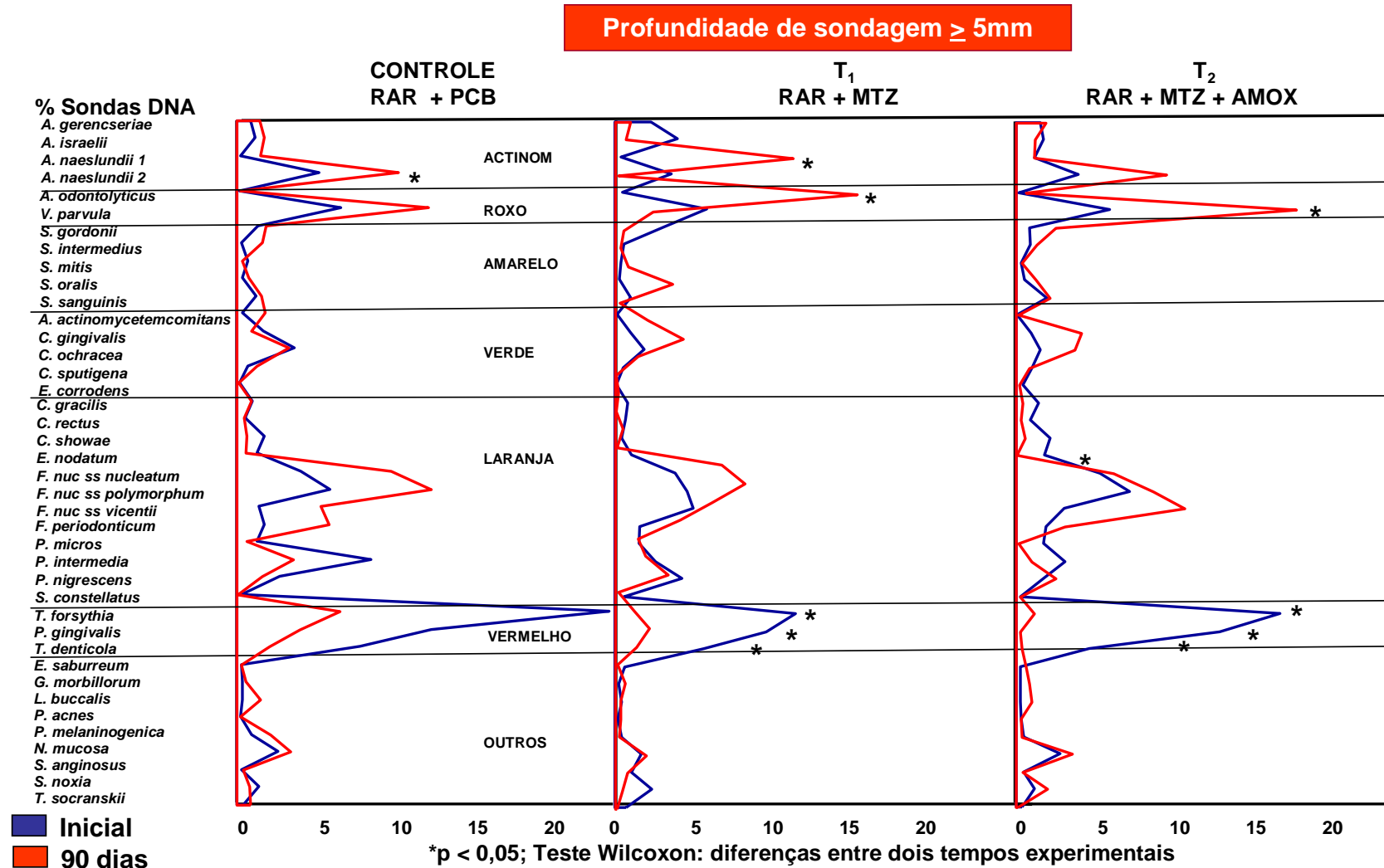


Figura 17. Perfil microbiano das médias de proporção (%) de sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival de sítios com profundidade de sondagem inicial ≥ 5 mm, no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (* $p < 0,05$). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

