



GEISLA MARY SILVA SOARES

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA TERAPIA PERIODONTAL
MECÂNICA ASSOCIADA AO METRONIDAZOL E À AMOXICILINA
SISTÊMICOS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE
CRÔNICA GENERALIZADA**

Guarulhos

2012

GEISLA MARY SILVA SOARES

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA TERAPIA PERIODONTAL
MECÂNICA ASSOCIADA AO METRONIDAZOL E À AMOXICILINA
SISTÊMICOS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE
CRÔNICA GENERALIZADA**

Tese apresentada à Universidade
Guarulhos para obtenção do título de
Doutor em Odontologia
Área de concentração: Periodontia.

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

Guarulhos

2012

S228a SOARES, Geisla Mary Silva
Avaliação longitudinal da terapia periodontal mecânica associada ao metronidazol e à amoxicilina sistêmicos em indivíduos com periodontite crônica generalizada. / Geisla Mary Silva Soares. Guarulhos, 2012.
109 f. : il. ; 31 cm

Dissertação (Doutorado em Odontologia) - Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, 2012.
Orientador: Prof. Dra: Magda Feres
Bibliografia: f.

1. periodontite crônica. 2. metronidazol. 3. amoxicilina. 4. terapia periodontal. I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 22st 617.6



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA TERAPIA PERIODONTAL MECÂNICA ASSOCIADA AO METRONIDAZOL E À AMOXICILINA SISTÊMICOS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA GENERALIZADA" em sessão pública realizada em 29 de Junho de 2012 considerou a candidata Geisla Mary Silva Soares aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Magda Feres (UnG)

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

2. Prof. Dr. Ricardo Palmier Teles (Forsyth Institute)

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Ricardo Palmier Teles', written over a horizontal line.

3. Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito (FOUSP)

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Giuseppe Alexandre Romito', written over a horizontal line.

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

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

5. Prof. Dr. Leandro Chambrone (UnG)

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

Guarulhos, 29 de Junho de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Aprígio e Bárbara, pessoas que mais amo e admiro, a quem devo toda minha educação e formação, meus exemplos de fé, determinação, honestidade e integridade. Minha mãe, meu céu aberto e meu pai, meu porto seguro!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e por guiar meus passos, minha mente e coração.

Aos meus pais, por me apoiarem nos meus sonhos e me ajudarem a alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos, Emerson, Bárbara e Géser, pela amizade, conselhos, apoio e confiança. Aos meus cunhados, Silviane, Lincoln e Carolina, que como irmãos me apoiaram.

Às minhas princesas Rebeca, Laura, Malu, Daniela e Maria Beatriz, minhas sobrinhas amadas, por fazerem parte da minha vida.

Agradeço à minha orientadora, professora Magda Feres, pelos ensinamentos, orientação e ajuda durante todos esses anos. Agradeço por todo tempo a mim dedicado. Pela confiança e pelas oportunidades. Exemplo de pessoa, profissionalismo e competência.

A minha co-orientadora, professora Luciene Figueiredo, por toda ajuda e dedicação.

Ao professor Marcelo de Faveri, agradeço pela ajuda e amizade, fundamentais em vários momentos.

À professora Poliana Duarte, exemplo de pesquisadora. Obrigada por seus conselhos e amizade.

Aos demais professores, Marta Bastos, Cláudia Ota, Jamil Shibli, Alessandra Acaçoni, André Reis, José Augusto Rodrigues e César Arrais que com muita dedicação e profissionalismo em muito contribuíram nestes anos de formação.

Aos professores do Instituto Forsyth, Ricardo Teles e Flávia Teles. Minha imensa admiração. Obrigada pela oportunidade. Sinto-me privilegiada por ter aprendido com vocês.

Ao professor Sigmund Socransky (in memoriam) agradeço pelos poucos e rápidos encontros, mas que valerão para uma vida. Exemplo de genialidade e profissionalismo.

Ao professor Ricardo Grein, meu primeiro e sempre professor de periodontia. Minha gratidão e admiração.

À Izilvânia, bióloga responsável pela parte laboratorial da pesquisa, muito obrigada por seu trabalho e dedicação. Sempre calma e querida!

Às técnicas do Instituto Forsyth, Lynn Martin, Michele Patel e Tina Yaskell, que me receberam com carinho e paciência. Por tudo que me ensinaram e me ajudaram, muito obrigada!

À Cintia, auxiliar da clínica, que em muito me ajudou a manter nossos pacientes.

Às amigas, colegas de turma, Vanessa e Kelly. Em conversas ou pequenas mensagens, contribuíram para que esses anos de estudo também fossem de alegria e conquistas.

Aos colegas de turma, Diogo, Antonio Carlos, Ennyo, Maurilo e Diego. Fizeram parte desse período de aprendizado e trabalho. Agradeço pela amizade e alegria de estarmos juntos.

À Josefa e Joyce, amigas, colegas e que se tornaram parte da minha família, meu muito obrigada! Jô, um pouco mãe e muito amiga, agradeço pela amizade, carinho, pelo exemplo de coragem e força; Joyce, amiga de todos os momentos, sempre querida, me incentivando e animando!

À Juliana, amiga e dupla de pesquisa. Obrigada por tantos dias de trabalho e de alegrias juntas. Somente com sua ajuda foi possível realizarmos tamanho trabalho.

À Regina e aos demais funcionários que garantiram a limpeza e o bom andamento da clínica.

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

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

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos da parte de doutorado sanduiche no Instituto Forsyth, Processo nº 4986/10-5.

Aos pacientes voluntários, fundamentais para realização desta pesquisa.

Muito Obrigada a todos!!!!

*“A verdadeira viagem do descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens,
e sim em ter novos olhos.”
(Marcel Proust)*

RESUMO

O objetivo do presente estudo clínico cego, aleatorizado e placebo-controlado foi avaliar os efeitos clínicos da raspagem e alisamento radicular (RAR) combinada a antibióticos sistêmicos (metronidazol ou metronidazol/amoxicilina) no tratamento de indivíduos com periodontite crônica. O objetivo secundário foi avaliar a possibilidade de efeitos adicionais do uso prolongado da clorexidina, quando adicionada à essas terapias. Cento e dezoito indivíduos foram aleatoriamente distribuídos em três grupos terapêuticos: controle (n=40): RAR; Teste 1 (n=39): RAR + metronidazol sistêmico (400mg) 3x/dia por 14 dias (MTZ); Teste 2 (n=39): RAR+MTZ + amoxicilina sistêmica (500mg) 3x/dia por 14 dias (AMX). Metade dos indivíduos de cada grupo ainda bochecharam solução de clorexidina 0,12% 3x ao dia durante 2 meses. Os indivíduos foram monitorados clinicamente no início, 3, 6 e 12 meses pós-terapia. Os parâmetros clínicos avaliados em 6 sítios por dente foram: profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração. Os dois grupos que receberam antibioticoterapia mostraram menores média de números de sítios com profundidade de sondagem (PS) ≥ 5 mm e poucos indivíduos apresentaram ≥ 9 desses sítios 1 ano pós-terapia. A análise de regressão logística mostrou que os antibióticos foram os únicos preditores significativos para os indivíduos que apresentaram ≤ 4 sítios com PS ≥ 5 mm em 1 ano pós-terapia. MTZ+AMX: OR, 13.33; 95%CI, 3.75-47.39/p=0.0000; MTZ: OR, 7.26; 95%CI, 2.26-23.30/p=0.0004). A frequência de efeitos adversos não diferiu entre os dois tratamentos com antibioticoterapia (p> 0,05). Os subgrupos que bochecharam clorexidina mostraram uma tendência (p> 0,05) de apresentar menor número de sítios residuais ≥ 5 mm em comparação com os subgrupos que receberam placebo. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre perfis microbiológicos dos três grupos terapêuticos no início do estudo. Entretanto, 12 meses após tratamento os patógenos do complexo vermelho estavam em níveis e proporção estatisticamente mais baixos nos dois grupos testes, em comparação com o grupo controle. Além disso, os antibióticos sistêmicos, especialmente a associação MTZ+AMX, levou a um aumento mais específico nas proporções de espécies bacterianas compatíveis com o hospedeiro (p<0,05). Assim, o tratamento da periodontite crônica é significativamente melhorado pelo uso de adjuvante MTZ e MTZ + AMX.

Palavras-chave: periodontite crônica, metronidazol, amoxicilina, terapia periodontal.

ABSTRACT

The aim of the present blind, randomized and placebo-controlled clinical trial was to evaluate the clinical effects of scaling and root planing (SRP) associated to systemic antibiotics (metronidazole/amoxicillin or metronidazole) in the treatment of subjects with chronic periodontitis. A secondary aim was to examine a possible added effect of chlorhexidine to these therapies. One hundred and seventeen subjects were randomly assigned to three therapeutic groups: control (n=40): SRP, Test 1 (n=39): SRP+ systemic metronidazole (400mg) 3x/day for 14 days (MTZ); Test 2 (n=39): SRP+MTZ+ amoxicillin (500mg), 3x/day for 14 days (AMX). And a half of subjects used CHX rinsing 0.12% 2x/day during 2 months. The subjects were clinically monitored at baseline, 3, 6 and 12 months post-therapy. The clinical parameters evaluated at six sites per tooth were: probing depth, clinical attachment level, visible plaque, gingival bleeding, bleeding on probing and suppuration. The two antibiotic groups showed lower mean number of sites with probing depth (PD) ≥ 5 mm and fewer subjects exhibiting ≥ 9 of these sites at 1 year post-treatment. The logistic regression analysis showed that antibiotics were the only significant predictors for individuals who were ≤ 4 sites with PS ≥ 5 mm at 1 year after therapy. MTZ + AMX: OR, 13.33; 95% CI, 3.75-47.39 / $p = 0.0000$; MTZ: OR 7.26, 95% CI, 2:26 to 23:30 / $p = 0.0004$). The frequency of adverse effects did not differ between the two antibiotic treatments ($p > 0.05$). Subgroups of chlorhexidine showed a trend ($p > 0.05$) to show smaller number of residual sites ≥ 5 mm compared with the placebo subgroups. No statistically significant differences on the microbial profiles were observed between the three groups at baseline. However, at 12 months post-treatment the red complex pathogens were statistically significantly lower in counts and/or in proportions in the two test groups, in comparison with the control group. In addition, the systemic antibiotics, especially MTZ+AMX, elicited a more striking increase in the proportions of the host-compatible microbial species ($p < 0.05$). Thus, treatment of chronic periodontitis is significantly improved by the use of adjuvant MTZ and MTZ + AMX.

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

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Etiologia da doença periodontal	13
1.2	Terapia periodontal	16
1.2.1	Antibioticoterapia no tratamento periodontal	17
1.2.1.1	<i>Histórico</i>	17
1.2.1.2	<i>Metronidazol e Amoxicilina</i>	18
1.2.1.3	<i>Metronidazol associado à Amoxicilina</i>	21
1.2.2	Controle mecânico do biofilme supragengival	23
1.2.3	Controle químico do biofilme supragengival	24
2.	JUSTIFICATIVA	27
3.	PROPOSIÇÃO	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Cálculo da potência	29
4.2	Seleção dos indivíduos	29
4.3	Critérios de inclusão e exclusão	29
4.4	Delineamento experimental	30
4.5	Avaliação clínico-periodontal	31
4.6	Avaliação microbiológica	33
4.6.1	Seleção dos sítios-testes	33
4.6.2	Coleta das amostras de biofilme subgengival	33
4.6.3	Cepas bacterianas e condições de crescimento	34
4.6.4	Isolamento do DNA e preparo das sondas	35
4.6.5	<i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	36
4.6.6	Detecção das espécies	37
4.7	Procedimentos terapêuticos	40
4.7.1	Terapia periodontal básica	40
4.7.2	Administração de MTZ e AMX sistêmicos e placebos.....	41
4.7.3	Administração de bochecho com CLX e placebo	41
4.8	Análise estatística	42
4.8.1	Dados clínicos.....	42

4.8.2	Dados microbiológicos.....	43
	Capítulo 1. Artigo – Resultados clínicos	45
	CAPÍTULO 2 – Resultados microbiológicos	74
5.	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXOS.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Delineamento experimental.....	32
Figura 2	Representação gráfica do Minislot 30 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon (técnica checkerboard DNA-DNA hybridization).....	38
Figura 3	Representação gráfica do <i>Miniblotter</i> 45 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i>).....	39
Figura 4	Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i>).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (Socransky et al., 1998; Socransky & Haffajee, 2002).....	35
Tabela 2	Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival	39

1. INTRODUÇÃO

As periodontites são um grupo de infecções que desencadeiam um processo inflamatório nos tecidos de proteção e sustentação do elemento dental (LINDHE, 1997) e que possuem como fator etiológico primário as bactérias presentes na cavidade oral, especialmente as que colonizam as superfícies dos dentes supra e subgingivalmente, organizadas em um biofilme complexo (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994a). Encontradas na forma Crônica ou Agressiva, são também classificadas em localizadas e generalizadas de acordo com a extensão e a gravidade das lesões teciduais. As principais características clínicas são edema, vermelhidão gengival, sangramento à sondagem e destruição do periodonto de proteção e de sustentação dos dentes, causando uma perda progressiva de inserção, de tecido ósseo e, eventualmente, do elemento dentário (ARMITAGE, 1999).

A forma crônica das periodontites é a doença de origem bacteriana mais comum e a principal causa de perda dentária em indivíduos adultos (HAFFAJEE et al. 1997a; ROSLING et al. 2001). Normalmente progride com períodos de exacerbação e quiescência (SOCRANSKY et al. 1984; JEFFCOAT & REDDY, 1991). Ocorre em qualquer idade, porém é mais comumente encontrada em adultos (FLEMMIG, 1999). A progressão e severidade da doença parecem aumentar com o avanço da idade (NEELY et al., 2001) e pode variar de lenta a moderada e normalmente é consistente com a presença de fatores locais como cálculo, biofilme, iatrogenias, etc (ARMITAGE, 1999).

1.1 Etiologia das doenças periodontais

A etiologia das doenças periodontais tem sido estudada há muitas décadas e o seu caráter infeccioso específico foi sugerido há mais de um século. Entre 1880 e 1920 alguns pesquisadores estudaram a microbiota oral e sugeriram que certos microrganismos como amebas, espiroquetas, fusobactérias e *streptococcus* poderiam ser responsáveis pelo início e progressão da destruição periodontal (BARRET, 1914 a,b; Le CLEAR, 1915; KOLLE, 1917; KRITCHEVSKY & SEGUIN, 1918; HARTZELL, 1925; FISHER, 1927; HARELL, 1931 - *Apud* FERES, 1999b). Após esse período inicial, essa hipótese foi ignorada e entre os anos de 1920 e 1960 acreditava-se que as doenças periodontais estavam relacionadas a

fatores sistêmicos e que a presença de microrganismos patogênicos seria apenas uma consequência do estabelecimento da doença (BUNTING, 1922; PRINTZ, 1926; HAUPL & LANG, 1927; GOTTLIEB, 1921 a,b,1928; GOLDMAN, 1968; - *Apud* FERES, 1999).

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

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

Seguiu-se então uma fase em que se considerava que o acúmulo de biofilme na margem gengival levaria à produção de fatores irritantes e conseqüentemente à inflamação gengival e à destruição periodontal. Esta teoria ficou conhecida como a “Hipótese da placa não específica” (THEILADE, 1986), e relacionava as doenças gengivais e periodontais à quantidade de acúmulo de placa bacteriana e não a sua composição. Porém, com a continuidade dos estudos foi possível observar que em alguns indivíduos, mesmo na presença de grande quantidade de placa a doença não se desenvolvia ou permanecia estável (LÖE et al., 1978 e 1986). Por outro lado, certos casos de doença periodontal progrediam de forma mais rápida e agressiva mesmo na presença de pouca placa e cálculo (LÖE et al., 1986; BAELUM, 1988). Løe et al. (1978 e 1986) avaliaram 480 plantadores de chá no Sri Lanka, por 15 anos, e observaram que 11% desses indivíduos, mesmo apresentando grande quantidade de biofilme, não mostravam progressão da

doença periodontal. Por outro lado, Listgarten et al. (1976) avaliaram a microbiota em dentes naturais extraídos de indivíduos com diagnósticos de saúde, gengivite e periodontite e observaram diversas diferenças na composição do biofilme subgengival. Esses estudos retomaram a teoria de especificidade do biofilme, que ficou conhecida como a “Hipótese da placa específica” (LOESCHE, 1976). A partir de então grande parte da comunidade científica passou a acreditar que a composição do biofilme supra e subgengivais diferia entre indivíduos e entre as diversas condições periodontais, tais como periodonto saudável, gengivite e periodontites. Essa teoria é aceita até os dias atuais.

Na década de 90 o desenvolvimento de técnicas imunológicas e de biologia molecular permitiu a detecção mais precisa das espécies bacterianas que compõem os biofilmes orais e a partir de então se começou a estabelecer a relação entre os diferentes perfis microbianos e as diversas formas de periodontite (CHRISTERSSON et al., 1987; SOCRANSKY et al., 1988; SOCRANSKY & HAFFAJEE et al., 1994a; ÁVILA-CAMPOS et al., 1999; GOMES et al., 2006). A maior vantagem dessas técnicas é a possibilidade de detecção de espécies difíceis de serem identificadas pelos métodos tradicionais de diagnóstico microbiológico, como a cultura bacteriana. Esse seria o caso de espécies como a *Tannerella forsythia* e as espiroquetas. Socransky et al. (1994) descreveram a técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para diagnóstico microbiológico utilizando sondas de ácido desoxirribonucleico (DNA). Utilizando essa técnica de diagnóstico, esse grupo de pesquisadores avaliou as associações entre 40 espécies bacterianas presentes em 13.261 amostras de biofilme subgengival de 185 indivíduos (160 com periodontite e 25 saudáveis) (SOCRANSKY et al., 1998). Os autores descreveram cinco complexos bacterianos principais nas amostras de biofilme subgengival desses indivíduos. Um deles, denominado complexo vermelho, era composto pelas espécies *T. forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, e foi fortemente relacionado com profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem (SS). Outro, denominado complexo laranja, que parece preceder a colonização do complexo vermelho, foi dividido em 2 subgrupos: um central, composto por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*; e outro grupo periférico, formado por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*,

Campylobacter gracilis e *Streptococcus constellatus*. Os outros três complexos, denominados amarelo, verde e roxo demonstraram grande associação entre si e menor associação com os dois primeiros, e são compostos por diversas espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro. Esses seriam os colonizadores primários da superfície dental. O complexo verde é formado por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetencomitans* sorotipo a. O complexo amarelo é composto por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*; e o complexo roxo inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As espécies *Selenomonas noxia*, As espécies *Selenomonas noxia* e *A. actinomycetencomitans* sorotipo b não se correlacionaram com nenhuma outra.

Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces oris*) foram agrupadas e consideradas compatíveis com o hospedeiro, relacionadas diretamente com estado de saúde (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

1.2 Terapia periodontal

Os principais objetivos da terapia periodontal são melhorar os parâmetros clínicos e manter os níveis de inserção estáveis ao longo do tempo. Atualmente, já está bem definido que esses objetivos somente são alcançados quando a terapia utilizada é capaz de reduzir os níveis e as proporções das espécies bacterianas patogênicas em toda a cavidade oral e permitir a sua subsequente recolonização por uma microbiota compatível com saúde (TELES et al. 2006). Apesar do nosso conhecimento sobre a composição dos biofilmes supra e subgingivais ter crescido muito nos últimos anos, terapias efetivas e específicas para as infecções periodontais continuam sendo estudadas.

A raspagem e alisamento radicular (RAR) é a terapia periodontal mais comumente utilizada para o tratamento periodontal. Os benefícios clínicos e microbiológicos da RAR estão bem documentados na literatura (HAFFAJEE et al., 1997a; CUGINI et al., 2000; COBB, 2002; CARVALHO et al., 2004; COLOMBO et al., 2005; CARVALHO et al., 2005; TELES et al., 2006). Estes estudos mostraram que após a RAR ocorre redução da PS e ganho NCI (principalmente nos sítios com

PS intermediária e profunda), diminuição da inflamação gengival e menor porcentagem de sítios com SS e supuração. Porém, apesar de levar, na maioria das vezes, a uma melhora nos parâmetros clínicos periodontais, a RAR é, muitas vezes, insuficiente para modificar profundamente o perfil bacteriano patogênico para um perfil compatível com saúde periodontal, principalmente em casos de doenças mais severas ou associadas a fatores de risco, como o fumo (HAFFAJEE et al., 1997a; CUGINI et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; MATARAZZO et al., 2008).