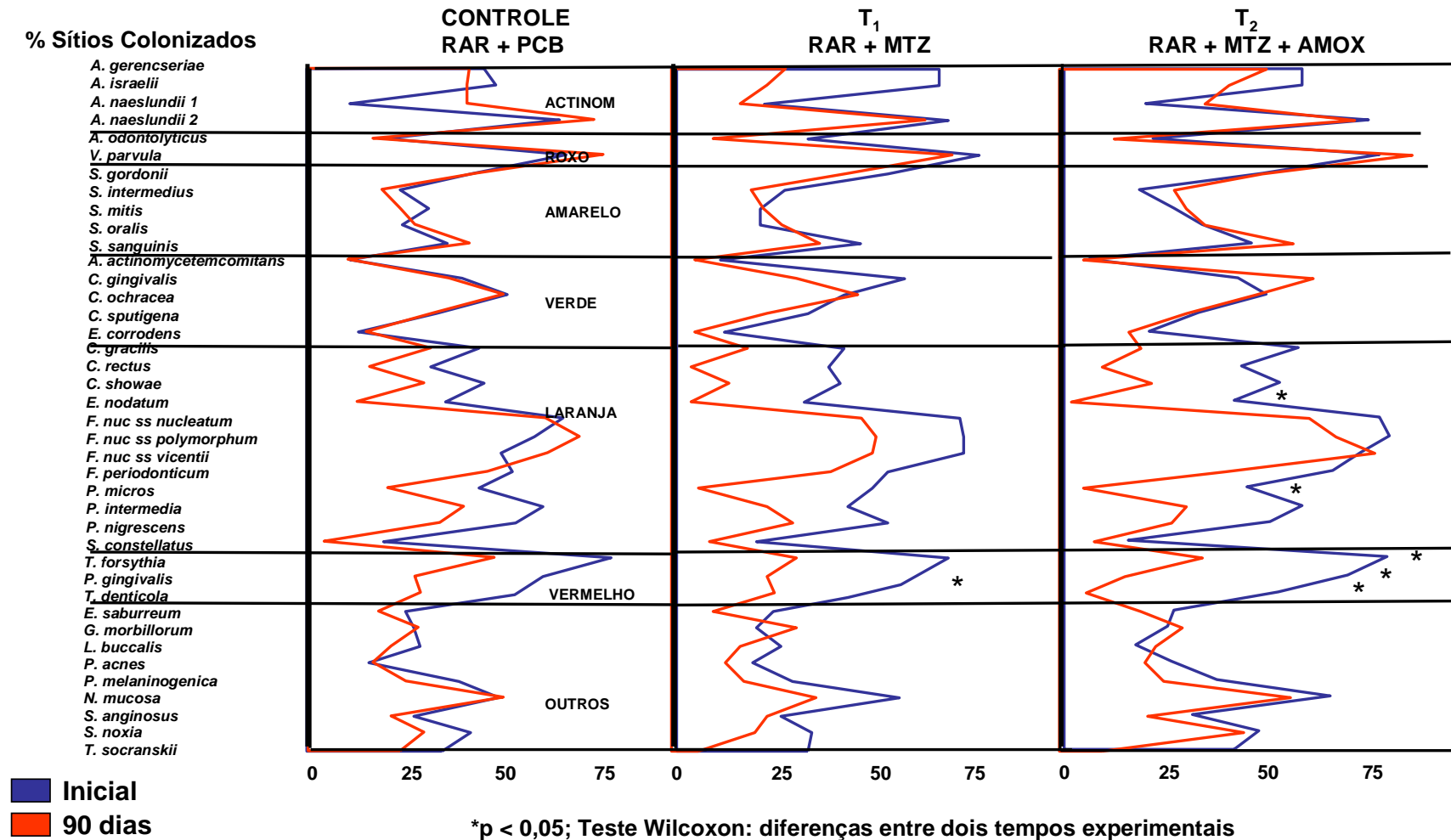


Figura 18. Perfil microbiano das médias de prevalência (%) de sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de de boca toda, no início do estudo e 90 dias pós-terapia, nos três grupos terapêuticos. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (*p<0,05). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

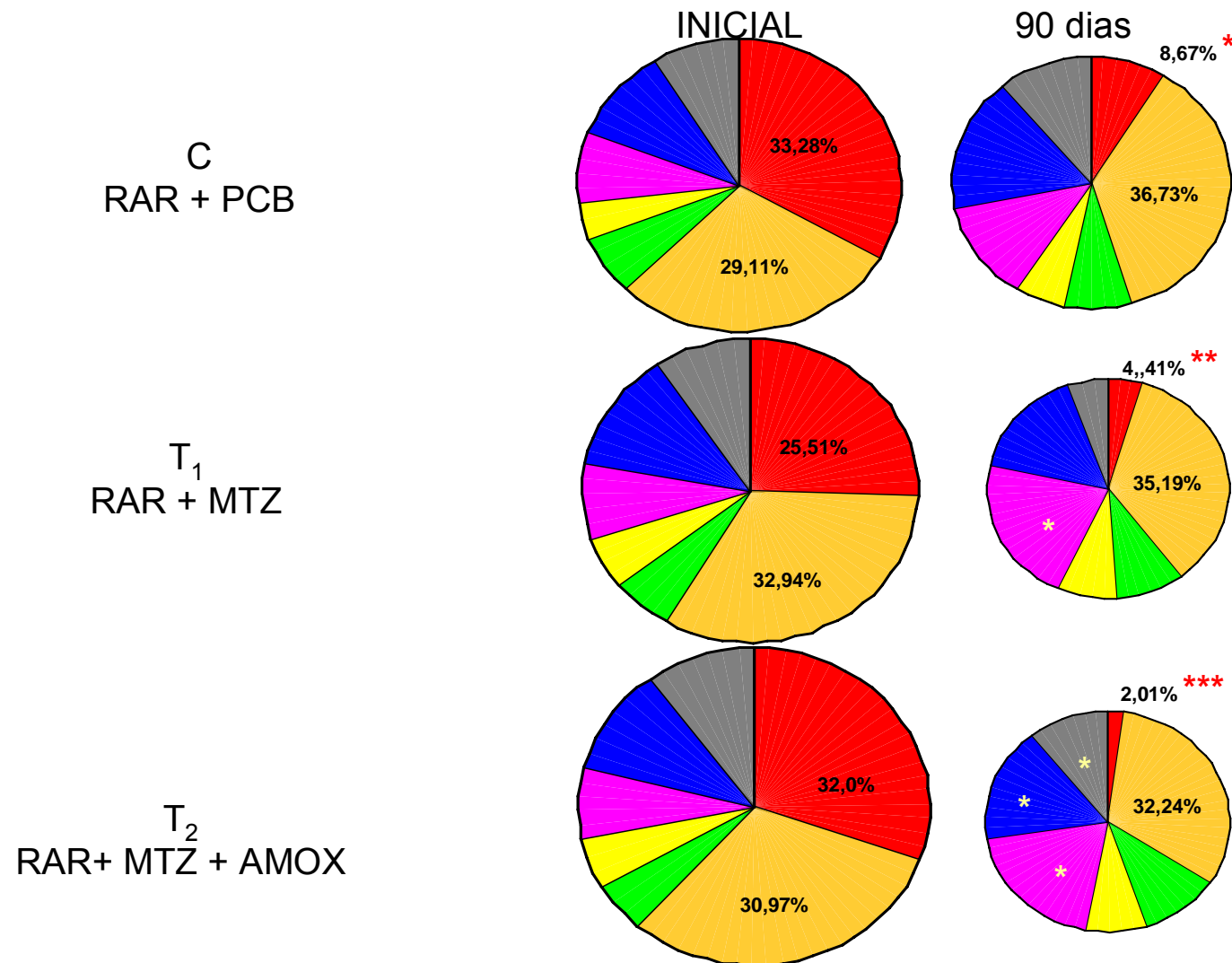


Figura 19. Proporções dos complexos microbianos no início do estudo e 90 dias pós-terapia nas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos dos três grupos terapêuticos. As áreas dos gráficos foram ajustadas para refletir a quantidade total de microrganismos em cada grupo terapêutico, nos dois tempos experimentais. RAR: raspagem e alisamento radicular; PCB: placebo; MTZ: metronidazol; AMOX: amoxicilina. Teste Wilcoxon (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

5. DISCUSSÃO

O crescente interesse em se definir terapias periodontais mais efetivas para fumantes está relacionado ao fato desses indivíduos não responderem satisfatoriamente às terapias mecânicas tradicionais, como a RAR (Preber & Bergström, 1985; MacFarlane *et al.*, 1992; Haber *et al.*, 1993; Bergström & Preber, 1994; Kaldahl *et al.*, 1996; Grossi *et al.*, 1996; Haffajee *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999; Winkel *et al.*, 2001; Van der Velden *et al.*, 2003; Mascarenhas *et al.*, 2005). A associação de antibióticos sistêmicos à RAR leva a efeitos clínicos e microbiológicos benéficos no tratamento de diversas formas de doenças periodontais, incluindo a periodontite crônica (Gusberti *et al.*, 1988; Loesche *et al.*, 1992; Winkel *et al.*, 1997; Winkel *et al.*, 1998; Serino *et al.*, 2001; Feres *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004; Carvalho *et al.* 2005). Esta combinação de terapias pode ser particularmente favorável a grupos de risco à doença periodontal, como os fumantes (Winkel *et al.*, 2001; Mascarenhas *et al.*, 2006).

O presente estudo avaliou os efeitos da RAR, associada ou não ao metronidazol ou ao metronidazol e à amoxicilina, em um grupo de fumantes com periodontite crônica. A RAR foi escolhida como terapia controle por ser um procedimento comprovadamente efetivo no tratamento da doença periodontal (Lindhe *et al.*, 1983; Haffajee *et al.*, 1997; Cugini *et al.*, 2000). As duas terapias adjuntas à RAR, metronidazol ou metronidazol em combinação com a amoxicilina, também foram selecionadas com base em estudos anteriores que sugeriram a efetividade clínica e microbiológica desses antibióticos sistêmicos no tratamento periodontal (Gusberti *et al.*, 1988; Loesche *et al.*, 1992; Berglundh *et al.*, 1998; Winkel *et al.*, 1997; Winkel *et al.*, 1998; Serino *et al.*, 2001; Feres *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004; Carvalho *et al.* 2005). A amoxicilina sistêmica, associada à RAR, também parece levar a resultados clínicos e microbiológicos benéficos em indivíduos com periodontite crônica (Feres *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002). No entanto, a combinação da RAR apenas à amoxicilina não foi avaliada no presente estudo pelo fato desta terapia ter um efeito menos eficaz e duradouro nos patógenos periodontais do que quando se utiliza o metronidazol (Feres *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002) ou se associa estes dois antibióticos (Rooney *et al.*, 2002).

Foram incluídos no presente estudo indivíduos considerados fumantes pesados, ou seja, que fumavam no mínimo 10 cigarros por dia há pelo menos 5 anos (Ammenheuser *et al.*, 1997). Martinez-Canut *et al.* (1995) demonstraram que o número de cigarros consumidos é diretamente proporcional à severidade da doença periodontal e que esta associação só é observada clinicamente a partir do consumo de 10 cigarros por dia.