Os estudos que avaliaram microbiologicamente os resultados da terapia de RAR mostraram que esta terapia levou a uma diminuição significativa na contagem dos microrganismos *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* e aumento significativo das espécies *Actinomyces sp.*, *Capnocytophaga sp.*, *S. mitis* e *V. parvula* (HAFFAJEE et al., 1997a; CUGINI et al., 2000). Por outro lado, a persistente prevalência de certos patógenos após a terapia de RAR, incluindo *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, resultou em uma fraca resposta do hospedeiro ao tratamento, associada à progressiva perda de inserção (HAFFAJEE et al., 1997a; HAFFAJEE et al., 1997b). Sendo assim, terapias coadjuvantes à RAR, como os antibióticos sistêmicos e o controle sistemático da placa supragengival, têm sido propostos com o objetivo de potencializar os efeitos clínicos e microbiológicos desta forma de terapia (van WINKELHOFF et al., 1997; FERES et al., 2001; MOEINTAGHAVI et al., 2007; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000b; HERRERA et al., 2002; CARVALHO et al., 2004 e 2005; TELLES et al., 2006; FAVERI et al., 2006b; MOREIRA & FERES FILHO, 2007; HAFFAJEE et al. 2003a, 2007 e 2008; HERRERA et al., 2008; MATARAZZO et al., 2008; FERES et al., 2009; SILVA et al. 2011; GOODSON et al. 2012; MDALA et al. 2012).

1.2.1 Antibioticoterapia no tratamento periodontal

1.2.1.1 Histórico

Segundo o conceito original os antibióticos são substâncias produzidas por organismos vivos, como fungos e bactérias, que têm a função de eliminar ou inibir o crescimento de outros microrganismos (CHAMBERS & SANDE, 1996). Porém, atualmente, drogas sintéticas (ex.: metronidazol) e semi-sintéticas (ex.: doxiciclina, minociclina e amoxicilina (AMX)) com ação antimicrobiana também são genericamente chamadas de antibióticos. De acordo com a ação farmacológica, os

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

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

1.2.1.2 Metronidazol e Amoxicilina

Um dos antimicrobianos mais promissores para o tratamento de indivíduos com periodontite crônica é o metronidazol (MTZ) (HAFFAJEE et al. 2008b) que é uma droga sintética, derivada do nitroimidazol, com atividade bactericida e protozoaricida. De acordo com Freeman et al. (1997) o MTZ penetra nas células bacterianas por difusão passiva e gera metabólitos tóxicos que interagem com o DNA e outras macromoléculas bacterianas, causando a morte celular. Apesar de penetrar em todas as células bacterianas a porção nitro da droga sofre redução enzimática, e consequente ativação, apenas nas bactérias anaeróbias estritas (FREEMAN et al. 1997). O MTZ é geralmente bem tolerado, mas alguns efeitos adversos podem ocorrer como náusea, dor epigástrica, estomatite, língua saburrosa negra e gosto metálico na boca (MONTGOMERY EH, 2000).

Shinn (1962) foi o primeiro a utilizar o MTZ em odontologia após observar um alívio casual nos sintomas da gengivite ulcerativa necrosante aguda (GUNA) em

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

A vantagem do MTZ no tratamento da periodontite crônica é seu espectro de ação direcionado às espécies bacterianas anaeróbias estritas, como é o caso dos três patógenos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*). Uma série de estudos iniciados por Loesche e colaboradores no final da década de 1980 sugeriu a redução da necessidade de se realizar procedimento cirúrgico no tratamento periodontal quando indivíduos com periodontite crônica eram tratados com MTZ sistêmico. Os autores observaram que o MTZ, na dosagem de 750mg a 1 g por dia, administrado por 14 dias associado à terapia mecânica, diminuía em até 93% o número de dentes com necessidade de tratamento cirúrgico, e em até 81% o números de dentes com indicação de extração por doença periodontal (LOESCHE et al., 1984, 1987, 1991, 1992, 1996, 2002 e 2005). O uso adjunto do MTZ tem sido mostrado como efetivo no tratamento da periodontite crônica, levando a adicionais benefícios nos diversos parâmetros clínicos periodontais, como redução na profundidade de sondagem e ganho de inserção. De forma geral, a maioria dos estudos que associaram o MTZ à RAR no tratamento da periodontite crônica mostrou resultados clínicos melhores do que os obtidos somente com a terapia mecânica (JOYSTON-BECHAL et al., 1986; LOESCHE et al., 1992; WINKEL et al., 1997; ELTER et al., 1997; FERES, 1999a; HAFFAJEE et al., 2003b e 2007; CARVALHO et al., 2004, MATARAZZO et al., 2008, SILVA et al., 2011). Diversos estudos sugerem que o MTZ é mais efetivo em sítios profundos do que em sítios rasos (LOESCHE et al., 1981; CLARK et al., 1983; JOYSTON-BECHAL et al., 1984,1986; LOESCHE et al., 1984; STERRY et al., 1985; CARVALHO et al., 2004; HAFFAJEE et al., 2007). Elter et al. (1997) em uma meta-análise, concluíram que a combinação de MTZ e RAR proporciona melhores resultados clínicos do que a RAR

sozinha, em casos de indivíduos que apresentam bolsas com profundidade de sondagem ≥ 4 mm. Por outro lado, Feres, (1999a) e Feres et al., (2001) observaram benefícios desta terapia também em sítios intermediários (PS entre 4-6 mm).

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

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

A amoxicilina (AMX) pertence ao grupo das penicilinas. Esses antibióticos são bactericidas e atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana e levam conseqüentemente à morte do microrganismo. A AMX tem um amplo espectro de atividade, atuando sobre espécies anaeróbias estritas e facultativas (WALKER et al., 1985; KULIK et al., 2008), e também sobre cocos e bacilos Gram-negativos e Gram-positivos (MONTGOMERY EH, 2000). Porém, os estudos que avaliaram o efeito desse antibiótico combinado à RAR no tratamento da doença periodontal mostraram apenas discretas vantagens sobre a terapia mecânica sozinha (HELOVUO & PAUNIO, 1989; FERES et al., 2001). Logo, a AMX não tem sido o antibiótico de primeira escolha para o tratamento das infecções periodontais.

Feres et al. (2001) compararam diretamente os efeitos da AMX ou do MTZ na composição da microbiota subgingival de indivíduos com periodontite crônica. Os voluntários receberam RAR associada ao MTZ (250 mg 3 x dia) ou à AMX (500mg 3 x dia), ambos por 14 dias. Foi observado que os níveis e as proporções de *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* reduziram drasticamente durante a administração dos antibióticos e se mantiveram mais baixas que no tempo

inicial em 1 ano pós-terapia, principalmente no grupo que recebeu o MTZ. Além disso, o MTZ afetou muito pouco as espécies consideradas benéficas, como *Actinomyces*, *Streptococcus* e *Capnocytophaga*. O grupo que recebeu AMX também apresentou redução dos níveis das 3 espécies do complexo vermelho; no entanto, após 1 ano ocorreu uma maior recolonização desses patógenos, principalmente das espécies *T. forsythia* e *T. denticola*. Além disso, houve uma redução na proporção dos *Actinomyces*, no grupo da AMX, que são espécies intimamente relacionadas à saúde periodontal.

1.2.1.3 *Metronidazol associado à amoxicilina*

A associação do MTZ e da AMX à terapia mecânica foi sugerida pela primeira vez por van Winkelhoff et al. (1989). Esse grupo de pesquisadores observou significativa redução nos níveis de *A. actinomycetemcomitans* e na profundidade de sondagem, além de ganho de inserção, na maioria dos indivíduos que receberam RAR associada ao MTZ (250 mg, 3x/dia) e AMX (375 mg, 3x/dia), ambos por 7 dias (van WINKELHOFF et al., 1992). Após esses estudos iniciais, diversos autores avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos dessa combinação de terapias no tratamento da periodontite crônica (PAVICIC et al., 1994; FLEMMIG et al., 1998; BERGLUNDH et al., 1998; WINKEL et al., 2001; ROONEY et al., 2002; HERRERA et al., 2002; MOMBELLI et al., 2005; EHMKE et al., 2005; PAHKLA et al., 2006; MOEINTAGHAVI et al., 2007; DANNEWITZ et al., 2007; MATARAZZO et al., 2008; CIONCA et al., 2009; SILVA et al., 2011; GOODSON et al., 2012) ou agressiva (GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIU et al., 2006; SANZ et al., 2008; YEK et al., 2010; MESTNIK et al., 2010; AIMETTI et al., 2012). Recentemente, Cionca et al. (2009), avaliaram os benefícios clínicos ocorridos em pacientes com periodontite crônica tratados com administração de AMX (375mg, 3x ao dia/ 7dias) e MTZ (500mg, 3x ao dia/ 7dias) após a RAR realizada dentro de 24hs, complementada com irrigação das bolsas periodontais com clorexidina 0,1% e controle químico do biofilme supragengival por meio de bochecho (clorexidina 0,2% 2x ao dia/ 10dias). Os autores observaram que seis meses após as terapias o grupo que combinou os antibióticos à RAR reduziu a necessidade de intervenções adicionais para o tratamento da doença comparado ao grupo que recebeu apenas RAR em 24hs. O grupo que recebeu antibioticoterapia mostrou menor frequência de *A.*

actinomycetocomitans, *T. forsythia* e *P. gingivalis* que o grupo controle, após 6 meses de reavaliação (CIONCA et al. 2010). Goodson et al., (2012) compararam os efeitos da RAR como terapia única ou associada à antibioticoterapia local com fibra de tetraciclina (T), ao MTZ + AMX, ou ao tratamento cirúrgico (C). A terapia de RAR foi realizada em 14 dias. O MTZ (250mg 3x/dia) e a AMX (500mg 3x/dia) foram administrados por 14 dias, iniciando no primeiro dia da terapia mecânica. A Tetraciclina foi aplicada nos sítios com PS \geq 5mm, logo após à sessão de RAR e removida após 7 dias. A terapia cirúrgica foi realizada após a reavaliação de 3 meses pós terapia nos sítios que permaneciam com PS \geq 5mm e SS. Formaram no total 8 grupos (RAR, RAR+C+MTZ+AMX, RAR+C+T, RAR+C, RAR+MTZ+AMX+T, RAR+MTZ+AMX, RAR+T, RAR+C+MTZ+AMX+T). Os autores observaram 2 anos pós-terapia que, quando associada a outras terapias, a RAR levou a melhores resultados clínicos do que quando realizada sozinha. Aparentemente a associação de mais de 2 terapias não levou a benefícios sinérgicos e os melhores benefícios foram observados quando a RAR foi associada à antibióticoterapia sistêmica, associada ou não tetraciclina local ou ao tratamento cirúrgico. Mdala et al. (2012) avaliaram os mesmo grupos experimentais do estudo descrito anteriormente e observaram que a associação de RAR ao MTZ+AMX+T+C foi a terapia que conseguiu manter os melhores resultados clínicos após 2 anos de acompanhamento.

Poucos estudos até o momento compararam os efeitos da RAR associada ao MTZ ou ao MTZ e à AMX no tratamento da periodontite crônica e durante curtos períodos de acompanhamento (ROONEY et al., 2002; MATARAZZO et al., 2008; SILVA et al., 2011). Desses estudos, todos demonstraram que os grupos que receberam terapia antibiótica associada tiveram melhores resultados clínicos e microbiológicos quando comparados com o grupo que recebeu apenas RAR e ainda uma tendência para os melhores benefícios para os indivíduos que receberam os dois antibióticos associados (MTZ+AMX). Matarazzo et al. (2008) avaliou parâmetros clínicos e 40 espécies bacterianas subgingivais em 43 indivíduos fumantes com periodontite crônica. Os autores observaram que aqueles que receberam RAR associada ao MTZ e à AMX (MTZ 400mg, 3 x dia por 14 dias; AMX 500mg, 3 x dia por 14 dias) mostraram a maior redução nas contagens e proporções de espécies consideradas patogênicas, como as do complexo vermelho. Além disso, esses

indivíduos tiveram os aumentos mais significantes nas espécies compatíveis com saúde, quando comparados com indivíduos que receberam apenas RAR ou RAR associada ao MTZ. Silva et al., (2011) seguindo a mesma metodologia do estudo anterior, observaram em não fumantes melhores resultados nos parâmetros clínicos e microbiológicos para o grupo que associou o MTZ e AMX à RAR, quando comparado com os indivíduos que receberam apenas RAR ou associada apenas ao MTZ, após 3 meses de acompanhamento. No entanto, nenhum estudo longitudinal comparando esses dois protocolos de antibióticoterapia em relação aos benefícios clínicos e microbiológicos foram até o momento publicados.

1.2.2 Controle mecânico do biofilme supragengival

A idéia de introduzir o controle rigoroso profissional da placa supragengival como parte ativa da terapia periodontal foi inicialmente descrita entre os anos 1980 e 1990. Diferentes grupos de pesquisadores sugeriram que a remoção da placa supragengival duas vezes por semana por longos períodos levaria a benefícios clínicos e microbiológicos na terapia periodontal (NYMAN et al., 1975; ROSLING et al., 1976; LINDHE et al., 1982; WESTFELT et al., 1983; MAGNUSSON et al., 1984).

Posteriormente, Hellström et al. (1996), realizaram uma pesquisa com 12 indivíduos portadores de periodontite moderada à avançada, que receberam instrução de higiene oral e profilaxia profissional duas a três vezes por semana durante 30 semanas. Foram realizadas avaliações clínica e microbiológica para testar a hipótese de que o controle do biofilme supragengival poderia afetar a composição do biofilme subgengival. Os autores observaram redução nos níveis de *P. gingivalis* tanto nas regiões de furca quanto em bolsas supra e infraósseas. Houve também redução no percentual de sítios com PS entre 4 e 6 mm e aumento daqueles sítios com PS \leq 3mm. Ximenez-Fyvie et al. (2000a,b) investigaram os efeitos da remoção da placa supragengival (RPS) na composição da placa subgengival em indivíduos com periodontite crônica leve, utilizando a técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Foi avaliado o efeito da remoção profissional de placa supragengival após a RAR, realizada semanalmente por um período de 3 meses. Os resultados demonstraram que o controle de placa sistemático durante os três primeiros meses de manutenção pós-terapia periodontal apresenta efeitos

benéficos de longa duração sobre a microbiota da placa subgengival. Os níveis de todas as 40 espécies microbianas avaliadas foram reduzidos aos 6 meses pós-terapia. Surpreendentemente, o controle profissional de placa supragengival levou a uma redução na proporção de diversos patógenos periodontais na placa subgengival. As espécies mais significativamente reduzidas foram o *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*. É interessante observar que aos 12 meses de avaliação pós-terapia, ou seja, 9 meses após a suspensão do controle de placa profissional semanal, o perfil microbiológico destes pacientes ainda era semelhante ao perfil microbiológico observado em um grupo de 22 pacientes com saúde periodontal, que nunca havia sido submetido a tratamento periodontal.

Carvalho et al. (2004 e 2005) realizaram um estudo aleatorizado, duplo cego, placebo-controlado, com 45 indivíduos portadores de periodontite crônica avançada generalizada. Os pacientes foram divididos em 4 grupos experimentais, e receberam RAR somente ou associada à terapia com antibióticos sistêmicos (MTZ 400mg, 3 x dia por 10 dias), complementada ou não com RPS semanal por 3 meses. Foi observado que o grupo que recebeu as 3 terapias associadas foi o que apresentou melhores resultados clínicos (principalmente nos sítios com PS \geq 7mm) e microbiológicos. Em todos os grupos de tratamento ocorreu redução significativa das espécies bacterianas do complexo vermelho; porém, no grupo que recebeu as três terapias, houve também uma maior redução das espécies do complexo laranja. Estas alterações foram observadas logo após a terapia e se mantiveram até um ano (CARVALHO, 2002). Resultados semelhantes foram descritos por Haffajee et al. (2003a) na população norte americana. Hugoson et al. (2007) avaliaram cerca de 400 indivíduos por 3 anos que foram incluídos em diferentes protocolos de controle do biofilme supragengival. Os autores observaram que todos os indivíduos que participaram de algum desses programas mostraram menores índices de gengivite e de sítios com sangramento gengival do que os indivíduos que não participaram.

1.2.3 Controle químico do biofilme supragengival

Os resultados benéficos observados quando a remoção profissional do biofilme supragengival é realizada durante a fase ativa da terapia periodontal são animadores (HELLSTRÖM et al., 1996; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000b; CARVALHO

et al., 2004 e 2005). Porém, manter o paciente retornando semanalmente ao consultório odontológico para realizar o procedimento de remoção mecânica do biofilme é muitas vezes uma prática difícil de ser realizada. A substituição do controle de placa profissional semanal pelo bochecho diário com digluconato de clorexidina (CLX) foi sugerida como uma boa alternativa terapêutica em dois estudos recentes do nosso grupo de pesquisa (FAVERI et al., 2006b e FERES et al., 2009).

A CLX é considerada como o antisséptico de escolha para o controle de placa supragengival por possuir amplo espectro de ação e excelente efeito antimicrobiano sobre as bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus presentes na cavidade oral (LOESCHE, 1979; GJERMO, 1989; ALBANDAR et al., 1994; SEKINO et al., 2004). Embora alguns efeitos colaterais possam ser observados com o uso prolongado da CLX como o surgimento de manchas nos dentes, mucosas, língua e restaurações, além de perda do paladar e sensação de queimação das mucosas orais, todas estas alterações são de fácil resolução e reversíveis após o fim do tratamento e, além disso, os benefícios terapêuticos são de grande valia e justificam o seu uso (ERNST et al., 1998; MC COY et al., 2008). Com base nesses conceitos, Faveri et al. (2006b) conduziram um estudo clínico controlado para avaliar o efeito de bochechos com CLX durante e após o tratamento periodontal convencional. Os autores observaram melhores resultados clínicos e microbiológicos no tratamento de pacientes com periodontite crônica com a combinação de RAR e bochechos de CLX a 0,12%, duas vezes ao dia por 2 meses, quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas RAR. Quando os sítios periodontais foram categorizados de acordo com a PS inicial, os benefícios clínicos da associação das terapias foram especialmente notados nos sítios intermediários e profundos (PS entre 4 e 6mm e > 6mm, respectivamente). Esses sítios apresentaram as maiores reduções nas médias de PS e no percentual de sítios com sangramento à sondagem, além de ganho clínico de inserção. Mais recentemente, Feres et al. (2009) observaram que a associação da RAR à CLX ou à RPS leva a benefícios clínicos e microbiológicos superiores à RAR sozinha, 6 meses pós-terapia. De acordo com os autores, o controle do biofilme supragengival previne a recolonização dos sítios já tratados e reduz a inflamação nos tecidos periodontais adjacentes, diminui assim a nutrição subgengival necessária para a multiplicação de certos patógenos periodontais. Foi sugerido também que a terapia que associou

CLX alcançou resultados clínicos e na composição da microbiota subgengival superiores aos observados com RPS, provavelmente pelo fato do antisséptico atingir locais que atuam como reservatórios de periodontopatógenos que não são afetados pela remoção mecânica da placa supragengival, como língua e bochechas (MAGER et al., 2003). Porém os efeitos do uso prolongado da CLX em melhorar os efeitos da antibioticoterapia sistêmica ainda precisam ser avaliados.

2. JUSTIFICATIVA

A RAR, apesar de ser uma terapia efetiva para grande parte dos indivíduos com periodontite crônica, possui limitações para o tratamento de indivíduos com doença avançada e generalizada. A principal limitação diz respeito à ineficácia da RAR em alterar profundamente o perfil microbiológico associado à doença para um perfil compatível com saúde periodontal, e com isso leva a melhoras clínicas que não se mantêm ao longo do prazo, principalmente em casos mais avançados. Logo, é fundamental que se realizem estudos clínicos controlados associando-se outras terapias à RAR com a finalidade de se traçar tratamentos mais efetivos para esses indivíduos. Neste sentido a avaliação das alterações clínicas e microbiológicas decorrentes desses tratamentos é fundamental, pois somente diante dessas informações é que poderemos entender os efeitos de cada terapia e prosseguir otimizando suas aplicações. Os benefícios da utilização adjuvante de AMX + MTZ ou MTZ no tratamento periodontal têm sido sugeridos por diferentes grupos de estudos, porém, dados de estudos clínicos duplo-cego, placebo-controlados com acompanhamento além de 6 meses para a associação de MTZ+AMX ou para comparações entre MTZ e MTZ+AMX ainda não foram realizados. Apenas dois estudos, do nosso grupo de pesquisa, avaliaram por curtos períodos, os efeitos da RAR com MTZ ou com MTZ+AMX (MATARAZZO et al. 2008; SILVA et al., 2011) nos parâmetros clínicos e perfil microbiológico no tratamento de indivíduos com periodontite crônica generalizada. Além disso, já foi demonstrado que o uso do bochecho com CLX por 2 meses leva à melhores resultados clínicos à terapia de RAR. No entanto, o efeito do uso prolongado da CLX associado à terapia antibiótica ainda precisa ser explorado.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo principal desse estudo é avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos da terapia de RAR associada ou não ao MTZ ou ao MTZ e à AMX no tratamento de indivíduos com periodontite crônica generalizada em 1 anos pós-terapia. O objetivo secundário é avaliar os efeitos adicionais do uso prolongado de bochechos com CLX, quando associada a essas terapias. A hipótese a ser testada é que quimioterápicos locais ou sistêmicos, contribuem para melhorar os efeitos clínicos e microbiológicos da terapia de RAR em portadores de periodontite crônica generalizada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cálculo da potência

O tamanho amostral ideal para garantir uma potência adequada a esse estudo clínico controlado para comparar os efeitos clínicos e microbiológicos de três diferentes terapias periodontais, foi calculado de acordo com os seguintes parâmetros: pelo menos 4 sítios com PS ≥ 5 mm entre os grupos (LANG & TONETTI, 2003) e assumindo um desvio padrão de 5 sítios (MESTNIK et al., 2010). Baseado nesse cálculo, uma amostragem de 34 indivíduos por grupo seriam necessários para se alcançar uma potência de 90% com $\alpha=0,05$. Considerando-se uma média de desistência de aproximadamente 15%, optou-se por incluir pelo menos 39 indivíduos por grupo de tratamento.