5.1. Aspectos clínico-periodontais

Apesar de todas as terapias terem levado a uma redução significativa nas médias de boca toda dos parâmetros de PS e NCI, e no percentual de sítios exibindo placa (Figura 5), os grupos que receberam antibióticos sistêmicos como parte da terapia mostraram as maiores reduções nesses parâmetros (Figura 6). Esse efeito benéfico foi ainda mais evidente no grupo T₂. Outros estudos também sugeriram efeitos clínicos benéficos adicionais à RAR quando indivíduos com periodontite crônica são tratados com RAR e metronidazol sistêmico (Winkel *et al.*, 1997; Söder *et al.*, 1999; Feres *et al.*, 2001; Rooney *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2004), ou com metronidazol e amoxicilina (Berglundh *et al.*, 1998; Winkel *et al.*, 1998; Winkel *et al.*, 2001; Serino *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002). Winkel *et al.* (2001) avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos do metronidazol e da amoxicilina associados à terapia mecânica, em 32 indivíduos fumantes e 17 não-fumantes com periodontite avançada. Os autores relataram uma maior redução na PS e no percentual de sítios com SS, e um maior ganho de inserção no grupo de fumantes que recebeu os antibióticos do que naqueles que receberam apenas a terapia mecânica.

Os resultados também mostraram uma redução significativa no percentual de sítios exibindo SS nos grupos T₁ e T₂, o que não foi observado no grupo C (Figura 5). Essas reduções no percentual de sítios com SS nos grupos-teste, significativamente superiores às observadas no grupo que só recebeu RAR já haviam sido relatadas por outros autores em populações compostas por fumantes e não-fumantes (Feres *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004). O SG foi significativamente reduzido apenas no grupo que ingeriu o metronidazol. É importante ressaltar que em indivíduos fumantes, os parâmetros de SG e SS estão normalmente diminuídos em relação aos não-fumantes (Lie *et al.*, 1998; Boström *et al.*, 2001; Haffajee & Socransky, 2001a; Calsina *et al.*, 2002; Dietrich *et al.*, 2004;

Shimazaki *et al.*, 2006). Este fato ocorre devido a vasoconstrição e a resposta inflamatória diminuída causada pelo tabaco no tecido gengival (Mirbod *et al.*, 2001). Sendo assim, apesar de, em não-fumantes, a ausência de sangramento sinalizar estabilidade periodontal (Lang *et al.*, 1990), em fumantes esses parâmetros devem ser considerados com cautela, pois a ausência do sangramento pode representar um resultado falso-negativo.

Todas as terapias diminuíram significativamente, e de forma similar, o percentual de sítios exibindo placa visível (Figura 5 e 6). O fato do controle do biofilme supra-gengival ter sido efetuado, de forma aparentemente homogênea pelos indivíduos dos três grupos terapêuticos, reduz a possível influência desta variável na efetividade das terapias testadas.

Quando os sítios foram subdivididos de acordo com a PS inicial em rasos ($PS \leq 3\text{mm}$), moderados ($PS 4-6\text{mm}$) ou profundos ($PS \geq 7\text{mm}$), apesar de todos os grupos terem mostrado melhoras clínicas, (Figuras 8 a 13), as terapias que envolveram o uso dos antibióticos foram mais efetivas em reduzir PS e NCI do que a terapia de RAR somente (Figuras 11, 12 e 13). Os sítios inicialmente rasos foram beneficiados pelas terapias antimicrobianas, uma vez que esses sítios não mostraram perda de inserção, e obtiveram um maior ganho na PS nos grupos T_1 e T_2 , em comparação ao grupo controle. A ligeira perda de inserção observada nos sítios com $PS \leq 3\text{mm}$ no grupo controle está de acordo com outros estudos que mostraram que bolsas rasas tendem a apresentar uma ligeira perda de inserção após a RAR (Kaldahl *et al.*, 1993; Heitz-Mayfield *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004).

Nas bolsas inicialmente moderadas a combinação do metronidazol e da amoxicilina mostrou ser superior, inclusive à terapia com metronidazol. O fato dos indivíduos do grupo T_2 terem mostrado, nessa categoria de bolsa, um ganho na PS similar ao grupo T_1 , porém um maior ganho de inserção, sugere que a terapia combinada promoveu menos recessão gengival do que as demais. Uma vez que cada cigarro extra consumido diariamente pode aumentar a recessão gengival em 2,3%, a PS em 0,3% e o NCI em 0,5% (Martinez-Canut *et al.*, 1995), uma terapia que resulte em menos recessão gengival é desejada, por deixar menos seqüelas da doença.

As bolsas profundas foram as que mostraram as maiores reduções nas médias de PS e NCI, sendo que essas reduções também foram significativamente mais pronunciadas nos grupos T_1 e T_2 . Esses resultados corroboram com outros

estudos que mostraram o efeito clínico benéfico da associação de metronidazol e/ou amoxicilina à RAR em bolsas moderadas e profundas (Winkel *et al.*, 2001; Feres *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2004).