4.2 Seleção dos indivíduos

A seleção de indivíduos foi realizada por dois mestrados em Odontologia, área de concentração em periodontia, sob supervisão dos professores da disciplina, após a apreciação e aprovação (ANEXO A) do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos (UnG). Compareceram à Clínica Odontológica da UnG 657 indivíduos que, foram triados para que 118 indivíduos portadores de periodontite crônica fossem incluídos neste estudo. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e terapias a serem utilizadas. A participação na pesquisa foi voluntária e os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo com a Resolução n° 196/96 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

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

- Idade igual ou superior a 30 anos;
- Possuir um mínimo de 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares e os com indicação de extração;
- Mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal, não contíguo, com PS e NCI entre ≥ 5 mm, preferencialmente distribuídos em sextantes distintos.
- Ter pelo menos 30% dos sítios com PS e NCI ≥ 4 mm e com sangramento à sondagem (SS).

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos.
- Gestantes ou lactantes;
- Histórico de tratamento periodontal prévio;
- Histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- Uso prolongado de medicação antiinflamatória;
- Histórico de uso de antissépticos orais nos últimos seis meses;
- Doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento, como prótese de válvulas cardíacas;
- Relato de alergia ao MTZ e/ou à penicilina e/ou à CLX;

4.4 Delineamento experimental

Neste estudo duplo cego, aleatorizado, placebo controlado, todos os indivíduos selecionados receberam um número código. Em seguida, os coordenadores do estudo (M.Fe e L.C.F.) fizeram a distribuição aleatória dos indivíduos por meio de uma tabela de números equiprováveis em um dos três grupos terapêuticos :

- **Grupo controle (RAR): RAR + AMX sistêmica placebo (500mg) + MTZ placebo (400mg) 3 vezes ao dia durante 14 dias, (n=40);**
- **Grupo teste 1 (MTZ): RAR + MTZ sistêmico (400mg), 3 vezes ao dia, durante 14 dias + AMX (500mg) placebo 3 vezes ao dia, durante 14 dias dias, (n=39);**

- **Grupo teste 2 (MTZ+AMX): RAR + MTZ (400mg) e AMX (500mg) sistêmicos 3 vezes ao dia, durante 14, (n=39);**

A terapia básica de RAR foi realizada em 4-6 sessões e finalizada em 14 dias. A antibioticoterapia (MTZ, AMX e placebos) foi iniciada imediatamente após a primeira sessão de RAR e teve o mesmo período, de 14 dias, de uso.

Uma segunda aleatorização foi realizada para metade dos indivíduos de cada grupo bochechar 15ml de solução de CLX a 0,12%, ou com solução placebo, ambas por 1 minuto duas vezes ao dia durante 2 meses, iniciando no primeiro dia da RAR. Os indivíduos foram orientados para bochechar a solução pela manhã, 30 minutos depois do café da manhã e escovação dental, e a noite também 30 minutos após a escovação. Para avaliar o papel desse controle químico do biofilme supragengival nos resultados do tratamento, um desenho fatorial 2x3 foi empregado e dividiu cada grupo de terapia em dois subgrupos, um para usar CLX e outro para usar solução placebo, resultando no total de 6 subgrupos. Em seguida, uma terceira aleatorização foi realizada para alocar os indivíduos entre os dois examinadores/terapeutas.

As avaliações clínicas e microbiológicas, e manutenções periodontais foram repetidas nas consultas de reavaliação 3, 6 e 12 meses após o término do tratamento. O delineamento experimental está apresentado na Figura 1.

4.5 Avaliação clínico-periodontal

O exame clínico-periodontal foi efetuado no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo. Dois examinadores/terapeutas (G.M.S.S. and J.A.V.M.) participaram de um exercício de calibração com o objetivo de conseguir a máxima reprodutibilidade nas medições realizadas por cada um deles e entre eles, e o erro médio padrão para os parâmetros clínicos (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção) foi calculado. A variabilidade inter-examinador foi 0,23 mm para PS e 0,25 mm para NCI. A média de variabilidade intra-examinador foi 0,19 mm para PS e 0,24 mm para NCI para o examinador 1 (G.M.S.S) e 0,21mm para PS e 0,26 mm para NCI para o segundo examinador (J.A.V.M.). Para as variáveis categóricas a média do nível de concordância para cada examinador e entre eles foi superior a 92% (Teste Kappa). Em cada indivíduo participante, um

examinador realizava todas as avaliações clínicas e o outro examinador realizava todo o tratamento.

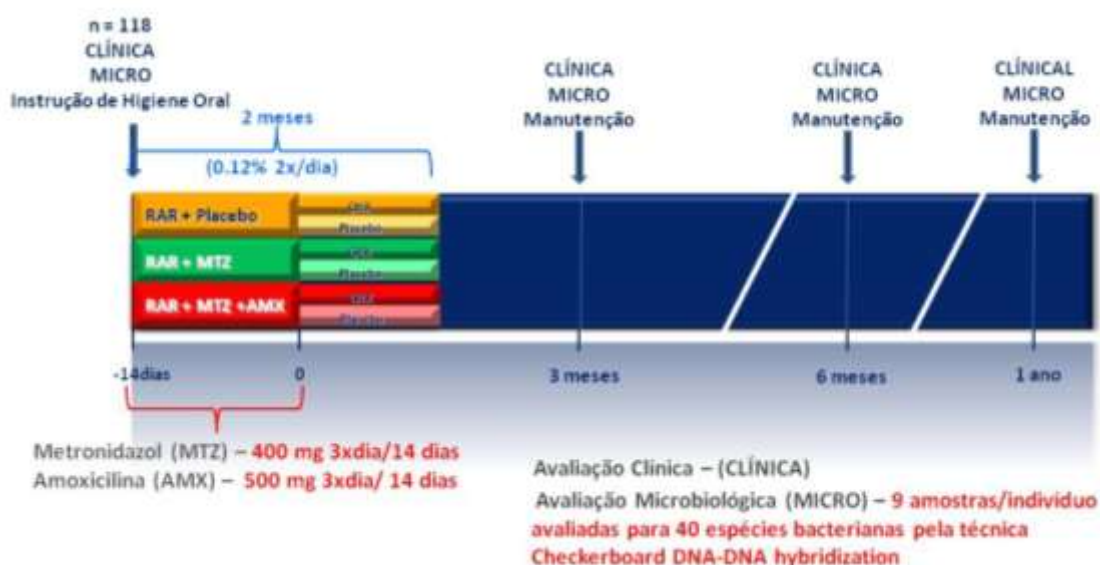


Figura 1. Delineamento experimental.

As mensurações clínicas foram realizadas no início do estudo, 3, 6 e 12 meses pós-terapia, em 6 sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares) utilizando-se sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15 HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os parâmetros clínicos avaliados incluíram:

- Índice de Placa Visível - (IPV) (AINAMO & BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa supragengival visível;
- Índice de Sangramento Gengival - (ISG) (AINAMO & BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento da gengiva marginal, após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival;
- Profundidade de Sondagem - (PS): distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;
- Nível Clínico de Inserção - (NCI): distância, em milímetros, entre a junção cemento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;

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

4.6 Avaliação microbiológica

4.6.1 Seleção dos sítios-testes

Foram selecionados nove sítios em cada voluntário, distribuídos uniformemente de acordo com a profundidade de sondagem inicial nas seguintes categorias (3 sítios por categoria): rasas ($PS \leq 3\text{mm}$), intermediárias ($PS 4-6\text{ mm}$), e profundas ($PS \geq 7\text{mm}$). Quando um dos 3 sítios profundos não foi encontrado, o mesmo foi substituído por sítio intermediário. Estes sítios estavam localizados em faces dentais interproximais não-contíguas, e preferencialmente distribuídos entre os quatro quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados. Amostras de biofilme foram coletadas no início do estudo, 3, 6 e 12 meses pós-terapia.

4.6.2 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 11-12 esterilizadas, posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único golpe de raspagem no sentido ápico-coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150 μL de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 mM EDTA (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil), pH 7,6, e a estas foi acrescentado 100 μL de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Esses tubos plásticos foram previamente identificados com o código do indivíduo, data e sítio, e após a coleta foram armazenados sob refrigeração a -20°C até as amostras serem analisadas por

meio da técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 cepas bacterianas no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da UnG.

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

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

Espécies	Cepas	Espécies	Cepas
Complexo Azul		Complexo Laranja (cont.)	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>vincentii</i>	49256 ^a
<i>Actinomyces oris</i>	43146 ^a	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
Complexo Roxo		<i>Parvimonas micra</i>	33270 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
Complexo Amarelo		<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	Complexo Vermelho	
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	Outras Espécies	
Complexo Verde		<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>Aggregatibacter</i>	43718 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>actinomycetemcomitans</i> a + b	29523 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	4201 ^a
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Propionibacterium acnes</i> I + II	11827 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a		11828 ^a
Complexo Laranja		<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a	<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a		
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a		

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

4.6.4 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, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias gram-positivas foram lisadas em 150 μ L 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 μ g do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994c; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

4.6.5 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 (Immunelect, Cambridge, MA, EUA – Figura 2) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente (SOCRANSKY et al., 1994c; HAFFAJEE et al., 1997). A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) (1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0, 25mM de fosfato de sódio (Na_2HPO_4 , Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de

levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA – Figura 3) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 ng/mL, em 130 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.

4.6.6 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.

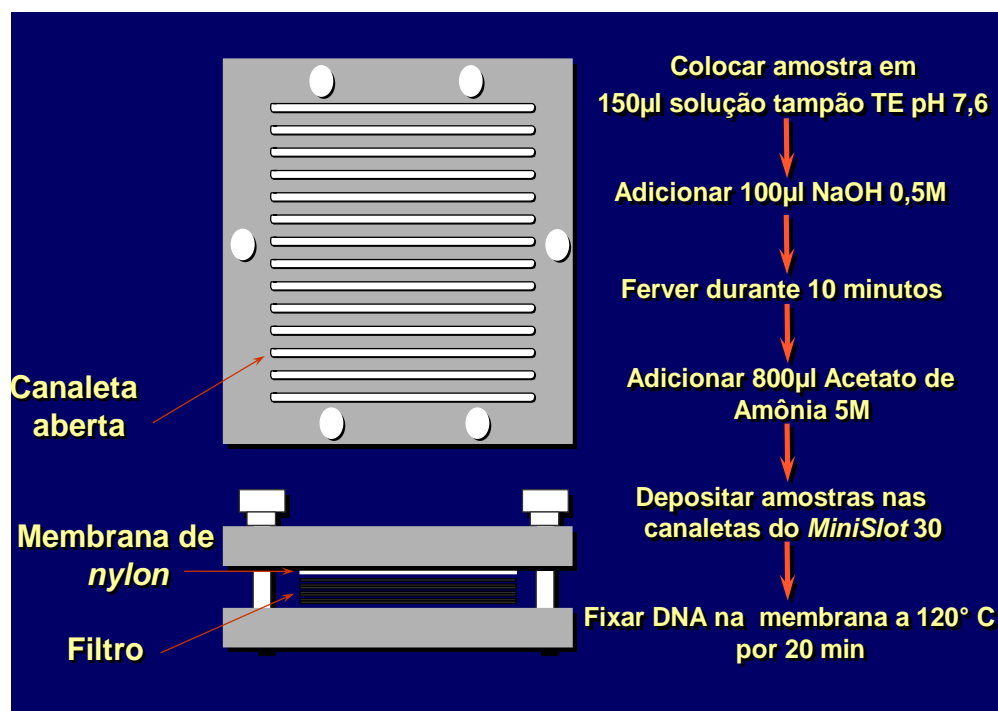


Figura 2. Representação gráfica do Minislot 30 (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon (técnica checkerboard DNA-DNA hybridization).

A 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 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a 10^5 células; 3 entre 10^5 e 10^6 células; 4 a aproximadamente 10^6 células e 5 mais de 10^6 células (Tabela 2). Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas.

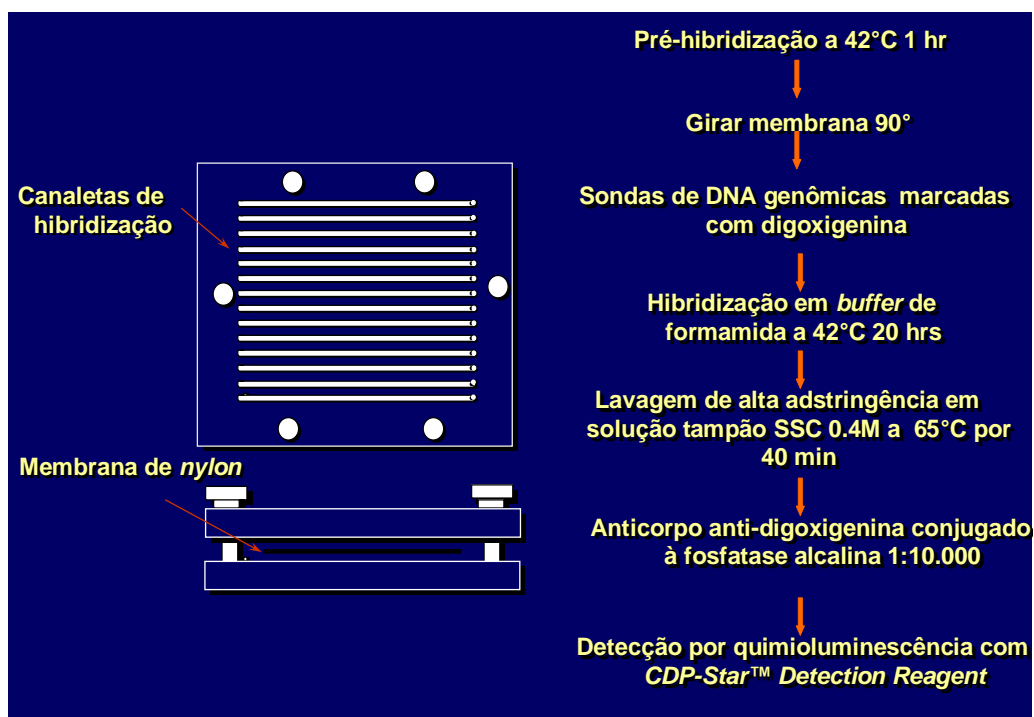


Figura 3. Representação gráfica do *Miniblotter* 45 (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

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

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

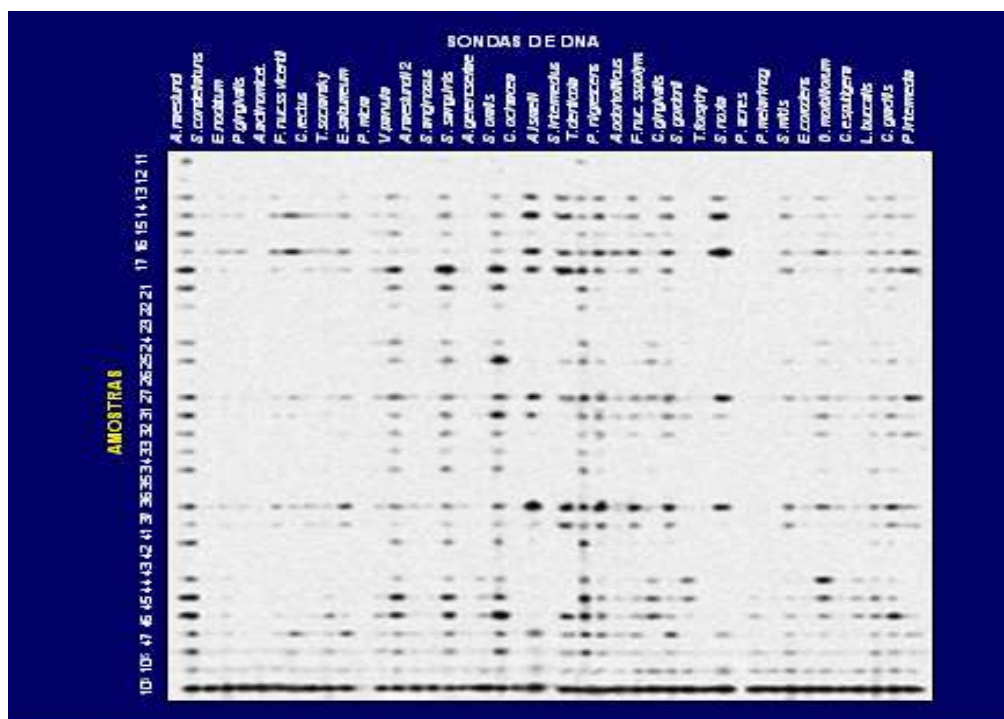


Figura 4. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

4.7 Procedimentos terapêuticos

4.7.1 Terapia periodontal básica

Após o registro das medidas clínicas, todos os indivíduos foram submetidos a uma ou duas sessões de adequação do meio bucal que incluíam instrução de higiene bucal (IHB), raspagem supragengival de todos os dentes (RSP) com instrumentos manuais, remoção de excesso de restaurações, selamento provisório das lesões cariosas cavitadas, curativos endodônticos e exodontias.

Durante as sessões de IHB, os indivíduos foram orientados a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental Colgate Total® (Anacol Ind. E Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co. São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Em seguida, os indivíduos receberam entre quatro e seis sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy) sob anestesia local. Estas sessões de RAR foram realizadas por duas alunas do curso de mestrado em Odontologia com área de concentração em periodontia da

Universidade Guarulhos, (G.M.S.S. e J.A.V.M.) com duração de aproximadamente 1 hora e foram finalizadas em 14 dias.

Os dois examinadores realizaram os exames clínicos e também a terapia de RAR, porém aquele examinador responsável pela execução da RAR não realizava os exames no mesmo indivíduo. As necessidades adicionais de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da clínica odontológica da própria universidade.

4.7.2 Administração de MTZ e AMX sistêmicos e placebos

Indivíduos dos grupos testes (MTZ e MTZ+AMX) receberam RAR e administração de 1,2 g/dia de MTZ (400mg de 8/8 horas) somente, ou combinado com 1,5 g/dia de AMX (500mg de 8/8 horas) via oral por 14 dias, iniciada em conjunto a terapia periodontal básica. Os pacientes dos grupos controle e dos grupos das terapias que utilizaram placebo de uma das drogas ou de ambas, receberam comprimidos de placebo e foram orientados a seguir o mesmo regime dos pacientes que receberam as substâncias ativas. O antibiótico e o placebo foram manipulados especialmente para este estudo na Farmácia de Manipulação Pharmédica (São Paulo, SP, Brasil). Todas as cápsulas (medicação ou placebo) apresentaram a mesma coloração e tamanho, e foram estocados em frascos plásticos leitosos com 21 unidades, devidamente codificados. Quanto ao controle da ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, os indivíduos foram orientados a retornar na próxima semana à clínica de Odontologia-UnG, trazendo o frasco vazio para depois receber outro frasco contendo a mesma medicação. Além disso, também foram monitorados de 4 em 4 dias, pessoalmente ou via telefone, por um aluno de iniciação científica. Após o término do período de administração da droga e/ou placebo, os indivíduos responderam a um questionário (ANEXO B) sobre possíveis reações adversas da medicação.