5.2. Aspectos microbiológicos

Os poucos estudos que avaliaram o efeito do metronidazol somente ou em combinação com a amoxicilina sistêmicos na terapia periodontal de fumantes com periodontite crônica, realizaram uma avaliação microbiológica limitada nesses indivíduos, examinando no máximo 6 espécies bacterianas utilizando métodos de microscopia de campo escuro (Palmer *et al.*, 1999) ou de cultura bacteriana (Söder *et al.*, 1999; Winkel *et al.*, 2001). Ao nosso conhecimento, essa é a primeira investigação que avaliou sistematicamente os efeitos do metronidazol e da amoxicilina na composição da microbiota subgengival de indivíduos fumantes. A utilização do *checkerboard DNA-DNA hybridization* permitiu uma avaliação detalhada do efeito das diferentes terapias aqui empregadas na microbiota subgengival desses indivíduos.

Todas as terapias testadas neste estudo afetaram a microbiota subgengival de indivíduos fumantes com periodontite crônica, 90 dias após o tratamento. Porém, o grupo que recebeu a combinação dos 2 antibióticos apresentou as alterações microbiológicas mais benéficas. Os indivíduos do grupo T₂ mostraram uma redução mais efetiva nos níveis, proporções e no percentual de sítios colonizados pelos 3 patógenos do complexo vermelho, *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, seguido pelo grupo T₁, que recebeu o metronidazol (Figuras 14 a 18). Esses resultados estão de acordo com outros estudos que também demonstraram uma maior efetividade sobre os patógenos do complexo vermelho quando o metronidazol e/ou a amoxicilina foram utilizados em indivíduos fumantes e não-fumantes com periodontite crônica (Berglundh *et al.*, 1998; Winkel *et al.*, 1997; Winkel *et al.*, 1998; Winkel *et al.*, 2001; Feres *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002; Carvalho *et al.* 2005).

A terapia que utilizou apenas a RAR teve uma ação limitada na redução das espécies do complexo vermelho, tendo reduzido significativamente apenas as proporções de *T. forsythia*, principalmente em bolsas rasas (Figuras 15 e 16). As bolsas moderadas e profundas do grupo controle não sofreram redução significativa dessas 3 espécies (Figura 17). A falta de efetividade da terapia mecânica em reduzir patógenos periodontais em indivíduos fumantes já foi relatada por outros

autores (Haffajee *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 1999; Winkel *et al.*, 2001; Van der Velden *et al.*, 2003; Mascarenhas *et al.*, 2005).

A maioria das espécies do complexo laranja não foi afetada pela RAR (Figuras 14-18), e algumas dessas espécies mostraram inclusive um aumento em níveis, proporções e prevalência após a terapia, principalmente as espécies de *Fusobacterium*. Já os antibióticos sistêmicos mostraram uma maior efetividade sobre alguns microrganismos do complexo laranja comparados à RAR somente. As espécies mais afetadas foram *E. nodatum*, *P. micros*, *C. rectus* e *F. nucleatum* ssp *polymorphum*. *E. nodatum*, que no presente estudo foi efetivamente reduzido em níveis, proporções e prevalências no grupo T₂, foi recentemente associado à etiologia da doença periodontal crônica em indivíduos americanos (Haffajee *et al.*, 2006) e brasileiros (Colombo *et al.*, 2002). Essa espécie mostrou associação com medidas de PS, NCI ou SUP, sugerindo que a sua supressão pode ser importante para o sucesso da terapia periodontal.

Vale ressaltar que apesar da terapia combinada (grupo T₂) ter sido a que melhor afetou os níveis de alguns patógenos do complexo laranja (Figura 14), nenhum dos 3 tratamentos alterou de forma efetiva as proporções desse grupo de espécies (Figuras 15-17, 19). Esses dados diferem daqueles observados em indivíduos não-fumantes. Carvalho *et al.* (2005) e Feres *et al.* (2001), também utilizando a técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization*, avaliaram o efeito do metronidazol ou da amoxicilina sistêmicos em indivíduos com periodontite crônica, em grupos experimentais compostos majoritariamente por não-fumantes. Os autores observaram que aos 3 meses pós-terapia o grupo laranja manteve-se em proporções similares ou ligeiramente menores do que as observadas no início dos estudos em indivíduos que receberam metronidazol (Feres *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2005) ou amoxicilina (Feres *et al.*, 2001) associados à RAR. Já no presente estudo as proporções do complexo laranja sofreram aumento aos 3 meses pós-terapia nos 3 grupos experimentais, tendo sido mais pronunciado no grupo C, seguido do grupo T₁ e do grupo T₂ (Figura 15). Logo, pode-se levantar a hipótese de que a dificuldade em suprimir os microrganismos do complexo laranja, que precedem a colonização das espécies do complexo vermelho, pode estar relacionada à dificuldade em se tratar e manter com eficácia os indivíduos fumantes.