4.7.3 Administração de bochecho com CLX e placebo.

Os bochechos (solução de digluconato de clorexidina 0,12% ou solução placebo) foram realizados 2 vezes ao dia com 15 ml da solução, 40 minutos após a escovação. O início do uso da CLX ou placebo ocorreu juntamente com o início da RAR e durou 2 meses. As soluções foram manipuladas especialmente para o

estudo, na farmácia de manipulação Pharmédica (São Paulo, SP, Brasil) e acondicionadas em frascos de 210 ml, idênticos e codificados. A solução placebo possuía a mesma apresentação, cor e sabor da substância ativa - solução de digluconato de CLX a 0,12%. Os indivíduos receberam 1 frasco por semana contendo a solução de CLX ou o placebo. Após o término do produto, os pacientes foram orientados a trazerem à clínica de odontologia da UnG o frasco vazio para a retirada de um novo frasco, para controle da cooperação.

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

Os frascos codificados foram entregues aos examinadores, que em nenhum momento durante o tempo do estudo tiveram acesso às informações sobre os conteúdos dos frascos ou distribuição dos indivíduos nos grupos de tratamento. Além disso, todos os participantes do estudo, incluindo estatístico, estavam cegos para o encaminhamento dos tratamentos. Somente em relação à CLX o cegamento não pode ser mantido devido ao manchamento dos dentes e lingual. Entretanto, o estudo é considerado duplo-cego, desde que é totalmente cego para o objetivo principal que foi testar as três principais terapias, RAR, MTZ e MTZ+AMX. O código foi quebrado apenas ao final da análise estatística dos resultados.

4.8 Análise estatística

4.8.1 Dados clínicos

A análise de cada parâmetro clínico foi realizada por indivíduo e entre os indivíduos de cada grupo. Alterações em PS e NCI em sítios inicialmente com PS 4-6mm e ≥ 7 mm ou a média/percentual de sítios com PS ≥ 5 mm, ≥ 6 mm, ≥ 7 mm e ≥ 8 mm foram calculados separadamente dentro de cada categoria de PS por indivíduo e entre os indivíduos de cada grupo. A significância das diferenças entre cada grupo (ao longo do tempo) foi procurada usando o teste ANOVA de repetidas medidas e teste de Tukey de múltiplas comparações, e entre os grupos (em cada tempo) usando teste ANOVA para um fator e teste de Tukey de múltiplas comparações. Teste qui-quadrado foi utilizado para comparar as diferenças na frequência de gênero, de pacientes apresentando diferentes categorias de sítios residuais em 1 ano de acompanhamento e da auto-percepção de efeitos adversos.

Teste ANOVA para dois fatores foi utilizado para testar a interação entre os três grupos de tratamento (RAR, RAR + MTZ, RAR + MTZ + AMX) e o uso de CHX (sim / não) e para avaliar a significância das diferenças entre os grupos de tratamento e entre os subgrupos de CLX e bochecho placebo (desenho fatorial), para a variável principal de resultado (*primary outcome*). Sempre que as diferenças encontradas entre os grupos / subgrupos foram significativas, teste Tukey de múltiplas comparações (para os três grupos de tratamento) e teste de Bonferroni para comparações múltiplas (para os seis subgrupos) foram usados para determinar que par (es) de comparações foram estatisticamente significantes.

A análise de regressão logística “*stepwise*” foi realizada para investigar a variável principal de resultado (*outcome variable*): presença de ≤ 4 sítios com PS ≥ 5 mm em 1 ano pós-terapia (sim / não). As variáveis clínicas preditoras incluíram gênero, idade, RAR, MTZ, MTZ + AMX, CHX, e as seguintes características clínicas no início do estudo: média PS e NCI, mais de 25 sítios com PS > 5 mm e o percentual de sítios com placa visível, inflamação gengival, supuração ou SS. O nível de significância foi fixado em 5%. Os dados foram avaliados utilizando análise de intenção de tratar (*intention-to-treat*) com a última avaliação levada adiante.

4.8.2 Dados microbiológicos

Os dados disponíveis para avaliação microbiológica foram provenientes da análise das 40 espécies bacterianas dispostas nos complexos descritos por Socransky e colaboradores (2002), em 9 amostras de biofilme subgengival por indivíduo, dos 118. Esses dados foram expressos de 2 maneiras: contagens (níveis) e % de contagem das sondas de DNA (proporção). Os níveis ($\times 10^5$) foram computados por indivíduo e depois dentro de cada grupo terapêutico, em cada tempo do estudo. A partir desses dados foram calculadas as proporções de cada espécie por sítio, por indivíduo e finalmente no grupo. Diferenças nos níveis médios e proporções de cada espécie bacteriana individualmente ou nas proporções dos diferentes complexos bacterianos entre os grupos terapêuticos em diferentes tempos experimentais foram avaliadas por meio do teste Kruskal-Wallis. Caso a diferença estatística fosse detectada, o teste Dann foi empregado para identificar as diferenças entre cada dois grupos. Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microrganismos ou complexos bacterianos dentro de cada grupo, entre o início do

estudo e os diferentes tempos experimentais, foram avaliadas por meio do teste Friedman. Caso a diferença estatística fosse detectada, o teste Dunn foi empregado para identificar as diferenças entre cada dois tempos experimentais. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas. Foi aplicada a fórmula $0,05 = 1 - (1 - K)^{40}$, onde k é o valor equivalente ao $p < 0,05$ quando ajustado para a comparação de 40 bactérias. Desta forma, as diferenças detectadas no presente estudo foram consideradas significativas quando $p < 0,00125$ ($p < 0,05$), como proposto por Socransky et al. (1991).

CAPÍTULO 1. Artigo – Resultados clínicos

Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial.

Running title: MTZ alone or with AMX in the treatment of ChP

Magda FERES¹, Geisla Mary Silva SOARES¹, Juliana Alethusa Velloso MENDES¹,
Maike Paulino SILVA¹, Marcelo FAVERI¹, Ricardo TELES^{2,3}, Sigmund S.
SOCRANSKY², Luciene Cristina FIGUEIREDO¹

¹ Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, São Paulo, Brazil

² The Forsyth Institute, Cambridge, MA, USA

³ Department of Oral Medicine, Infection, and Immunity, Harvard School of Dental Medicine, Boston, MA, USA

Address for correspondence and reprints (*e-mail can be published*)

Magda Feres

Centro de Pós-Graduação e Pesquisa-CEPPE

Universidade Guarulhos

Praça Tereza Cristina, 229 Centro

07023-070 Guarulhos, SP, Brazil

e-mail: mferes@ung.br

ABSTRACT

Aim: To evaluate the effects of the adjunctive use of metronidazole (MTZ) or MTZ+amoxicillin (AMX) in the treatment of generalized chronic periodontitis (ChP). A secondary aim was to examine a possible added effect of chlorhexidine to these therapies. **Methods:** 118 subjects received scaling and root planing (SRP)-only or with MTZ (400 mg/TID) or MTZ+AMX (500 mg/TID) for 14 days. Half of the subjects in each group rinsed with 0.12% chlorhexidine TID for 2 months. Subjects were clinically monitored at baseline, 3, 6 and 12 months post-therapy. **Results:** The two antibiotic groups showed lower mean number of sites with probing depth (PD) ≥ 5 mm and fewer subjects exhibiting ≥ 9 of these sites at 1 year post-treatment. Logistic regression analysis showed that antibiotics were the only significant predictors of subjects presenting ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm at 1 year (MTZ+AMX: OR, 13.33; 95%CI, 3.75-47.39; $p=0.0000$; MTZ: OR, 7.26; 95%CI, 2.26-23.30; $p=0.0004$). The chlorhexidine subgroups showed a trend ($p>0.05$) to present fewer residual sites ≥ 5 mm compared with the placebo subgroups at 1 year. **Conclusion:** Treatment of generalized ChP is significantly improved by the adjunctive use of MTZ+AMX and MTZ.

Key-words: Periodontal disease; Metronidazole; Amoxicillin; Chronic periodontitis; Scaling and root planing; Periodontal treatment.

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: Previous studies have suggested that the adjunctive use of MTZ or MTZ+AMX can be beneficial in the treatment of periodontitis. However, data from double-blinded placebo-controlled RCTs beyond 6 months for the MTZ+AMX therapy or for comparisons between these two antibiotic protocols are still lacking. Principal findings: The two antibiotic therapies were statistically significantly superior to SRP alone in improving all clinical parameters evaluated, including in reducing the number of residual pockets up to 1 year post-treatment. Practical implications: The adjunctive use of MTZ and MTZ+AMX offer a major additional benefit for the treatment of subjects with generalized ChP.

Conflict of interest and source of funding statement- The authors declare that they have no conflict of interests. This study was supported by Research Grant #07/55291-9 from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil).

Introduction

The benefits of systemic antibiotics in periodontal treatment have consistently been demonstrated in the periodontal literature. The combination of metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) with scaling and root planing (SRP), initially suggested by van Winkelhoff et al. (1989) to treat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-associated periodontitis, turned out to be one of the most promising antibiotic protocols for the treatment of aggressive (Guerrero et al. 2005, Xajigeorgiou et al. 2006, Sanz et al., 2008, Yek et al, 2010, Mestnik et al. 2010, Aimetti et al. 2012) or chronic periodontitis (ChP) (Winkel et al. 2001, Matarazzo et al. 2008, Cionca et al. 2009, Silva et al. 2011, Goodson et al. 2012). However, double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trials (RCTs) providing data beyond 6 months of follow-up for this therapy are still lacking in the literature.

The adjunctive use of MTZ has also shown to be effective in the treatment of ChP, as suggested by Loesche and co-workers in the 1980's and 1990's (Loesche et al. 1984, 1987, 1991). Recent RCTs have demonstrated that adjunctive systemic MTZ provides additional clinical benefits to the treatment of ChP, compared to those obtained with SRP alone (Haffajee et al. 2007, Matarazzo et al. 2008, Silva et al. 2011), SRP associated with AMX (Feres et al. 2001), azithromycin or low dose doxycycline (Haffajee et al. 2007), up to 1 year post-treatment.

We have recently compared the short-term clinical benefits of MTZ or MTZ+AMX in the treatment of ChP in smokers (Matarazzo et al. 2008) or non-smokers (Silva et al. 2011). The two antimicrobial protocols were superior to SRP in improving clinical parameters up to 3 months post-treatments. However, the two studies showed a tendency towards greater benefits for subjects taking the combination of MTZ+AMX. Rooney et al. (2002) also showed this same trend in a

prospective study of 6 months. No further longitudinal comparisons between these two drug protocols have yet been published.

The idea of introducing a strict plaque control as part of the active phase of periodontal treatment has been increasingly emphasized in the periodontal literature. Initially, some studies reported that weekly supragingival plaque removal during 3 months would enhance the clinical efficacy of SRP (Haffajee et al. 2003, Carvalho et al. 2004) or of SRP+MTZ (Carvalho et al. 2004). Afterwards, we demonstrated that chlorhexidine (CHX) rinsing could replace and even overcome the benefits of professional plaque removal (Feres et al. 2009). However, the potential of the prolonged use of CHX in improving the effects of systemic antibiotic still need to be further explored.

Therefore, the aim of this study was to evaluate and compare the clinical effects of the adjunctive use of MTZ or MTZ+AMX in the treatment of generalized ChP up to 1 year post-treatment. A secondary aim was to examine a possible additional effect of CHX to these antibiotic therapies.

Material and Methods

Sample size calculation

This study was designed to compare the clinical effects of three different periodontal treatments, SRP alone or combined with either MTZ or MTZ+AMX. The ideal sample size to assure adequate power for this RCT was calculated considering differences of at least 4 sites with PD \geq 5 mm between groups (Lang & Tonetti, 2003) and assuming a standard deviation of 5 sites (Mestnik et al. 2010). Based on these calculations, it was defined that 34 subjects per group would be necessary to provide

a 90% power with an α of 0.05. Considering an attrition of about 15%, it was established that at least 39 subjects should be included in each treatment group.

Subject population and inclusion/exclusion criteria

Subjects with untreated generalized ChP were selected from the population referred to the Periodontal Clinic of Guarulhos University (Guarulhos, SP, Brazil). Detailed medical, periodontal and dental histories were obtained. All eligible subjects were informed of the nature, potential risks and benefits of their participation in the study and signed a Term of Informed Consent. All subjects were in good general health and were diagnosed with generalized ChP based on the current classification of the American Academy of Periodontology (Armitage 1999). The inclusion criteria were as follows: ≥ 30 years of age and a minimum of 6 teeth with at least one site each with PD and clinical attachment level (CAL) ≥ 5 mm, as well as at least 30% of the sites with PD and CAL ≥ 4 mm and bleeding on probing (BOP). The exclusion criteria were as follows: previous subgingival periodontal therapy, pregnancy, nursing, smoking, systemic diseases that could affect the progression of periodontal disease, long-term administration of anti-inflammatory medications, need for antibiotic pre-medication for routine dental therapy, antibiotic therapy in the previous 6 months and allergy to MTZ, AMX or CHX.

Experimental design, allocation concealment and treatment protocol

In this double-blinded, factorial design, placebo-controlled RCT, each of the selected subjects was given a code number during the enrolment visit and the study coordinators (M.Fe. and L.C.F.) used a computer-generated table to allocate them to

one of the three therapeutic groups: SRP-control- (n=40), SRP+MTZ (400 mg T.I.D. for 14 days) (n=39); and SRP+MTZ (400 mg T.I.D. for 14 days) +AMX (500 mg T.I.D. for 14 days) (n=39). Subjects in the SRP group received two placebo pills and subjects in the MTZ group received one placebo pill, both T.I.D. for 14 days. The antibiotics and placebo administration started immediately after the first session of SRP.

In order to examine the role of chemical plaque control on the outcome of therapy, we employed a 2 x 3 factorial design and divided each therapy group into two subgroups assigned to CHX or placebo rinses, resulting in a total of 6 groups. A second randomization was performed in order to allocate half of the subjects in each group to rinse with 15 ml of 0.12% CHX or placebo rinsing for 1 min twice/day for 2 months, starting at the first day of the SRP treatment. Subjects were instructed to rinse in the morning, 30 min. after breakfast and tooth brushing; and at night also 30 min. after tooth brushing. Subsequently, a third randomization for the allocation of the two therapists was conducted.

During the initial phase, all subjects received instruction on proper home-care techniques and were given the same dentifrice (Colgate Total, Colgate Palmolive Co, São Bernardo do Campo, SP, Brazil) to use during the study period. The two examiners/therapists researchers (G.M.S.S. and J.A.V.M.), both trained periodontists, performed SRP in four to six appointments lasting approximately 1h each, using manual instruments and under local anesthesia. Treatment of the entire oral cavity was completed in 14 days. The end point for each SRP appointment was “smoothness of the scaled roots”, which was checked by one of the researchers (M.Fa.). The two therapists were randomized according to the different treatments so that each one treated the same number of patients in each group.

Pharmedica Pharmacy (São Paulo, SP, Brazil) prepared the antibiotics/ CHX rinsing/placebos and sent them to the study coordinators, who marked the code number of each subject on each bottle, according to the therapy assigned. The placebos and their respective active substances (antibiotic or CHX) were identical (i.e. same taste and color) to their counterparts and were placed in identical bottles (antibiotic) and flasks (mouthrinses). The coded bottles were given to the examiners, who at no time during the study had access to information about the contents of the bottles or assignment of subjects to therapies. In addition, all study personnel, including the biostatisticians and participants, were blinded to treatment assignment. Masking of CHX rinsing may have been hampered by tooth staining. However, the study is considered a double-blind RCT since blinding was fully implemented for the main aim, which was to test the three major therapies. Code breaking was performed after final statistical analysis. All subjects received clinical monitoring at baseline, 3 and 6 months, and 1 year post-therapies. This study protocol was approved by the Guarulhos University Clinical Research Ethics Committee.

Monitoring of compliance and adverse events

At the end of each week of medications (antibiotics or CHX) the subjects were asked to return to the clinic and bring the antibiotic/CHX/placebo bottles/flasks, which were checked for any possible remaining pills/liquid. At the end of the antibiotic/placebo and CHX/placebo treatments the subjects answered a questionnaire about any self-perceived side-effects. Two study assistants conducted this inquiry, and were also responsible for calling the subjects every two days to monitor antibiotic compliance. These assistants were neither examiners nor therapists in this study.

Clinical monitoring

The two examiners/therapists (G.M.S.S. and J.A.V.M.) participated in the calibration exercise and the standard error of measurement was calculated. Inter-examiner variability was 0.23 mm for PD and 0.25 mm for CAL. The mean intra-examiner variability was 0.19 mm (PD) and 0.24 mm (CAL) for the first examiner (G.M.S.S), and 0.21 mm (PD) and 0.26 mm (CAL) for the second examiner (J.A.V.M.). The average level of intra and inter-examiners agreement for the categorical variables was > 92% (Kappa test). One examiner carried out all clinical measurements in a given subject and treatment was performed by the second clinician. Visible plaque (0/1), gingival bleeding (0/1), BOP (0/1), suppuration (0/1), PD and CAL were measured at six sites per tooth (mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual and mesiolingual) in all teeth, excluding third molars. PD and CAL measurements were recorded to the nearest millimeter using a North Carolina periodontal probe (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

Primary and secondary outcome variables

The primary outcome variable was the difference among groups for the mean number of residual pockets with PD ≥ 5 mm post-treatment. Secondary outcome variables were differences among groups for the following parameters: mean PD and CAL changes in sites with initial PD between 4-6 mm and PD ≥ 7 mm; mean number and percentage of sites/subjects with PD ≥ 6 mm, PD ≥ 7 mm and PD ≥ 8 mm at 1 year post-treatment; mean number and percentage of sites with baseline PD showing reduction in PD and gain in CA ≥ 2 mm; mean full-mouth PD and CAL, percentage of

sites with BOP, plaque accumulation, gingival bleeding and suppuration, as well as differences in the occurrence of adverse events and the odds to achieve ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm at 1 year post-therapy.

Statistical Analysis

Each individual clinical parameter was computed per subject and then across subjects in both groups. Changes in PD and CAL in sites with initial PD 4–6 mm and ≥ 7 mm or the mean number/percentage of sites with PD ≥ 5 mm, ≥ 6 mm, ≥ 7 mm and ≥ 8 mm were averaged separately within the PD categories per subject and then across subjects in each group. The significance of differences within each group (over the course of the study) was sought using repeated measures ANOVA and Tukey's multiple comparison tests, and among groups (at each time point) using the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests. Chi-square test was used to compare the differences in the frequency of gender, of subjects exhibiting different categories of residual sites at 1 year of follow-up and of self-perceived adverse effects.

Two-way ANOVA was employed to test for interaction between the three treatment groups (i.e. SRP, SRP+MTZ, SRP+MTZ+AMZ) and CHX use (yes/no) and for significance of differences among the treatment groups and between CHX and placebo rinse subgroups (factorial design), for the primary outcome. Whenever differences among the groups/subgroups were found to be significant, Tukey's multiple comparison test (for the three treatment groups) and Bonferroni multiple comparisons test (for the six subgroups) were used to determine what pair(s) of comparisons were statistically significant.

A stepwise forward logistic regression analysis was performed in order to investigate the outcome variable: “presence of ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm at 1 year post-therapy (yes/no)”. The clinical predictor variables included age, gender, SRP, MTZ, MTZ+AMX, CHX, and the following clinical characteristics at baseline: mean PD and CAL, more than 25 sites with PD > 5 mm, percentage of sites with plaque, gingival inflammation, suppuration or BOP%. The level of significance was set at 5%. The data were evaluated using intention-to-treat analysis with last observation carried forward.

Results

Subject retention, adverse effects and compliance

The study was conducted between December 2009 and April of 2011. Figure 1 presents the flow diagram of the study design. One hundred and eighteen subjects entered the study at baseline and 17 subjects were lost over the course of the study (SRP=6, MTZ=6, MTZ+AMX=5).

Overall, adverse events were reported by 3 subjects from the control group, 8 from the MTZ group and 7 from the MTZ+AMX group, including: diarrhea (MTZ group, n = 1; MTZ+AMX group, n = 2); headache (MTZ group, n = 1; MTZ+AMX group, n = 5); metallic taste (control group, n = 1; MTZ group, n = 7 and MTZ+AMX group, n = 5); vomiting (MTZ group, n = 3; MTZ+AMX group, n = 3); irritability (control group, n = 2; MTZ group, n = 1 and MTZ+AMX group, n = 1). No statistically significant differences were observed among the three groups for the number of subjects reporting adverse events, or between the two antibiotic groups for the individual adverse effects reported ($p > 0.05$). All subjects reported that the

medications did not cause any major disturbance in their daily routine and that they would start the treatment again if necessary. 109 of the 118 subjects reported that they completed the course of the antibiotics, and this information was confirmed by pill counts. 3 subjects from the control group, 2 from the MTZ group and 3 from the MTZ+AMX group had from 1 to 5 pills left on the bottles at the end of the first and/or second weeks of the medication period. Additionally, one subject from the control group took all the MTZ-placebo pills during the first week. Therefore, he was told to take all the AMX-placebo pills during the second week.

Clinical findings

Table 1 presents demographic and full-mouth mean values for the clinical parameters evaluated at all time points. No statistically significant differences were observed among the three groups or among the six subgroups (data not shown) at baseline; and all treatments led to statistically significant improvements in all clinical parameters over the course of the study. Some differences were detected among groups at the follow-up appointments, such as a lower full-mouth mean PD and CAL in the two antibiotic groups in comparison with the control group at 1 year ($p < 0.05$)

All three main therapies were effective in reducing the number/percentage of sites with PD ≥ 5 mm with BOP during the course of the study ($p < 0.05$) (data not shown). Table 2 presents the mean number and mean percentage of sites with PD ≥ 5 mm (primary outcome of the RCT) and for other thresholds of PD at 1 year post-treatment. The two antibiotic groups had statistically significantly fewer sites with PD ≥ 5 mm, ≥ 6 mm, ≥ 7 mm and ≥ 8 mm compared to the SRP group. The two-way ANOVA demonstrated no interaction between treatment groups and CHX use for any

of the thresholds of residual pockets with interaction accounting for <0.1% of the total variance. Further, the two-way ANOVA revealed a highly significant main effect for the three treatment groups ($p < 0.001$) but no effect for CHX use (data not shown). Therefore, only data for the primary outcome were presented for the six subgroups. MTZ+AMX, MTZ+AMX+CHX and MTZ+CHX subgroups had fewer residual sites with $PD \geq 5$ mm than the two SRP subgroups at 1 year ($p < 0.05$). Although not statistically significant, at 1 year, the subgroup treated with SRP+MTZ+AMX+CHX showed with the lowest number of sites with $PD \geq 5$ mm (3.6) in comparison with the other three antibiotic subgroups (SRP+MTZ+AMX, 4.9; SRP+MTZ+CHX, 5.1; SRP+MTZ, 7.5). A per protocol analysis was also conducted for the primary outcome variable and the results were the same as those obtained in the intention-to-treat analysis.

Data for residual sites at subject level are presented in Table 3. The upper panel presents number and percentage of subjects exhibiting different thresholds of residual sites with $PD \geq 5$ mm according to the individual risk profile for periodontal disease progression proposed by Lang & Tonetti (2003). Fewer subjects in the MTZ ($n=11$), and in the MTZ+AMX ($n=9$) groups still had “high risk” for disease progression at 1 year (i.e. ≥ 9 sites with $PD \geq 5$ mm), in comparison with the SRP-only group ($n=25$). Conversely, 26 subjects in the MTZ+AMX group and only 9 in the SRP group showed “low risk” for disease progression (i.e. ≤ 4 sites with $PD \geq 5$ mm) at the end of the study period. This same trend was observed for subjects presenting different thresholds of residual sites with $PD \geq 6$ mm, ≥ 7 mm and ≥ 8 mm.

Table 4 presents the mean percentage of sites with baseline $PD \geq 5$ mm, which obtained a reduction in PD and a gain in CA ≥ 2 mm after treatment. The two antibiotic groups had a higher percentage of sites exhibiting this clinical improvement in comparison with the control group ($p < 0.05$).

The mean reduction in PD and gain in CA in sites with baseline PD between 4-6 mm (intermediate sites) and ≥ 7 mm (deep sites) between baseline and the follow-up appointments are described in Table 5. Subjects taking MTZ or MTZ+AMX had a statistically significantly greater reduction in PD and gain in CA than those receiving SRP-only at all time points for both baseline PD categories.

Stepwise forward multiple linear regression (Table 6) showed that the adjunctive use of MTZ and MTZ+AMX, were the only variables that significantly increased the probability of a subject presenting ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm at 1 year post-treatment (MTZ+AMX: odds ratio, 13.33; $p = 0.0000$; MTZ: odds ratio, 7.26; $p = 0.0004$). The variables evaluated were: the three main treatments applied (SRP, MTZ, MTZ+AMX), age, gender and the following characteristics at baseline: mean PD and CAL, more than 25 sites with PD ≥ 5 mm, percentage of sites with plaque, gingival inflammation, suppuration or BOP.

Discussion

One aspect of this study design that deserves attention was the choice of the primary outcome variable, which is one of the most important decisions while delineating a RCT (Greenstein et al. 2003, Pihlstrom & Barnett 2010). Traditionally, the RCTs testing different periodontal treatments have used mean changes in PD or CAL in initially deep sites (PD ≥ 7 mm) as the primary outcome variable (Guerrero et al. 2005, Matarazzo et al. 2008, Silva et al. 2011). However, the relevance of these parameters in defining treatment efficacy has recently been questioned (Sampaio et al. 2011). The real clinical significance of having a residual site with either 8 mm or 7mm is not evident, since both pockets would require additional treatment. On the

other hand, recent well-conducted studies of risk assessment reported that the presence of residual pockets after treatment, especially those with PD ≥ 5 mm, was one of the most important risk indicators for periodontal disease recurrence in subjects under periodontal maintenance from 3 to 27 years (average of 11.3 years) (Matuliene et al. 2008, 2010). Other authors have also discussed the association between presence of residual pockets and lack of periodontal stability (Lang & Tonetti 2003, Cionca et al. 2009). Therefore, the primary outcome variable of this study was set as the difference between groups for the mean number of sites with PD ≥ 5 mm after treatment.

The main finding of this study was that the groups receiving systemic antibiotics presented statistically significantly lower mean number/percentage of sites and of subjects with PD ≥ 5 mm (Tables 2 and 3) at 1 year post-treatment compared to the SRP-only group. The comparison among groups for the mean number of these residual sites at 1 year was quite remarkable: SRP = 16, SRP+MTZ = 6.3, SRP+MTZ+AMX = 4.7 (Table 2). According to Lang & Tonetti (2003) and Matuliene et al. (2008, 2010) subjects exhibiting ≥ 9 , 5-8 sites or ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm post-treatment are considered at “high”, “moderate”, or “low” risk for disease recurrence, respectively. Albeit all subjects included in this study presented ≥ 9 sites with PD ≥ 5 mm at baseline (mean number = 38.3 ± 20.5 sites/subject) (data not shown), this scenario was completely changed after treatment (Table 3). SRP alone was able to bring only 22.5% of the subjects to a “low risk” profile, as opposed to 61.6% and 66.7% reached by SRP+MTZ and SRP+MTZ+AMX, respectively. At 1-year, the majority of subjects ($n = 25$) in the SRP group still retained the “high risk” profile” for disease progression (i.e. ≥ 9 sites with PD ≥ 5 mm), as opposed to only 9 subjects in the MTZ+AMX group (Table 3).

We investigated some characteristic that could explain why these 9 subjects did not respond well to the antibiotic therapy and it was detected that 8 of them were among the 10 subjects with the deepest individual mean PD at baseline in this group. A similar, but weaker pattern was observed for the MTZ group (6 out of 11), and no association between worse-responders and baseline PD was observed in the SRP group (data not shown). This suggests that only subjects with very advanced disease would still need additional therapy, such as surgery, after being treated with SRP+MTZ+AMX. Conversely, SRP-only was not so predictable in this regard. The additional benefit of these two antibiotic protocols in reducing the frequency of sites with PD ≥ 5 mm has been reported in previous RCTs with 3-month (Winkel et al. 2001, Matarazzo et al. 2008, Silva et al. 2011) or 6-month (Cionca et al. 2009) follow-up. Moreover, the reduced need for periodontal surgery in subjects with ChP treated with adjunctive MTZ was suggested by Loesche and co-workers more than 20 years ago (Loesche et al. 1987, 1991, 2005).

Several additional analyses were conducted in the present study, including those related to other residual PD categories also considered important to appraise treatment success or need for further treatment. At 1 year post-treatment the two antibiotic groups presented statistically significantly fewer residual sites with PD ≥ 6 mm, ≥ 7 mm or ≥ 8 mm than the control group (Table 2). According to Matuliene et al. (2008), the presence of at least one site with PD ≥ 6 mm after active periodontal treatment is a significant risk factor for the progression of periodontitis in subjects under supportive periodontal treatment. It was quite unexpected to note that almost 60% of subjects taking MTZ+AMX (23 out of 39 subjects) did not present any residual site with PD ≥ 6 mm after 1 year, as opposed to only 20% (8 out of 40) who received SRP-only (Table 3).

Another key clinical observation in this RCT was the superiority of both antibiotic regimens in reducing mean PD and increasing gain in CA in initially intermediate (PD 4-6 mm) and deep (PD \geq 7 mm) sites (Table 5). The results for deep sites are quite elucidative in terms of reinforcing the noteworthy clinical benefit of these antibiotics, since these parameters have commonly been used as primary outcome variables in several RCTs. The benefits of the antibiotics in initially intermediate sites suggest that the added effect of these drugs may go beyond deep pockets.

When the two antibiotic treatments were directly compared, no statistically significant differences were detected. However, a tendency towards overall greater benefits for the MTZ+AMX regimen was observed for all clinical parameters evaluated, in agreement with our two previous short-term RCTs (Matarazzo et al. 2008, Silva et al, 2011), as well as with the study of Rooney et al. (2002). This slight superiority of the MTZ+AMX protocol was reinforced by the logistic regression analysis data. MTZ or MTZ+AMX were the only significant predictors for a subject with generalized ChP reach a “low risk” profile for disease progression (i.e. \leq 4 sites with PD \geq 5 mm) at 1 year post-treatment, with a higher OR for MTZ+AMX (OR=13.33) than for MTZ (OR=7.23). Hence, MTZ+AMX offered some clinical benefits over those attained with MTZ alone, with similar tolerability, since the frequency of adverse events did not differ between the two antibiotic protocols. Interestingly, several parameters that denote periodontal disease severity and extension were also included in the regression model, but none of them influenced the odds of a subject exhibiting \leq 4 sites with PD \geq 5 mm at 1 year of follow-up. Using backward stepwise logistic regression, Cionca et al. (2009) found that MTZ+AMX

was the only variable to predict whether a subject would still have more than one site with PD >4 mm at 6 months post-treatment.

The main advantage of the factorial design is the possibility of examining two or more experimental factors at the same time. Since no interaction was observed between the two factors tested in the present study (use of antibiotics and use of CHX), it was possible to examine the main effects of both at once. Therefore, even though this study was designed primarily to test the effects of the three main periodontal treatments, the factorial design allowed us to also test the impact of the CHX rinsing on the primary outcome. Our results did not support a major effect of CHX on the clinical outcome of these treatments. There was neither a significant interaction between CHX use and the three therapies tested, nor a significant effect of CHX use on the primary outcome. However, it is important to highlight that this study might be underpowered to compare the six subgroups and therefore, these data should be interpreted with caution. Nevertheless, the same trend for the three main groups was maintained for the 6 subgroups, namely, better overall clinical results for the subgroups treated with antibiotics, in comparison with the two treated with SRP-only. It is also worth noting that the subgroup treated with SRP+MTZ+AMX+CHX showed with the lowest number of sites with PD \geq 5 mm compared to the other three antibiotic subgroups at 1 year. Further, the use of CHX rinsing for two months brought the results of the SRP+MTZ closer to those achieved with SRP+MTZ+AMX. In fact, when the two MTZ subgroups were evaluated, only the subgroup rinsing with CHX presented statistically significantly fewer sites with PD \geq 5 mm in comparison with the control subgroups at 1 year (Table 2).

In conclusion, treatment of generalized ChP was significantly improved by the adjunctive use of MTZ+AMX and MTZ. The data could not demonstrate a significant additional benefit of CHX rinsing on the outcome of adjunctive antibiotic therapy.

References

- Aimetti M, Romano F, Guzzi N, Carnevale G. (2012) Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**:284-294.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal disease and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.
- Carvalho, L. H., D'Avila, G. B., Leao, A., Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Feres, M. (2004) Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. I. clinical results. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 1070-1076.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A. (2009) Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **80**, 364-371.
- Feres, M., Haffajee, A. D., Allard, K., Som, S. & Socransky, S. S. (2001) Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 597-609.
- Feres, M., Gursky, L. C., Favari, M., Tsuzuki, C.O & Figueiredo. L. C. (2009) Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 857-867.
- Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS, Kent R, Teles R, Hasturk H, Bogren A, Van Dyke T, Wennstrom J, Lindhe L. Control of Periodontal Infections: A randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. *Journal of Clinical Periodontology* (in press)

- Greenstein, G. (2003) Clinical versus statistical significance as they relate to the efficacy of periodontal therapy. *The Journal of the American Dental Association* **5**, 583-591.
- Guerrero, A., Griffiths, G. S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D. R., Laurell, L. & Tonetti, M. S. (2005) Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1096-1107.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003) Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *The American Academy of Periodontology* **8**, 115 –181.
- Haffajee, A. D., Torresyap, G. & Socransky, S. S. (2007) Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1 year results. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 243–253.
- Lang, N. P. & Tonetti, M. S. (2003) Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health & Preventive Dentistry* **1**, 7-16.
- Loesche, W. J., Syed, S. A., Morrison, E. C., Kerry, G. A., Higgins, T. & Stoll, J. (1984) Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *Journal of Periodontology* **55**, 325-335.
- Loesche, W. J., Schmidt, E., Smith, B. A., Caffessee, R. & Stoll, J. (1987) Metronidazole therapy for periodontitis. *Journal of Periodontology Research* **22**, 224–226.
- Loesche, W. J., Schmidt, E., Smith, B. A., Morrison, E. C., Caffesse, R. & Hujoel, P. P. (1991) Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. *Journal of Periodontology* **62**, 247–257.
- Loesche, W. J., Giordano, J. R., Soehren, S. & Kaciroti, N. (2005) The nonsurgical treatment of patients with periodontal disease: results after 6.4 years. *General Dentistry* **53**, 298-306.
- Matarazzo, F., Figueiredo, L. C., Cruz, S. E., Faveri, M. & Feres, M. (2008) Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 885-896.

- Matuliene, G., Pjetursson, B. E., Salvi, G. E., Schmidlin, K., Bragger, U., Zwahlen, M. & Lang, N. P. (2008) Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: Results after 11 years of maintenance. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 685-695.
- Matuliene, G., Studer, R., Lang, N. P., Schmidlin, K., Pjetursson, B. E., Salvi, G. E., Bragger, U. & Zwahlen, M. (2010) Significance of periodontal risk assessment in the recurrence of periodontitis and tooth loss. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 191–199.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Lira, E. A. G. & Faveri, M. (2010) Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 353–365.
- Pihlstrom, B. L. & Barnett, M. L. (2010) Design, operation, and interpretation of clinical trials. *Journal of Dental Research* **89**, 759-72.
- Rooney, J., Wade, W. G., Sprague, S. V., Newcombe, R. G. & Addy, M. (2002) Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 342-350.
- Sampaio, E., Rocha, M., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Duarte, P. M., Gomes Lira, E. A. & Feres, M. (2011) Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 838-846.
- Sanz M., Teughels W.; Group A of European Workshop on Periodontology (2008) Innovations in non-surgical periodontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, (8 Suppl):3-7.
- Silva, M. P., Feres, M., Siroto, T. A., Soares, G. M., Mendes, J. A., Faveri, M. & Figueiredo, L. C. (2011) Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, **38**, 828-837.

- Xajigeorgiou, C., Sakellari, D., Slini, T., Baka, A. & Konstantinidis, A. (2006) Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 254-264.
- van Winkelhoff, A. J., Rodenburg, J. P., Goené, R. J., Abbas, F., Winkel, E. G. & De Graaff, J. (1989) Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **16**, 128-131.
- Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., van der Velden, U. & van der Weijden, G. A. (2001) Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 296–305.
- Yek, E. C., Cintan, S., Topcuoglu, N., Kulekci, G., Issever, H. & Kantarci, A. (2010) Efficacy of amoxicillin and metronidazole combination for the management of generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **81**, 964-974.

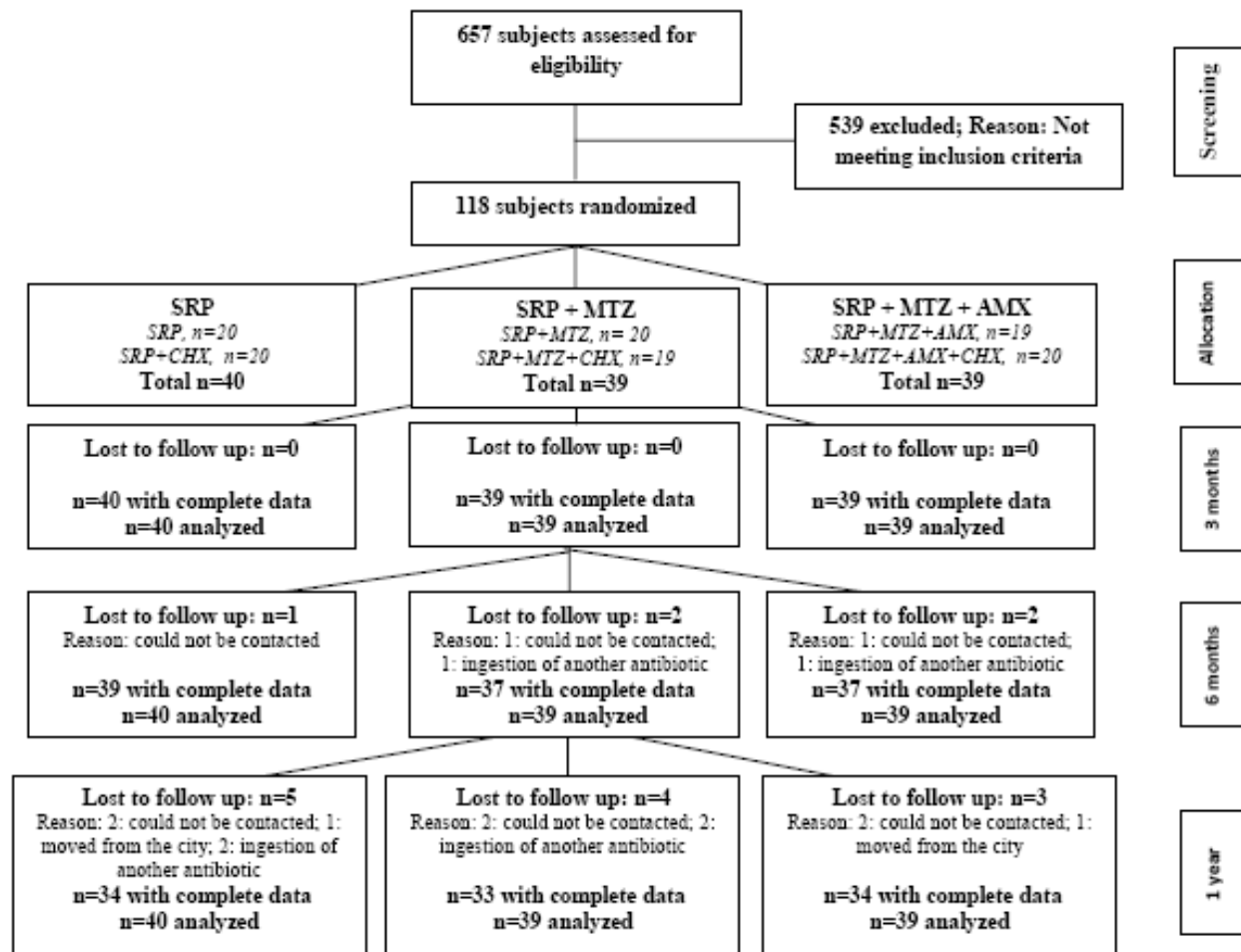


Figure 1. Flow chart of the study design. SRP, scaling and root planing; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin; CHX chlorhexidine.

Table 1. Demographic characteristics and mean \pm SD full-mouth clinical parameters at baseline and at follow-up visits.