Várias espécies consideradas benéficas estavam elevadas após os diferentes tratamentos. As proporções do complexo roxo e de membros do gênero

Actinomyces mostraram uma tendência a aumentar 3 meses após as terapias. Esse aumento foi mais evidente nos 2 grupos que receberam antibióticos como parte da terapia inicial, que tiveram aumento também em algumas espécies benéficas de *Capnocytophaga* (Figuras 15 a 17, 19). Nos sítios inicialmente profundos (Figura 17) a terapia com metronidazol aumentou significativamente as proporções de 2 espécies de *Actinomyces*, *A. naeslundii* sorotipo 1 e *A. odontolyticus*; e a RAR aumentou significativamente as proporções de *A. naeslundii* sorotipo 2. A terapia que associou o metronidazol, a amoxicilina e a RAR, apesar de ter elevado as proporções de várias espécies de *Actinomyces*, essas alterações não foram significativas. Porém, quando as proporções de todas as espécies de *Actinomyces* foram avaliadas conjuntamente, o grupo T₂ foi o único que mostrou aumento significativo neste grupo de bactérias, o complexo azul (Figura 19).

Os resultados do presente estudo mostraram que a utilização de antibióticos sistêmicos no tratamento de indivíduos fumantes com periodontite crônica leva a efeitos benéficos adicionais aos observados com a terapia de RAR somente. É importante destacar que aos 90 dias após as terapias os melhores resultados nos parâmetros clínicos de infecção periodontal, e principalmente, na composição da microbiota subgengival, ocorreram no grupo que recebeu a combinação dos dois antibióticos. O acompanhamento longitudinal dos indivíduos deste estudo será fundamental para avaliar a manutenção destes resultados benéficos da terapia antimicrobiana ao longo do tempo.

6. CONCLUSÃO

A associação do metronidazol e, principalmente, do metronidazol e da amoxicilina à RAR levam a benefícios clínicos e microbiológicos na terapia de indivíduos fumantes com periodontite crônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

Ah MK, Johnson PJ, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwarf KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 1994; 21(2): 91-97.

Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2002; 29; 177-206.

American Academy of Periodontology, The. 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions. *Ann of Periodontol*. 1999; 4(1):38.

Ammenheuser MM, Hastings DA, Whorton Jr EB, Ward Jr JB. Frequencies of hrpt mutant lymphocytes in smokers, non-smokers and former smokers. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30: 131-8.

Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005; 32:973-83.

Armitage GC, Dickinson WR, Jenderseck RS, Levine SM, Chambers DW. Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J Periodontol*. 1982; 53: 550-6.

Ávila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Specific primer for AP-PCR identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*. 1999; 26: 699-704.

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

Bergström J. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1989; 17:245-7.

Bergström J, Preber H. Tobacco use as a risk factor, *J Periodontol*. 1994; 65: 545-50.

Blandizzi C, Malizia T, Lupetti A, Pesce D, Gabriele M, Giuca MR *et al*. Periodontal Tissue disposition of azithromycin in patients affected by chronic inflammatory periodontal diseases. *J Periodontol*. 1999; 70:960-6.

Boström L, Bergström J, Dahlén G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 212-9.

Calsina G, Ramón J-M, Echeverría J-J. Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 771-6.

Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky, SS, Feres, M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. I. clinical results. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:1070-6.

Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Goncalves C, Haffajee AD, Socransky SS *et al.* Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II - microbiological results. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 406-11.

Checci L, Ciapetti G, Monaco G, Ori G. The effects of nicotine and age on replication and viability of human gingival fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 636-42.

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

Colombo APV, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém Jr W, Mendes MCS *et al.* Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2002; 73:360-9.

Cruz, SEB. Avaliação clínica e microbiológica de indivíduos tabagistas e não-tabagistas com periodontite crônica (tese). Guarulhos: UNG; 2006.

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

Dietrich T, Bernimoulin JP, Glynn RJ. The effect of cigarette smoking on gingival bleeding. *J Periodontol.* 2004; 75:16-22.

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

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.

- Feres M, Haffajee AD, Goncalves C, Allard K, Som S, Smith C *et al.* Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections. I. Effect on the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 775-83.
- Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996; 67:1041-9.
- Gomes SG, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R *et al.* Periodontal status in smokers and never-smokers: Clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2006; 77: 1483-1490.
- Gusberti FA, Syed SA, Lang NP. Combined antibiotic (metronidazole) and mechanical treatment effects on the subgingival bacterial flora of sites with recurrent periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1988; 15: 353-359.
- Grossi SG, Skepcinski FB, DeCaro T, Zambon JJ, Cummins D, Genco RJ. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J Periodontol.* 1996; 67:1094-102.
- Gursky LC; Faveri M, Figueredo LC, Feres M, Araujo MWB. Reprodutibilidade de parâmetros clínicos periodontais: erro intra- e inter-examinadores. *Revista Paulista de Odontologia.* No prelo 2005.
- Harber J. Cigarette smoking: a major risk factor for periodontitis. *Compend Contin Educ. Dent.* 1994; 15(8): 1001-14.
- Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 324-34.
- Haffajee AD, Dibart S, Kent RL Jr, Socransky SS. Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctively administered agents in the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 618-627.
- Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol.* 2001a; 28: 283-95.
- Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2001b; 28:377-88
- Haffajee AD, Teles R, Socransky SS. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 269-82.