Variable	Time Point	Treatment groups			One-way Anova p-value
		SRP n=40	SRP+MTZ n=39	SRP+MTZ+AMX n=39	
Gender (male/female)	Baseline	12/28	15/24	17/22	0.422
Age (years)	Baseline	45.8 \pm 8.54	43.4 \pm 8.26	46.3 \pm 8.59	0.257
<i>Mean number (%) of sites with:</i>					
PD \leq 3 mm	Baseline	52.7 \pm 16.6 (73.3 \pm 25.9)	55.2 \pm 14.2 (75.2 \pm 22.6)	53.6 \pm 17.1 (69.9 \pm 26.5)	0.779
PD \geq 4 mm	Baseline	47.3 \pm 16.6 (65.5 \pm 24.6)	44.8 \pm 14.2 (60.7 \pm 20.3)	46.4 \pm 17.1 (59.7 \pm 23.5)	0.779
PD \geq 5 mm	Baseline	29.6 \pm 14.9 (40.8 \pm 20.7)	26.2 \pm 13.0 (35.3 \pm 17.5)	30.0 \pm 17.4 (38.5 \pm 23.1)	0.482
PD \geq 6 mm	Baseline	17.2 \pm 13.1 (23.4 \pm 17.5)	14.0 \pm 9.9 (18.8 \pm 13.2)	17.3 \pm 15.9 (22.1 \pm 21.4)	0.466
PD \geq 7 mm	Baseline	9.2 \pm 9.4 (12.4 \pm 12.3)	6.2 \pm 6.2 (8.4 \pm 8.3)	9.1 \pm 13.4 (11.7 \pm 18.2)	0.333
PD \geq 8 mm	Baseline	5.0 \pm 7.7 (6.7 \pm 7.5)	3.0 \pm 3.9 (4.1 \pm 5.3)	5.2 \pm 7.1 (6.8 \pm 8.2)	0.372
PD (mm)	Baseline	3.84 \pm 0.73 ^A	3.69 \pm 0.56 ^A	3.88 \pm 0.98 ^A	0.514
	3 months	3.09 \pm 0.65 ^{B, a}	2.72 \pm 0.41 ^{B, a}	2.69 \pm 0.50 ^{B, b}	0.001
	6 months	3.03 \pm 0.61 ^{B, a}	2.69 \pm 0.42 ^{B, a}	2.58 \pm 0.41 ^{B, b}	0.000
	1 year	3.05 \pm 0.59 ^{B, a}	2.61 \pm 0.37 ^{B, b}	2.54 \pm 0.40 ^{B, b}	0.000
CAL (mm)	Baseline	4.32 \pm 0.97 ^A	4.09 \pm 0.75 ^A	4.33 \pm 1.08 ^A	0.441
	3 months	3.71 \pm 1.00 ^B	3.31 \pm 0.67 ^B	3.37 \pm 0.83 ^B	0.081
	6 months	3.64 \pm 0.98 ^B	3.28 \pm 0.65 ^B	3.31 \pm 0.79 ^B	0.100
	1 year	3.59 \pm 0.89 ^{B, a}	3.19 \pm 0.59 ^{B, b}	3.23 \pm 0.74 ^{B, b}	0.036
<i>% of sites with</i>					
Plaque accumulation	Baseline	78.9 \pm 15.6 ^A	77.0 \pm 16.4 ^A	78.0 \pm 15.1 ^A	0.875
	3 months	46.0 \pm 28.1 ^B	44.4 \pm 23.3 ^B	42.8 \pm 24.6 ^B	0.849
	6 months	37.4 \pm 26.2 ^B	34.0 \pm 23.9 ^B	35.4 \pm 25.0 ^B	0.826
	1 year	38.8 \pm 24.2 ^B	38.8 \pm 22.5 ^B	35.4 \pm 21.1 ^B	0.742
Gingival bleeding	Baseline	36.6 \pm 26.2 ^A	37.1 \pm 23.4 ^A	31.7 \pm 27.8 ^A	0.604
	3 months	21.1 \pm 19.8 ^B	21.8 \pm 21.5 ^B	12.7 \pm 15.9 ^B	0.069
	6 months	17.3 \pm 20.9 ^B	14.0 \pm 16.9 ^B	10.8 \pm 16.9 ^B	0.297
	1 year	13.0 \pm 16.7 ^B	11.5 \pm 16.1 ^B	8.9 \pm 13.6 ^B	0.742
Bleeding on probing	Baseline	70.6 \pm 23.8 ^A	74.6 \pm 17.5 ^A	63.7 \pm 21.8 ^A	0.077
	3 months	43.1 \pm 31.5 ^{B, a}	40.5 \pm 28.8 ^{B, a}	26.4 \pm 26.7 ^{B, b}	0.025
	6 months	26.4 \pm 30.3 ^B	20.8 \pm 26.5 ^B	16.9 \pm 25.8 ^B	0.309
	1 year	23.5 \pm 25.8 ^B	16.8 \pm 23.2 ^B	11.4 \pm 18.9 ^B	0.064
Suppuration	Baseline	1.1 \pm 2.7 ^A	1.8 \pm 6.2 ^A	3.9 \pm 8.7 ^A	0.122
	3 months	0.3 \pm 1.0 ^B	0.1 \pm 0.3 ^B	0.0 \pm 0.1 ^B	0.162
	6 months	0.6 \pm 2.4 ^B	0.1 \pm 0.0 ^B	0.0 \pm 0.0 ^B	0.151
	1 year	0.8 \pm 2.6 ^B	0.1 \pm 0.3 ^B	0.1 \pm 0.2 ^B	0.056

The significance of differences between baseline and the follow-up visits was assessed using repeated measures ANOVA and Tukey's multiple comparison tests (different capital letters indicate significant differences between time points). The significance of differences among groups at each time point was assessed using the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests (different small letters indicate significant differences between pairs of groups). SRP; scaling and root planing; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin; PD, probing depth; CAL, clinical attachment level; SD, standard deviation.

Table 2. Mean number (mean percentage) \pm SD of sites with PD \geq 5 mm, as well as of sites with PD \geq 6 mm, \geq 7 mm, \geq 8 mm at 1-year post-treatment.

PD category threshold	Treatment groups						Two-way ANOVA p-value
	SRP (n=40)		SRP+MTZ (n=39)		SRP+MTZ+AMX (n=39)		
	16.1 \pm 15.6 (12.0 \pm 11.4) ^a		6.3 \pm 7.3 (4.5 \pm 5.1) ^b		4.7 \pm 6.0 (3.6 \pm 4.6) ^b		<0.000
PD \geq 5 mm	Placebo (n=20)	CHX (n=20)	Placebo (n=20)	CHX (n=19)	Placebo (n=19)	CHX (n=20)	
	16.4 \pm 13.9 (12.6 \pm 10.4) ^a	14.9 \pm 17.6 (11.0 \pm 12.6) ^a	7.5 \pm 7.8 (5.2 \pm 5.6)	5.1 \pm 6.7 (3.7 \pm 4.6) ^b	4.9 \pm 7.4 (3.0 \pm 2.8) ^b	3.6 \pm 3.8 (2.6 \pm 2.0) ^b	0.000
PD \geq 6 mm	6.9 \pm 10.0 (5.2 \pm 7.4) ^a		2.3 \pm 3.4 (1.6 \pm 2.4) ^b		1.2 \pm 2.2 (1.0 \pm 1.7) ^b		0.000
PD \geq 7 mm	2.9 \pm 4.9 (2.3 \pm 3.7) ^a		0.5 \pm 1.0 (0.4 \pm 0.8) ^b		0.3 \pm 0.7 (0.3 \pm 0.6) ^b		0.000
PD \geq 8 mm	1.7 \pm 3.0 (1.3 \pm 2.3) ^a		0.2 \pm 0.6 (0.2 \pm 0.5) ^b		0.1 \pm 0.3 (0.1 \pm 0.2) ^b		0.000

The significance of differences among groups at each time point was assessed using the two-way ANOVA test. The significance of differences between pairs of comparisons was determined using Tukey's multiple comparison test (for the three main groups) and post-hoc Bonferroni multiple comparison tests (for the six subgroups) and the significances are represented by different small letters. *SRP*, scaling and root planing; *MTZ*, metronidazole; *AMX*, amoxicillin; *CHX*, chlorhexidine PD, probing depth; *SD*, standard deviation.

Table 3. Number and percentage of subjects presenting low (≤ 4 sites with $PD \geq 5$ mm), moderate (5-8 sites with $PD \geq 5$ mm) or high (≥ 9 sites with $PD \geq 5$ mm) risk for disease progression according to Lang & Tonetti (2003) as well as presenting 0, 1-2 or ≥ 3 sites with $PD \geq 6$, ≥ 7 and ≥ 8 mm at 1 year post-treatment.

Variable	Categories	Treatment groups			Chi-square p-value
		SRP	SRP+MTZ	SRP+MTZ+AMX	
Risk for disease progression	Low risk	09 (22.5%)	24 (61.6%)	26 (66.7%)	0.001
	Moderate risk	06 (15.0%)	4 (10.2%)	4 (10.2%)	
	High risk	25 (62.5%)	11 (28.2%)	9 (23.1%)	
No. of $PD \geq 6$ mm	0	8 (20.0%)	19 (48.7%)	23 (59.0%)	0.001
	1-2	7 (17.5%)	9 (23.1%)	9 (23.1%)	
	≥ 3	25 (62.5%)	11 (28.2%)	7 (17.9%)	
No. of $PD \geq 7$ mm	0	17 (42.5%)	29 (74.4%)	31 (79.5%)	0.001
	1-2	09 (22.5%)	07 (17.9%)	06 (15.4%)	
	≥ 3	14 (35.0%)	3 (7.7%)	2 (5.1%)	
No. of $PD \geq 8$ mm	0	21 (52.5%)	34 (87.2%)	36 (92.3%)	0.001
	1-2	11 (27.5%)	4 (10.2%)	3 (7.7%)	
	≥ 3	8 (20.0%)	1 (2.6%)	0 (0%)	

The significance of differences among groups was assessed using the Chi-square test. *PD*, probing depth; *SRP*, scaling and root planing; *MTZ*, metronidazole; *AMX*, amoxicillin.

Table 4. Mean % (\pm SD) of sites with baseline PD \geq 5mm that obtained a PD reduction and CA gain \geq 2mm at 3 months, 6 months and 1 year post-therapy.

Variables	Time point	Treatment groups			One-way ANOVA p-value
		SRP	SRP+MTZ	SRP+MTZ+AMX	
PD reduction and CA gain \geq 2mm	3 months	15.7 \pm 8.1 ^a	20.6 \pm 11.8 ^b	24.5 \pm 13.0 ^b	0.002
	6 months	18.2 \pm 9.2 ^a	22.0 \pm 11.9	26.9 \pm 15.0 ^b	0.008
	1 year	18.5 \pm 10.2 ^a	23.8 \pm 12.5 ^b	28.7 \pm 15.8 ^b	0.003

The significance of differences among groups at each time point was assessed using the one-way ANOVA and Tukey multiple comparison tests (different small letters indicate significant differences between pairs of groups). *SRP*, scaling and root planing; *MTZ*, metronidazole; *AMX*, amoxicillin; *PD*, probing depth; *CA*, clinical attachment; *SD*, standard deviation

Table 5. Mean PD reduction and CA gain (\pm SD) between baseline and 3 months, 6 months and 1 year post-therapy.

Baseline PD	Variable	Time	Treatment groups			One-way ANOVA p-value
			SRP	SRP+MTZ	SRP+MTZ+AMX	
4-6 mm	PD reduction	0-3 months	1.2 \pm 0.5 ^a	1.5 \pm 0.5 ^b	1.7 \pm 0.5 ^b	0.000
		0-6 months	1.3 \pm 0.5 ^a	1.6 \pm 0.6 ^b	1.8 \pm 0.5 ^b	0.000
		0-1 year	1.3 \pm 0.5 ^a	1.7 \pm 0.5 ^b	1.9 \pm 0.5 ^b	0.000
	CA gain	0-3 months	1.0 \pm 0.5 ^a	1.3 \pm 0.5 ^b	1.4 \pm 0.4 ^b	0.000
		0-6 months	1.1 \pm 0.4 ^a	1.4 \pm 0.5 ^b	1.5 \pm 0.4 ^b	0.000
		0-1 year	1.2 \pm 0.5 ^a	1.4 \pm 0.5 ^b	1.6 \pm 0.4 ^b	0.000
\geq 7 mm	PD reduction	0-3 months	2.6 \pm 1.0 ^a	3.3 \pm 0.8 ^b	3.7 \pm 0.7 ^b	0.000
		0-6 months	2.9 \pm 1.3 ^a	3.6 \pm 1.0 ^b	4.0 \pm 0.8 ^b	0.000
		0-1 year	3.1 \pm 1.4 ^a	3.9 \pm 0.9 ^b	4.1 \pm 0.7 ^b	0.000
	CA gain	0-3 months	2.0 \pm 0.9 ^a	2.7 \pm 0.9 ^b	3.0 \pm 0.6 ^b	0.000
		0-6 months	2.3 \pm 1.1 ^a	2.9 \pm 0.9 ^b	3.2 \pm 0.7 ^b	0.000
		0-1 year	2.6 \pm 1.2 ^a	3.1 \pm 1.1 ^b	3.4 \pm 0.8 ^b	0.000

The significance of differences among groups at each time point was assessed using the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests (different small letters indicate significant differences between pairs of groups). SRP, scaling and root planing; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin; PD, probing depth; CA, clinical attachment; SD, standard deviation.

Table 6 – Stepwise forward multiple linear regression model for “presence of ≤ 4 sites with $PD \geq 5$ mm”, i.e. low risk for periodontal disease recurrence (Lang & Tonetti, 2003) at 1 year post-therapy. The variables included in the model were: age, gender, the three main treatments applied (SRP, MTZ, MTZ+AMX) and the following clinical characteristics at baseline: mean PD and CAL, more than 25 sites with $PD \geq 5$ mm, percentage of sites with plaque, gingival inflammation, suppuration or BOP.

Variables	Coefficient	SE	Odds ratio	95% CI	p-value
MTZ+AMX	2.60	0.65	13.3	3.8 - 47.4	0.0000
MTZ	1.98	0.59	7.3	2.3 - 23.30	0.0004

Analysis was terminated when the p value of an entering variable was >0.10 . Overall p value = 0.0000001.

SRP, scaling and root planing; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin; PD, probing depth; CAL, clinical attachment level; BOP, bleeding on probing; SE, standard error; CI, confidence interval.

CAPÍTULO 2 – Resultados microbiológicos

Os resultados obtidos nas avaliações microbiológicas estão representados nas figuras 1 a 5. Os níveis (média de contagem $\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas avaliadas no início do estudo, aos 3 e 6 meses e 1 ano pós-RAR estão apresentados na Figura 1. No início do estudo o perfil microbiano observado apresentava altos níveis das espécies dos complexos vermelho e laranja e baixos níveis das espécies compatíveis com saúde, como os *Actinomyces* e espécies dos complexos roxo, amarelo e verde. De forma geral, a média de contagem da maioria das espécies compatíveis com o hospedeiro aumentou ao longo do estudo enquanto que os níveis das três espécies do complexo vermelho e sete espécies do complexo laranja reduziram significativamente em todos os grupos. Comparando os três grupos em um ano pós-tratamento foi observado que os dois grupos teste (RAR+MTZ, RAR+MTZ+AMX) apresentaram diferença estatisticamente significante, com menos patógenos do que o grupo controle (RAR), incluindo as três espécies do complexo vermelho, *E. nodatum*, *F. nuc. polymorphum* e *P. intermedia*.

A figura 2 apresenta a média das proporções dos complexos microbianos (SOCRANSKY et al. 1998) nos três grupos terapêuticos no início do estudo e um ano pós-tratamento. No início do estudo todos os grupos apresentavam altas proporções dos complexos vermelho e laranja e baixas proporções das espécies de *Actinomyces*. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os três grupos, no início do estudo. Um ano após o tratamento todas as terapias levaram a alterações nos perfis microbianos. Todas as terapias reduziram as proporções do complexo vermelho, mas essa redução foi mais profunda nos dois grupos testes, que mostraram proporções menores dessas espécies em comparação com o grupo que recebeu apenas RAR, e essas diferenças foram estatisticamente significativas. Todos os tratamentos também reduziram as proporções do complexo laranja e aumentaram as proporções dos complexos verde e das espécies de *Actinomyces* ($p < 0.05$). Em 1 ano após as terapias, o grupo que associou MTZ e AMX à RAR mostrou maiores proporções das espécies dos *Actinomyces* quando comparado com o grupo que recebeu apenas RAR ou RAR+MTZ.

Para uma avaliação mais detalhada das mudanças nas proporções de algumas espécies, a figura 3 mostra as alterações na média das proporções das

espécies de *Actinomyces* e dos complexos Vermelho + Laranja entre o início do tratamento e 1 ano pós-terapia para os três grupos de tratamento. As três terapias levaram a um aumento das proporções das espécies de *Actinomyces*, porém essa alteração foi significativamente maior no grupo que recebeu RAR associada ao MTZ+AMX. Em relação à redução das espécies do complexo vermelho e laranja, os dois grupos que receberam antibioticoterapia foram mais efetivos do que a RAR sozinha ($p < 0.05$).

A média das proporções dos complexos microbianos em 1 ano após os tratamentos é apresentada novamente na figura 4, mas agora em sítios que no início do tratamento tinham PS ≥ 5 mm ou ≤ 4 mm. Os dois protocolos de antibioticoterapia foram mais efetivos que a RAR em alterar os perfis microbianos nos sítios inicialmente profundos (PS ≥ 5 mm), o que é confirmado pela baixa proporção de complexo vermelho nesses dois grupos de tratamento em um ano de reavaliação ($p < 0.05$). Esse mesmo benefício foi observado nos sítios com PS até 4mm.

A figura 5 apresenta a média das proporções dos complexos microbianos em 1 ano após terapia nos seis subgrupos, que receberam ou não CLX, em sítios rasos e profundos. Todas as três terapias testadas mostraram melhoras nos perfis microbiológicos subgengivais quando a CLX foi associada. Apesar de não ter atingido significância estatística, o uso desse antisséptico por 2 meses foi efetivo em acentuar a redução na proporção do complexo vermelho e o aumento na proporção das espécies de *Actinomyces*, principalmente nos sítios rasos. Pode-se observar que quando a CLX foi usada o complexo vermelho mostrou uma redução de 10% para 7% no grupo controle, de 4% para 2% no grupo do MTZ e de 4% para menos de 1% no grupo do MTZ+AMX nos sítios inicialmente rasos. Ao mesmo tempo, as espécies de *Actinomyces* foram de 26 para 30%, de 24 para 33% e de 38 para 44%, respectivamente. De forma geral o melhor perfil microbiano foi alcançado nos sítios rasos, com a combinação das quatro terapias (RAR+MTZ+AMX+CLX).

DISCUSSÃO

A associação de terapias no tratamento da doença periodontal crônica tem mostrado benefícios clínicos e microbiológicos. Dentre os antibióticos sistêmicos

utilizados no tratamento da periodontite crônica, o MTZ e a combinação de MTZ e AMX têm sido apontados como promissores (FERES et al., 2001; WINKEL et al., 2001; ROONEY et al., 2002; CARVALHO et al., 2004 e 2005; HAFFAJEE et al., 2007; MOEINTEGHAVI et al., 2007; MATARAZZO et al., 2008; CIONCA et al., 2009 e 2010; SILVA et al., 2011; GOODSON et al., 2012; MDALA et al., 2012). Da mesma forma, o controle rigoroso da placa supragengival durante e após a RAR parece oferecer benefícios adicionais, principalmente quando a CLX é utilizada (XIMENEZ-FYVIE et al., 2000b; HAFFAJEE et al., 2003a; CARVALHO et al., 2004 e 2005; FAVERI et al., 2006b e FERES et al., 2009). Porém, até o momento nenhum estudo clínico aleatorizado e controlado por placebo havia comparado os efeitos na composição da placa subgengival da utilização adjunta do MTZ com os obtidos com MTZ+AMX, além de 3 meses; ou da terapia de MTZ+AMX além de 6 meses. Adicionalmente, os efeitos microbiológicos do uso prolongado da CLX associado à antibioticoterapia sistêmica ainda não foram avaliados. Logo, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos na composição da microbiota subgengival da terapia de RAR associada ou não ao MTZ ou ao MTZ+AMX; e como objetivo secundário, avaliar os efeitos adicionais do uso prolongado de CLX nessas terapias.

Antes de iniciar a discussão dos dados obtidos no presente estudo, alguns aspectos relacionados à metodologia empregada no presente estudo serão abordados. A dosagem e a duração ideais para a administração do MTZ somente ou em combinação com a AMX no tratamento das doenças periodontais ainda não estão determinadas. Diversos estudos avaliaram os efeitos da administração sistêmica desses antibióticos em dosagens que variaram de 200 a 500 mg 3 vezes ao dia (LOESCHE et al., 1984; 1992; 2002; 2005; PALMER et al., 1998 e 1999; FERES et al., 2001; CARVALHO et al., 2004 e 2005; GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIU et al., 2006; MOREIRA & FERES FILHO, 2007; HAFFAJEE et al., 2007 e 2008; SILVA et al. 2011; GOODSON et al. 2012; MDALA et al., 2012), dando embasamento para a dosagem administrada no presente estudo: 400mg de MTZ e 500mg de AMX 3 vezes ao dia. Essa dosagem está de acordo com a recomendação de Montvale (1992) no *Physicians Desk Reference (Medical Economics Staff)*, de até 1.500 mg/dia de metronidazol para tratar infecções anaeróbias; e da ANVISA (DICIONÁRIO de ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS, 2007), que aprova a utilização de até 1.500 mg/dia de amoxicilina para o tratamento de infecções. O

protocolo de duração da administração dos antibióticos por 14 dias, iniciando junto com a RAR, foi determinado de acordo com os estudos de Haffajee et al. (2007 e 2008), Matarazzo et al. (2008), Silva et al. (2011), Goodson et al. (2012) e Mdala et al. (2012). Vale destacar que a utilização desses antibióticos por duas semanas está dentro dos limites biológicos aceitáveis e tem sido utilizada no tratamento de outras infecções, como no caso de úlceras gástricas causadas por *Helicobacter pylori* (UYGUN et al., 2007). Além disso, essa escolha visou disponibilizar a droga no ambiente subgengival pelo tempo em que a RAR estivesse sendo realizada. O melhor momento para a administração da antibioticoterapia também ainda não está definido em periodontia. Alguns estudos iniciaram a administração dos antibióticos logo após a RAR realizada por quadrantes (LOESCHE et al., 1992; ROONEY et al., 2002; CARVALHO et al., 2004 e 2005) enquanto outros o fizeram concomitantemente ao procedimento mecânico (FERES et al., 2001; HAFFAJEE et al., 2007 e 2008; MATARAZZO et al., 2008; SILVA et al. 2011; GOODSON et al. 2012; MDALA et al. 2012). Uma forte razão para iniciar as terapias ao mesmo tempo é a redução drástica e rápida da maioria das espécies bacterianas subgengivais, que parece ser um ponto crucial para provocar uma alteração mais benéfica no perfil microbiológico subgengival (HAFFAJEE et al., 2008).

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

Os dados microbiológicos mostraram que as associações de antibióticos sistêmicos levaram a efeitos benéficos superiores na composição da microbiota subgengival aos obtidos somente com a RAR. Apesar de que todas as terapias utilizadas no presente estudo levaram a uma melhora no perfil microbiológico subgengival em 1 ano após os tratamentos, os dois grupos que receberam antibióticos sistêmicos apresentaram níveis e proporções significativamente menores

dos 3 patógenos do complexo vermelho. Uma vantagem adicional foi observada para a utilização dos dois antibióticos, uma vez que os indivíduos que tomaram MTZ+AMX obtiveram maiores proporções das espécies benéficas de *Actinomyces*. Em relação ao grupo de RAR é importante destacar que as proporções de complexo vermelho observadas após 1 ano (11.6%) foram semelhantes ou até mesmo inferiores às observadas em outros estudos que também utilizaram o *checkerboard DNA-DNA hybridization* para avaliação microbiológica (CUGINI et al., 2000; CARVALHO, 2002; HAFFAJEE et al. 2008; FERES et al., 2009), sugerindo que os resultados microbiológicos obtidos com a RAR estavam dentro dos esperados para esse tipo de terapia. Esse é um dado importante, pois remete a uma questão fundamental recentemente levantada por Cionca et al. (2009), que é a importância de se obter excelentes resultados com a terapia controle para permitir uma avaliação clara dos efeitos adicionais das terapias adjuntas.

A associação do MTZ ou do MTZ+AMX à RAR no presente estudo levou a alterações no perfil microbiológico mais benéficas do que as obtidas com a terapia mecânica sozinha. Os níveis e proporções das três espécies bacterianas do complexo vermelho ficaram em níveis e proporções estatisticamente mais baixos no grupo que recebeu antibióticos sistêmicos do que no grupo que recebeu apenas RAR, em 1 ano após os tratamentos (Figuras 1 a 4). Enquanto o grupo controle apresentava 11.6% remanescente de complexo vermelho em 1 ano após terapia, o grupo que recebeu MTZ apresentava 4.5% e o que recebeu MTZ+AMX 3.7% (Figura 2). Esse dado pode ser confirmado na figura 3, que mostra que nos grupos MTZ e MTZ+AMX houve uma redução na média de 30% do complexo vermelho e laranja, enquanto que no grupo controle a redução foi de 18%. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que também associaram esses antibióticos no tratamento da periodontite crônica e em geral mostraram resultados clínicos e microbiológicos melhores do que os obtidos somente com a terapia mecânica tanto com a utilização do MTZ (JOYSTON-BECHAL et al., 1986; LOESCHE et al., 1992; WINKEL et al., 1997; FERES et al., 2001; HAFFAJEE et al., 2003, 2007 e 2008; CARVALHO et al., 2004 e 2005) quanto com a utilização do MTZ+AMX (VAN WINKELHOFF et al., 1989 e 1992; EHMKE et al., 2005; PAHKLA et al., 2006; MOEINTAGHAVI et al., 2007; MATARAZZO et al., 2008; CIONCA et al., 2009; SILVA et al. 2011; GOODSON et al. 2012; MDALA et al. 2012).

Quando os efeitos das duas terapias antibióticas foram comparados, o grupo que recebeu MTZ+AMX mostrou algumas vantagens, como por exemplo, proporções mais altas das espécies de *Actinomyces* ($p < 0.05$), que é um efeito terapêutico desejado e importante. É difícil a comparação desses resultados com outros estudos da literatura, uma vez que os efeitos no perfil microbiológico da RAR associada ao MTZ ou ao MTZ+AMX ainda não haviam sido diretamente comparados no longo prazo. Porém, os resultados aqui apresentados corroboram com estudos de curto prazo (3 meses de acompanhamento) que mostraram benefícios microbiológicos e clínicos adicionais da terapia de MTZ+AMX sobre a terapia adjunta de MTZ (MATARAZZO et al. 2008; SILVA et al. 2011). Além disso, os dados aqui apresentados sugerem que esses benefícios são mantidos por pelo menos um ano.

Fundamentos biológicos e ecológicos podem explicar os efeitos benéficos dos antibióticos sistêmicos utilizado nesse estudo. Sabe-se que o MTZ possui espectro de ação direcionado para bactérias anaeróbias estritas, como é o caso dos três patógenos do complexo vermelho. Uma hipótese que pode explicar o efeito sinérgico da AMX, é que por ser um antibiótico de amplo espectro, a AMX atuaria sobre quase todas as demais espécies subgengivais, ajudando a reduzir rapidamente as contagens totais desses microrganismos. Acredita-se que a redução drástica e rápida da maioria das espécies bacterianas subgengivais seja um ponto crucial para permitir a recolonização dos sítios tratados por colonizadores primários benéficos dos complexos, roxo, amarelo e verde, espécies de *Actinomyces*, que por sua vez impediriam a recolonização do grupo vermelho (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). O restabelecimento desse perfil microbiológico de saúde periodontal poderia contribuir para a manutenção dos resultados clínicos benéficos, obtidos inicialmente, por longos períodos.

A aleatorização dos 3 grupos de tratamento principais em 6 subgrupos teve o objetivo de avaliar a ação do uso prolongado da CLX sobre o resultados das terapias empregadas (Figura 5). As mesmas tendências observadas nos 3 grupos principais para as reduções nos patógenos periodontais (Figuras 1 a 4) foram mantidas na comparação entre os 6 subgrupos, ou seja, os subgrupos tratados com antibióticos sistêmicos apresentaram proporções significativamente reduzidas de complexo vermelho em comparação com o subgrupo controle que não bochechou com CLX. Porém, essa diferença não foi significativa na comparação com o

subgrupo controle que bochechou com CLX, sugerindo um benefício adicional da CLX sobre a RAR.

Nenhuma diferença estaticamente significativa foi observada entre os dois subgrupos (que bochecharam ou não com CLX) dentro das terapias principais. Porém, vale destacar que a falta de significância estatística nesse caso pode estar relacionada com o tamanho da mostra, uma vez que o cálculo de poder desse estudo foi originalmente realizado utilizando-se uma variável clínica primária clínica para a comparação das 3 terapias principais, como descrito no Capítulo 1. Esse pode ser apontado como uma limitação do desenho experimental do presente estudo. Posto isso, as tendências mostradas pelos dados, mesmo que não tenham sido estatisticamente significativas, devem ser consideradas. Por exemplo, observa-se na Figura 5 que o uso da CLX levou a uma melhora nos resultados obtidos pela RAR onde foi observado uma redução do complexo vermelho de 10 para 7% em sítios inicialmente rasos e de 19 para 8%, em sítios inicialmente profundos (Figura 5), nos subgrupos que não bochecharam ou bochecharam com CLX, respectivamente. Esses achados corroboram com os de Feres et al. (2009), que também observaram maiores reduções nos patógenos do complexo vermelho com o uso do bochecho de CLX associado à RAR e durante o período de cicatrização. Em relação aos grupos que receberam antibióticos sistêmicos, os efeitos adicionais da CLX foram mais evidentes nos sítios inicialmente rasos, que chegaram ao final do período experimental com a metade (subgrupo de MTZ+CLX) ou um quarto (subgrupo MTZ+AMX+CLX) da proporção de complexo vermelho observadas nos subgrupos que não bochecharam com CLX. Além disso, esses dois subgrupos apresentaram de 20 a 30% a mais de *Actinomyces* em relação aos subgrupos controle-CLX. A comparação dos perfis microbiológicos nos sítios inicialmente rasos entre o subgrupo controle que não bochechou com CLX com o subgrupo MTZ+AMX que bochechou parece bem impactante. Enquanto os sítios rasos do subgrupo controle que não recebeu nenhuma terapia adicional permanecia com 10% de complexo vermelho, o subgrupo teste que associou todas as terapias apresentava menos de 1% desses patógenos, após 1 ano de acompanhamento (figura 5). Esses resultados são muito importantes e sugerem uma vantagem clínica para a combinação de RAR e MTZ+AMX+CLX, uma vez que essas espécies são intimamente relacionadas com o início e progressão da periodontite crônica e a redução desses patógenos é

fundamental para que os níveis de inserção clínica sejam mantidos estáveis ao longo do tempo (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005; HAFFAJEE et al., 2006; TELES et al., 2006). É interessante observar que mesmo nesses sítios rasos, onde o procedimento de RAR é normalmente considerado mais efetivo, as associações de terapias, foram mais efetivas em alterar o perfil microbiológico nesses sítios do que a RAR somente.

No geral, os níveis e as proporções das espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro dos complexos roxo, amarelo e verde mantiveram-se estáveis ou aumentaram após as terapias. Porém, nota-se um efeito positivo adicional no aumento das proporções das espécies de *Actinomyces* com o uso de antibioticoterapia (figuras 2 e 3). Os indivíduos que receberam RAR associada ao MTZ ou MTZ+AMX tiveram aumentos significativos nas proporções dessas espécies. E a associação de MTZ+AMX+CLX alcançou proporção ainda maior de *Actinomyces*, após 1 ano de acompanhamento (figura 5). Os estudos que avaliaram os efeitos da RAR em combinação com bochechos de CLX (FERES et al., 2009) ou com MTZ+AMX (MATARAZZO et al., 2008) também observaram um efeito positivo da CLX ou desses dois antibióticos em aumentar as proporções dos *Actinomyces*. Por outro lado, a RAR somente foi o tratamento que menos aumentou as proporções das espécies benéficas (Figuras 2). Esses resultados são muito importantes, pois vão ao encontro dos objetivos microbiológicos da terapia periodontal, que é alterar drasticamente o biofilme e permitir uma recolonização mais compatível com saúde e que possa ser mantida ao longo do tempo (TELES et al. 2006). Ao mesmo tempo, corroboramos com estudos anteriores que demonstraram que a associação da antibioticoterapia à RAR teria uma maior capacidade de causar essas profundas alterações microbiológicas e assim permitir que os benefícios clínicos possam ser mantidos em longo prazo (SOCRANSKY & HAFFAJEE 2005, HAFFAJEE et al. 2006).

Considerando todas as alterações microbiológicas aqui descritas pode-se dizer que, de forma geral, as modificações mais benéficas na composição do biofilme subgengival, incluindo reduções nos patógenos e aumento de espécies benéficas foram obtidas com a combinação de antibioticoterapia, tendo sido observado um benefício adicional para o grupo que associou todas as quatro terapias (RAR+MTZ+AMX+CLX), embora sem diferença estatisticamente

significante, principalmente devido aos baixíssimos níveis e proporções das espécies do complexo vermelho encontrados nesses indivíduos em 1 ano de observação. Logo a seguir, podemos ver a terapia de RAR+MTZ e RAR+MTZ+AMX com uma vantagem para o grupo controle na redução dos patógenos do complexo vermelho e aumento dos *Actinomyces*. A terapia que menos alterou a composição da microbiota subgengival foi a de RAR somente.

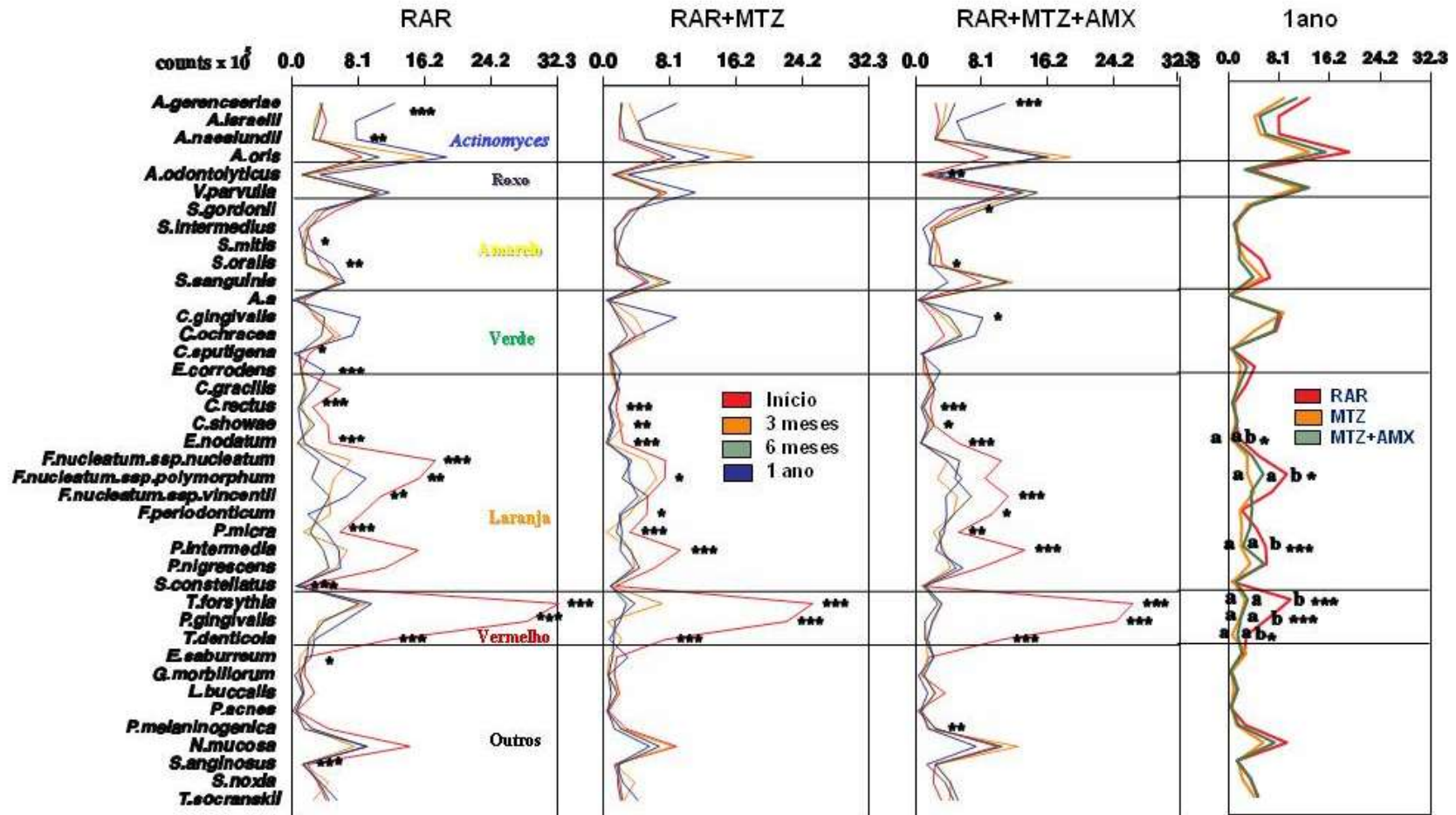


Figura 1. Perfil microbiano na contagem total das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo, 3, 6 e 12 meses pós-RAR. O último painel apresenta o perfil em 1 ano nos três grupos experimentais.

RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina.

Teste Friedman e Dunn (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) * indicam diferenças significativas entre os tempos.

Teste Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$) - Dunn ($p < 0,05$): Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas (Socransky et al., 1991).

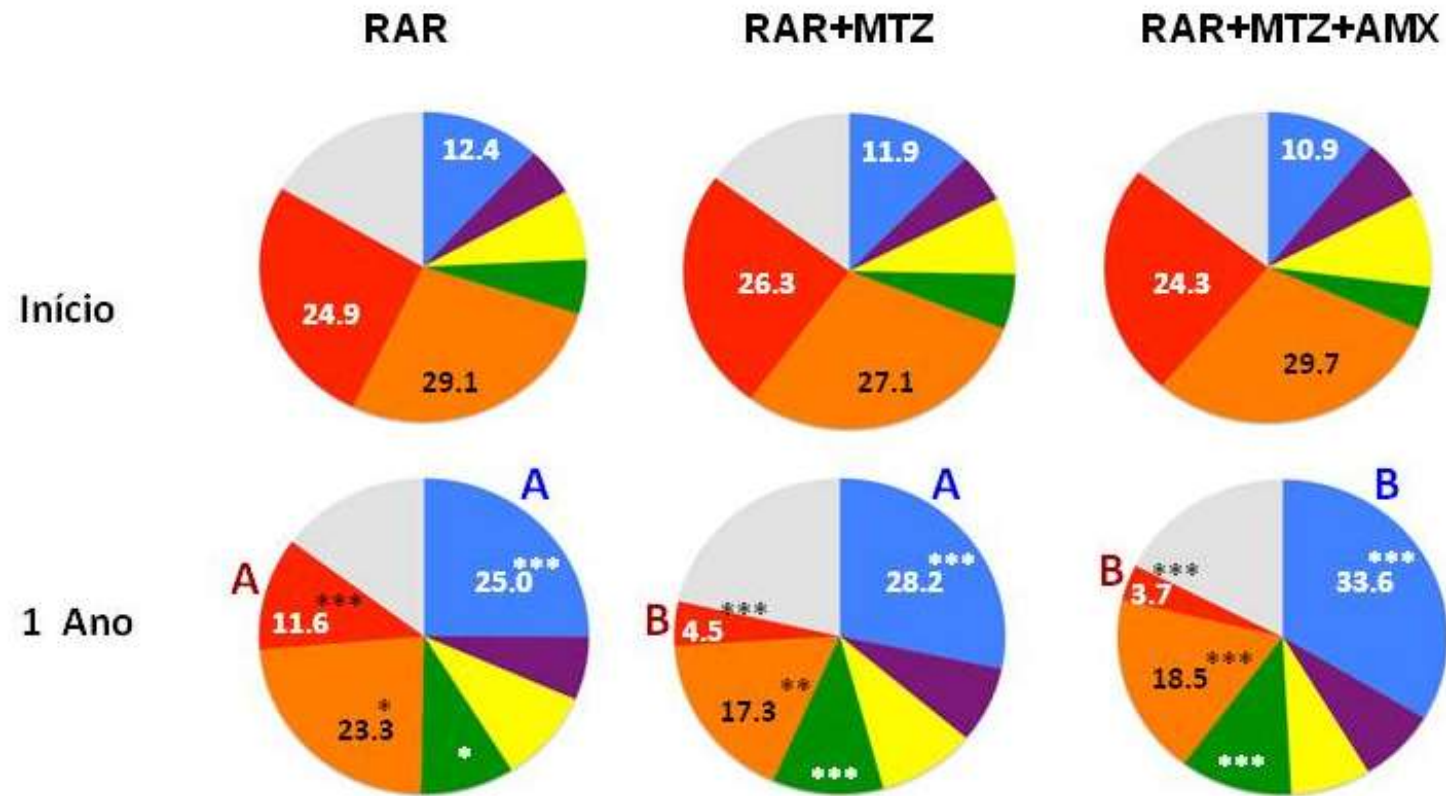


Figura 2. Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo, e 1 ano pós-RAR. RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina. Teste Wilcoxon (* $p < 0,05$) - indica diferenças significativas entre início do estudo e 1 ano pós-terapia em cada grupo. Teste Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$) - Dunn ($p < 0,05$): Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos.