- Hanioka T, Tanaka M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukuishi S. Pocket oxygen tension in smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Periodontol.* 2000; 71: 550-4.
- Heitz-Mayfield LJA, Trombelli L, Heitz F, Needleman I, Moles D. A systematic review of the effect of surgical debridement vs. Non-surgical debridement for the treatment of chronic periodobtitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 (Suppl. 3): 92-102.
- Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol.* 2004; 75:196-209.
- Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol.* 1993; 64: 243-53.
- Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1996; 67:675-81.
- Kim J-S, Park JY, Chung W-Y, Choi M-A, Cho K-S, Park K-K. Polymorphism in genes coding for enzymes metabolizing smoking-derived substances and the risk of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:959-964.
- Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol.* 1990; 17:714-721.
- Lie MA, Timmermann MF, van der Weijden GA. Evaluation of two methods to assess gingival bleeding in smokers and non-smokers in natural and experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 695-700.
- Lindhe J, Liljenberg B, Adielson B, Borjesson I. Use of metronidazole as a probe in the study of human periodontal disease. *J Clin Periodont.* 1983; 10:110-2.
- Listgarten MA, Hellden L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J clin Periodont.* 1978; 5(2): 115-132.
- Löe H, Theilade E, Jensen, SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965; 36:177-87.
- Löe H, Theilade E, Jensen, SB, Schiott CR. Experimental gingivitis in man. III. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontol Res.* 1967; 2 (4):282-9.
- Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarez J, Smith BA. Metronidazole in periodontitis:reduced need for surgery. *J Clin Periodont.* 1992; 19: 103-112.

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

MacFarlane G, Herzberg M, Wolff L, Hardie N. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leucocyte phagocytosis and cigarette smoking. *J Periodontol.* 1992; 71:73-8.

Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Hill R, Sohren S, Fenno JC *et al.* Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. *J Periodont.* 2005; 76: 426-36.

Mavropoulos A, Aars H, Brodin P. The acute effects of smokeless tobacco (snuff) on gingival blood flow in man. *J Periodont Res.* 2001; 36: 221-6.

Martinez-Canut P, Lorca A, Magan R. Smoking and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1995; 22:743-9.

Meisel P, Schwahn C, Gesch D, Bernhart O, John U, Kocher T. Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in Periodontal disease. *J Periodontol.* 2004; 75:236-242.

Mirbod SM, Ahing SI, Pruthi VK. Immunohistochemical study of vestibular gingival blood vessels density and internal circumference in smokers and non-smokers. *J Periodontol.* 2001; 72: 1318-23.

Nakamura T, Ono K, Honda E, Yokota M, Inenaga K. Central nicotinic stimulation reduces vascular conductance in the gingiva in anesthetized rats. *J Periodont Res.* 2005; 40:67-72

Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontitis. *J Periodont Res.* 1977; 12: 120-8.

Newman MG, Socransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A. Studies of the microbiology of periodontitis. *J Periodontol.* 1976; 47:373-9.

Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal disease. *Int Dent J.* 1997; 47:61-87.

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

Palmer RM, Scott DA, Meekin TN, Wilson RF, Poston RN, Odell EW. Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. *J Periodont Res.* 2000; 34: 363-9.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl. 6): 180-95.

Papantonopoulos G. Effect of periodontal therapy in smokers and non-smokers with advanced periodontal disease: results after maintenance Therapy for a minimum of 5 years. *J Periodontol.* 2004; 75: 839-843.

Preber H, Bergström J. The effect of non-surgical treatment on periodontal pockets in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol.* 1985; 13: 319-23.

Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontol.* 2000. 2003; 32:50-8.

Rooney J, Wade WG, Sprague SV, Newcombe RG, Addy M. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 342-350.

Rodrigues RM, Goncalves C, Souto R, Feres-Filho EJ, Uzeda M, Colombo AP. Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(6): 420-7.

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

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

Sefton AM, Maskell JP, Beighton D, Whiley A, Shain H, Foyle D *et al.* Azithromycin in the treatment of periodontal disease. Effect on microflora. *J Clin Periodontol.* 1996; 23:998-1003.

Serino G, Rosling B, Ramberg P, Hellström M-K, Socransky SS, Lindhe J. The effect of systemic antibiotics in the treatment of patients with recurrent periodontitis. 2001; 28: 411-8.

Shimazaki Y, Toshiyuki S, Yutaka K, Isao K, Michiaki K. The influence of current and former smoking on gingival bleeding: the Hisayama study. *J Periodontol.* 2006; 77: 1430-5.

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

- Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*. 1989; 4: 47-51.
- Socransky SS & Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000. 2002; 28:12-55.
- Socransky SS & Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 135-87.
- Socransky SS, Haffajee AD. Microbiology of periodontal disease. *In: Lindhe J., Karring T., Lang N.P. editors. Clinical periodontology and implant dentistry. -4thed. Blackwell Munksgaard; 2003. p.106-149.*
- Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol*. 1994; 18: 688-93.
- 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, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sample sites. *J Clin Periodontol*. 1991; 18: 766-75.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994; 17: 788-92.
- Söder B, Nedlich U, Jin LJ. Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. *J Periodontol*. 1999; 70 (7): 761-71.
- Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunology*. 1998; 83: 148-156.
- Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aepli DM, Wolff LF *et al*. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol*. 1993; 64:1225-30.
- Thelaide E, Wright WH, Jensen SB, Löe H. Experimental gingivitis in man. II.A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodont Res*. 1966; 1: 1-13.
- Tomar SL, Ashma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol*. 2000; 71:743-51.
- Typton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblast in vitro. *J Periodontol*. 1995; 66:1056-1064.
- Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol*. 1998; 69:1111-8.