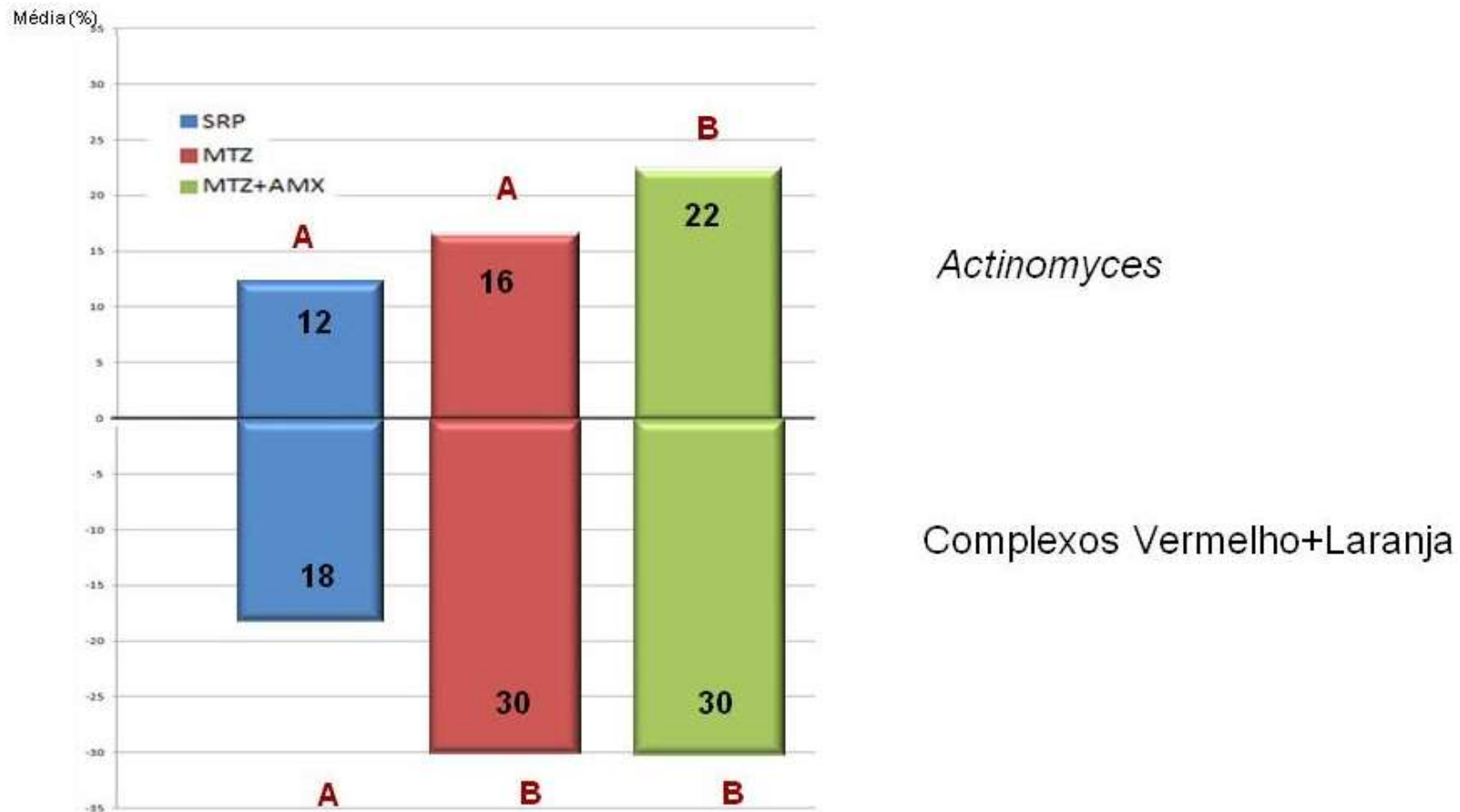


Figura 3. Média de alteração da proporção de *Actinomyces* e complexo vermelho + laranja em 1 anos pós-RAR nos três grupos terapêuticos. RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis - Dunn ($p < 0,05$): Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos.

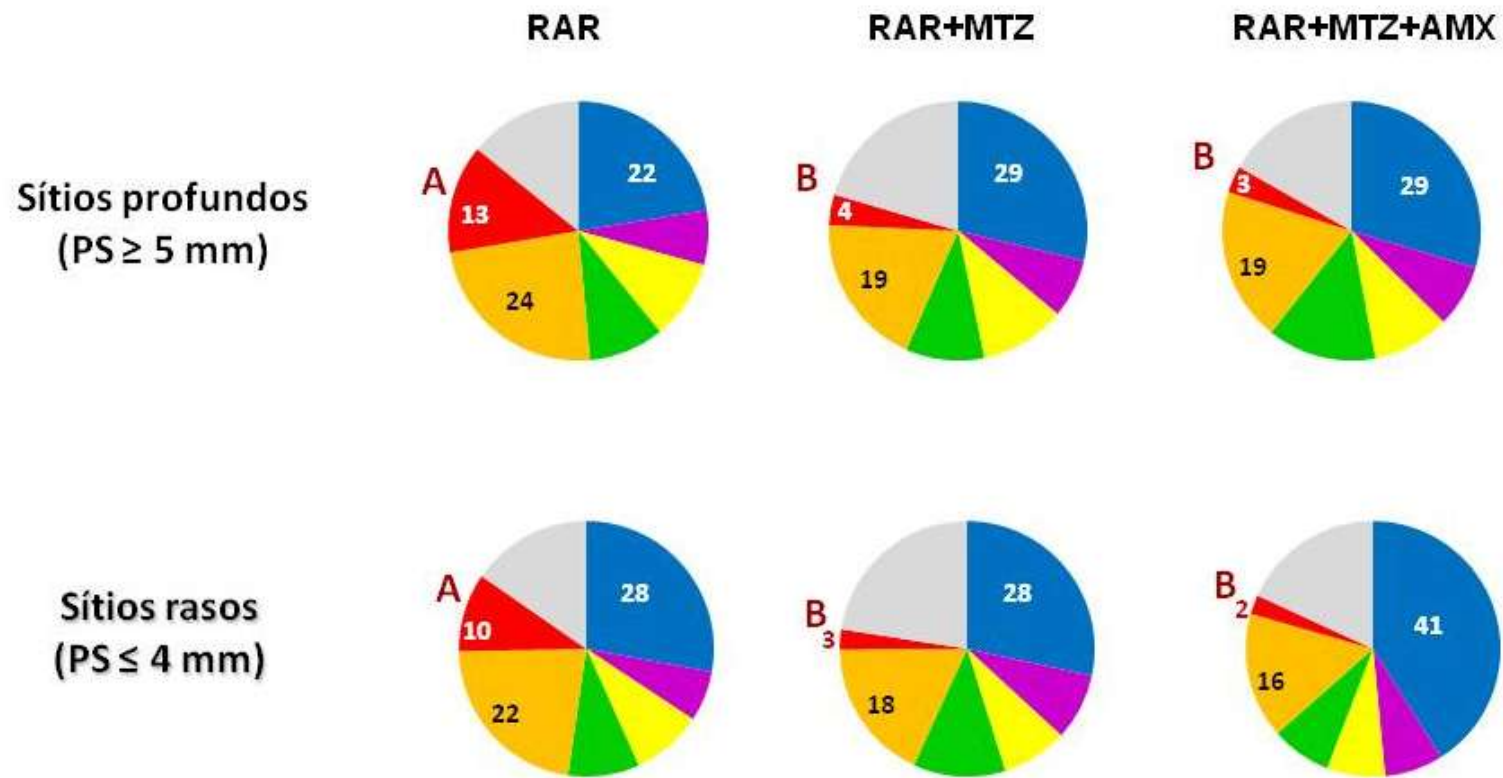


Figura 4. Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme em 1 ano pós-RAR, nos sítios com profundidade de sondagem (PS) inicial ≥ 5 mm e ≤ 4 mm. RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina. Teste Kruskal-Wallis - Dunn ($p < 0,05$): Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos.

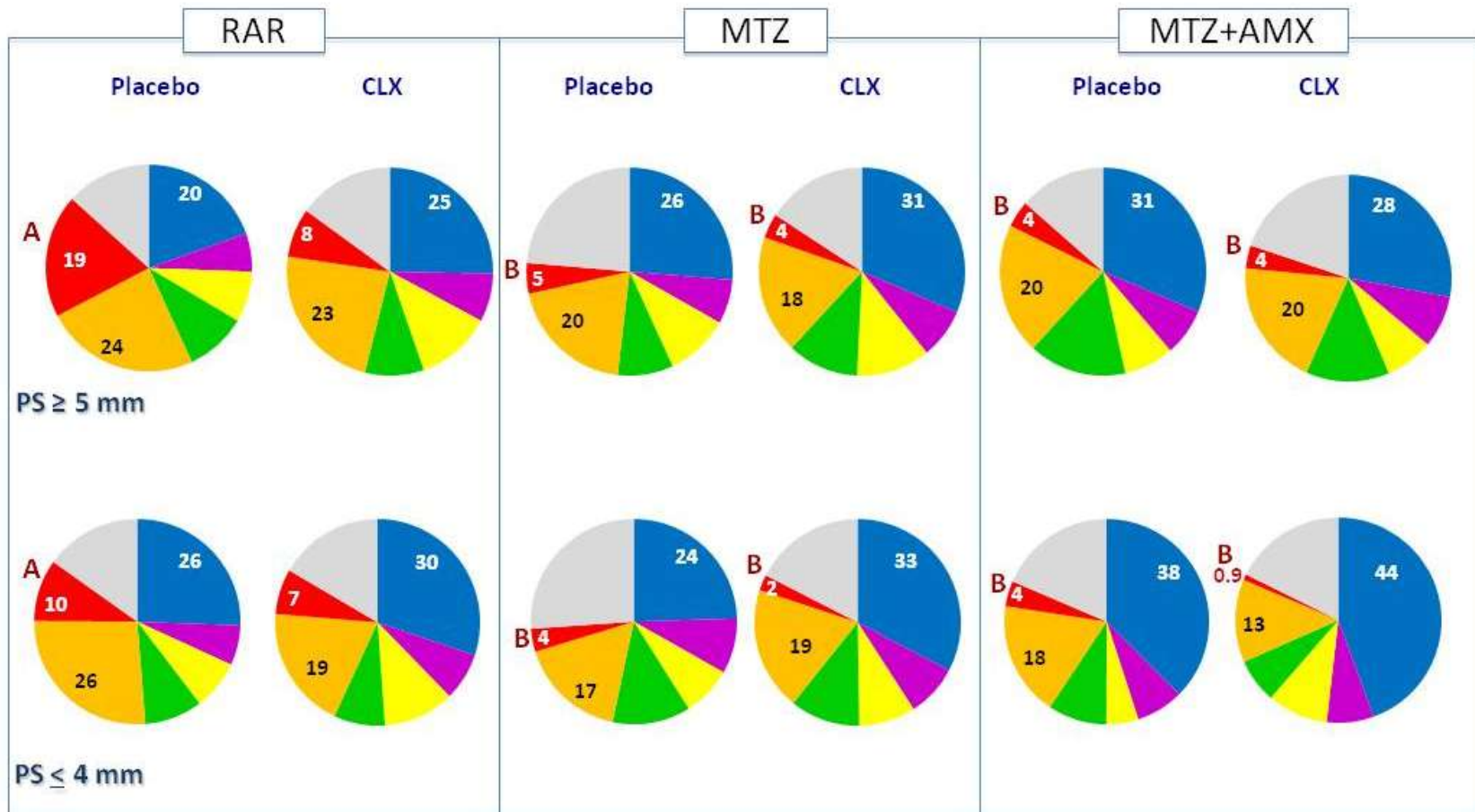


Figura 5. Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme em 1 ano pós-RAR, nos sítios com profundidade de sondagem (PS) inicial ≥ 5 mm e ≤ 4 mm, nos seis subgrupos terapêuticos. RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina; CLX: Clorexidina.

Teste Kruskal-Wallis - Dunn ($p < 0,05$): Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos.

5. CONCLUSÕES

A associação de MTZ ou MTZ+AMX à RAR levou a benefícios clínicos e microbiológicos adicionais no tratamento da periodontite crônica generalizada quando comparadas somente à RAR. Esses benefícios foram mantidos até pelo menos 1 ano pós-terapia.

A associação dos dois antibióticos (MTZ+AMX) promoveu alterações benéficas mais evidentes no perfil microbiológico subgengival do que as observadas com o uso somente de MTZ.

Os dados não demonstraram um benefício estatisticamente significativo adicional da CHX sobre os resultados da terapia adjunta com antibióticos. Porém, os subgrupos que bochecharam com CHX por 2 meses mostraram uma tendência a apresentar menos sítios residuais e um melhor perfil microbiológico em 1 ano, especialmente nos sítios rasos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aimetti M, Romano F, Guzzi N, Carnevale G. Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2012. 39:284-294.

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

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

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* v. 4, n. 1, p. 1-6, Dec. 1999.

Ávila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Specific primer for AP-PCR identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol.* 1999 Nov;26(11):699-04.

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

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

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

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

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

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

Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population: I. clinical results. *J Clin Periodontol.* 2004 Dec; 31(12):1017-76.

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

Chambers HF, Sande MA. Antimicrobial agents. General considerations. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P. *The pharmacological basis of therapeutics.* New York: Pergamon Press; 1996. p. 1026-9

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

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

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

Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A. Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planing with or without amoxicillin/metronidazole in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010; 81:15-23.

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

Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol.* 2002 May;29 Suppl 2:6-16.

Colombo APV, Teles RP, Torres MC, Rosalém W, Mendes MC, Souto RM. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol.* 2005;76:778-84.

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

Dannewitz B, Pohl S, Eickholz P, Kim TS. Clinical and microbiological effects of a combined mechanic-antibiotic therapy in subjects with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Am J Dent.* 2007 Jun;20(3):153-6.

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

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

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

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

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

Faveri M, Gursky LC, Feres M, Shibli JA, Salvador SL, Figueiredo LC. Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2006(b);33(11):819-28.

Feres M, Gursky LC, Faveri M, Tzusuki CO, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2009 Oct;36(10): 857-867.

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

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Effect of systemically administered metronidazole on subgingival plaque composition. *J Dent Res.* 1999a; 78:542.

Feres M. Effect of systemically administered antibiotics on clinical parameters of periodontal disease, subgingival plaque composition and antibiotic resistance. [tese]. Boston: The Faculty of the Harvard School of Dental Medicine – Harvard University; 1999b.

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

Flemming TF. Periodontitis. *Annals of Periodontology.* 1999 Dec;4:32-37.

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

Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole. A therapeutic review and update. Drugs. 1997;54:679-708.

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

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

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

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

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

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

Gomes SG, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. J Periodontol. 2006 Sep;77(9):1483-90.

Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS, Kent R, Teles R, Hasturk H, Bogren A, Van Dyke T, Wennstrom J, Lindhe L. Control of Periodontal Infections: A randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. J Clin Periodontol 2012; 39: 526-536.

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

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

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

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

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

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

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. J Clin Periodontol. 1997(b); 24:767-776.

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

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

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

Haffajee AD, Torresyap G, Socransky SS. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(3):243-53.

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

Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008(b): 23: 148–157.

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

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

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

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

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

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

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

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

Jeffcoat MK, Reddy MS. Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1991 Mar; 62(3):185-9.

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

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

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

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

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

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

Lang, N. P. & Tonetti, M. S. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health & Preventive Dentistry*. 2003; **1**: 7-16.

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

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

Lindhe J, Papapanou PN. Epidemiologia das doenças periodontais. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 3^a edição. Guanabara Koogan; 1997. 49-73.

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

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

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

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

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

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

Löe H, Theilade E, Jensen, SB, Schiott CR. Experimental gingivitis in man. III. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontol Res.* 1967;2(4):282-9.

Loesche WJ, Giordano JR, Soehren S, Kaciroti N. The nonsurgical treatment of patients with periodontal disease: results after 6.4 years. *Gen Dent.* 2005;53(4):298-306.

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

Loesche WJ, Giordano JR, Soehren S, Hutchinson R, Rau CF, Walsh L, Schork MA. Nonsurgical treatment of patients with periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 May;81(5):533-43.

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

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

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

Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Kerry GA, Higgins T, Stoll J. Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *J Periodontol.* 1984 Jun;55(6):325-35.

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

Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Laughon B, Grossman NS. Treatment of periodontal infections due to anaerobic bacteria with short-term treatment with metronidazole. *J Clin Periodontol.* 1981 Feb;8(1):29-44.

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

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

Lovdal A, Aron A, 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.

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

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

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

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

Mdaka I, Haffajee AD, Socransky SS, Blasio BF, Thoresen AM, Olsen I, Goodson JM. Multilevel analysis of clinical parameters in chronic periodontitis after root planing/scaling, surgery, and systemic and local antibiotics: 2-year results. *J Oral Microbiol.* 2012. 4: 17535.

Mestnik MJ., Feres M., Figueiredo LC, Duarte PM, Lira E A G, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010 37, 353–365.

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

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

Montgomery EH. Antibióticos antibacterianos. In: Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. *Farmacologia e terapêutica para dentistas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 468-502

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

Neely AL, Holford TR, Loe H, Anerud A, Boysen H. The natural history of periodontal disease in man. Risk factors for progression of attachment loss in individuals receiving no oral health care. *J Periodontol.* 2001;72:1006-1015.

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

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

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

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

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

Pavicic MJAMP, van Winkelhoff AJ, Douqué NH, Steures RWR, Graaff J. Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis a 2-year evaluation. *J Clin Periodontol.* 1994 Feb;21(2):107-12.

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

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

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

Rosling B, Serino G, Hellstrom Mk, Socransky SS, Lindhe J. Longitudinal periodontal tissue alterations during supportive therapy: findings from subjects with normal and high susceptibility to periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001 Mar;28(3):241-9.

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

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

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

Sanz M., Teughels W.; Group A of European Workshop on Periodontology Innovations in non-surgical periodontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 2008;35, (8 Suppl):3-7.

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

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

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

Silva, M. P., Feres, M., Siroto, T. A., Soares, G. M., Mendes, J. A., Faveri, M. & Figueiredo, L. C. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011. **38**, 828-837.

Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol*. 1979 Oct;50(10):495-09.

Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1984. Jan;11(1): 21-32.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Walker CB, Pappas JD, Tyler KZ, Cohen S, Gordon JM. Antibiotic susceptibilities of periodontal bacteria. In vitro susceptibilities to eight antimicrobial agents. *J Periodontol.* 1985 Nov;56(Suppl 11):67-74.

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

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

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2001 Apr;28(4):296-05.

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

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

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

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

Yek, E. C., Cintan, S., Topcuoglu, N., Kulekci, G., Issever, H. & Kantarci, A. (2010) Efficacy of amoxicillin and metronidazole combination for the management of generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **81**, 964-974.

ANEXOS

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


UnG
CEPPE
Centro de Pós-Graduação,
Pesquisa e Extensão

Guarulhos, 12 de fevereiro de 2007.

Exmã. Sra.
Profa. Luciene Cristina de Figueiredo

PARECER Nº 15/2007

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

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Efeito clínico e microbiológico da terapia periodontal básica associada ao metronidazol/amoxicilina de uso sistêmico e ao controle químico (clorhexidina) do biofilme supragengival em indivíduos com periodontite crônica" - SISNEP/229, na reunião de 05.02.2007, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**.

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

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclareceremos a necessidade da apresentação de relatório de andamento até **15.08.2008** e relatório final até **01.03.2009**.


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

Anexo B – QUESTIONÁRIO DE EFEITOS ADVERSOS (CÁPSULAS)

Nome: _____ Data: ____/____/____

Marque um X na resposta para cada uma das perguntas abaixo:	SIM	NÃO	NÃO SEI
--	------------	------------	----------------

1) Você conseguiu tomar os medicamentos como lhe foi orientado ?			
--	--	--	--

2) Você sentiu algum mal-estar devido ao medicamento que tomou?			
---	--	--	--

3) Você sentiu algum mal-estar devido ao medicamento que tomou?			
---	--	--	--

4) Sentiu náuseas ou vômito?			
------------------------------	--	--	--

5) Teve diarreia neste período?			
---------------------------------	--	--	--

6) Sentiu dor de cabeça ou tontura?			
-------------------------------------	--	--	--

7) Caso tenha sentido algum dos problemas das perguntas anteriores , isso atrapalhou o seu dia-a-dia?			
---	--	--	--

8) Os medicamentos provocaram mau humor ou irritação?			
---	--	--	--

09) Sentiu fraqueza ou falta de ânimo para o trabalho?			
--	--	--	--

10) Teve sono excessivo devido aos medicamentos?			
--	--	--	--

11) Os horários do medicamento prejudicaram o seu dia-a-dia?			
--	--	--	--

12) Você tomaria os medicamentos novamente caso fosse necessário?			
---	--	--	--

Anexo C – QUESTIONÁRIO DE EFEITOS ADVERSOS (BOCHECHOS)

Nome: _____ Data: ____/____/____

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