Van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(7): 603-10.

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Vangsted T, Van der Velden U. Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 573-579.

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 857-864.

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

Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol.* 1996; 67: 1050-4.

ANEXO

ANEXO A



Guarulhos, 23 de junho de 2005.

Exma. Sra.
Profª. Magda Gomes Feres

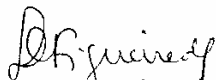
Referência: **Aprovação de Projeto**

SISNEP/61 - "Avaliação clínica e microbiológica da combinação de Metronidazol e Amoxicilina de uso sistêmico em indivíduos fumantes com periodontite crônica"

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Avaliação clínica e microbiológica da combinação de Metronidazol e Amoxicilina de uso sistêmico em indivíduos fumantes com periodontite crônica" - SISNEP/61, na reunião de 23.06.2005, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**.

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

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando receber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclarecemos a necessidade da apresentação de relatório de andamento até **01 de junho de 2006** e relatório final até **01 de agosto de 2007**.


Luciene Cristina de Figueiredo
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa

ANEXO B



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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 _____,
 _____, telefone _____,
 na cidade de _____, Estado de _____,

concordo em participar dessa pesquisa – AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO DO METRONIDAZOL E AMOXICILINA DE USO SISTÊMICO EM INDIVÍDUOS FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA. Estou ciente que essa pesquisa pretende estudar o efeito do uso de antibióticos (metronidazol e amoxicilina) associados ao tratamento tradicional de raspagem na eliminação da doença periodontal. A doença periodontal é a inflamação das gengivas e pode levar até a perda dos dentes. É causada pela presença de placa dentária, uma camada localizada na superfície dos dentes e composta por microrganismos (bactérias) que causam a inflamação das gengivas. Para participar desse estudo é necessário ser fumante e 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 quatro exames completos dos dentes e das gengivas que serão efetuados por profissionais formados em Odontologia, sob a supervisão de professores na Clínica Odontológica da UnG. Os exames serão realizados antes e após o tratamento da inflamação das gengivas. Nesta oportunidade, amostras de placa dentária serão coletadas por meio de curetas odontológicas estéreis 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) sob anestesia local, e uso de antibióticos diários (metronidazol 3x/dia e amoxicilina 3x/dia) que ajudam na eliminação dos microrganismos (germes) presentes na placa dentária causadora das doenças nas gengivas.

Guarulhos, ____ de _____ de 200 ____.

 Assinatura do Voluntário
 Pesquisador Responsável

 Dra. Magda Feres – CRO-SP 77.854

(continuação)

Alguns sintomas como enjôo, dor de cabeça, gosto ruim na boca podem aparecer por causa do uso do antibiótico. Neste caso, o medicamento poderá ser suspenso imediatamente sem prejuízo do tratamento básico da doença periodontal. Caso alguma voluntária fique grávida, ela será imediatamente afastada do estudo e o uso do antibiótico será interrompido, sem nenhum prejuízo ao tratamento.

Os indivíduos participantes do estudo receberão os medicamentos além da raspagem dos dentes, no entanto alguns receberão os antibióticos metronidazol e amoxicilina e outros receberão os chamados “antibióticos placebo” – sem a substância química ativa. Essa escolha será realizada ao acaso, e durante a realização do estudo o participante não poderá ser informado sobre qual medicamento recebeu, pois isto comprometeria os resultados.

Estes procedimentos são simples, além de serem completamente indolores. O estudo terá uma duração de aproximadamente 24 meses e envolverá várias consultas (12 visitas em média) de aproximadamente 1 hora. Indivíduos que necessitarem de outros tratamentos serão encaminhados às diferentes especialidades na Clínica de Graduação após a conclusão deste estudo.

Recebi todas as informações sobre a minha participação nesse estudo, e a garantia de novos esclarecimentos que julgar necessários durante o decorrer da pesquisa. Também fui verbalmente informado sobre os possíveis benefícios e riscos, assim como, todos os passos desse experimento serão acompanhados por um Pesquisador Responsável. Os procedimentos são simples, não oferecem risco diferente de um tratamento odontológico comum 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. Recebi a garantia do sigilo que assegura a privacidade dos participantes do estudo, uma vez que os dados obtidos são confidenciais.

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

Guarulhos, ____ de _____ de 200 _ .

Assinatura do Voluntário

Dra. Magda Feres – CRO-SP 77.854
Pesquisador Responsável

Endereço para contato com o Pesquisador Responsável:
Universidade Guarulhos – Rua Nilo Peçanha, 81. Centro. Guarulhos –SP.
Telefone: 6464-1769 ou 9222-3239.