

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

**ALLISSON REBELLO**

**EFEITOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO  
SISTÊMICA DE METRONIDAZOL E AMOXICILINA NO  
TRATAMENTO DE INDIVÍDUOS TABAGISTAS E NÃO TABAGISTAS  
COM PERIODONTITE CRÔNICA.**

**GUARULHOS**

**2013**

**ALLISSON REBELLO**

**EFEITOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO  
SISTÊMICA DE METRONIDAZOL E AMOXICILINA NO  
TRATAMENTO DE INDIVÍDUOS TABAGISTAS E NÃO TABAGISTAS  
COM PERIODONTITE CRÔNICA.**

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

**GUARULHOS  
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca Fernando Gay da Fonseca.**

R291e

Rebello, Allisson

Efeitos clínicos e microbiológicos da associação sistêmica metronidazol e amoxicilina no tratamento de indivíduos tabagistas e não tabagistas com periodontite crônica / Allisson Rebello, 2013.

118 f.: il.; 31 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós – Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Favari

Bibliografia: f. 97-118

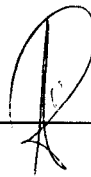
1. Doença periodontal 2. Raspagem e alisamento radicular 3. Metronidazol. 4. Amoxicilina. 5. Periodontite crônica. 6. Fumantes I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD – 617

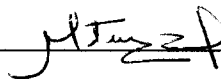
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada “EFEITOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO SISTÊMICA DE METRONIDAZOL E AMOXICILINA NO TRATAMENTO DE INDIVÍDUOS TABAGISTAS E NÃO TABAGISTAS COM PERIODONTITE CRÔNICA” em sessão pública realizada em 15 de Março de 2013, considerou o candidato ALLISSON REBELLO aprovado.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

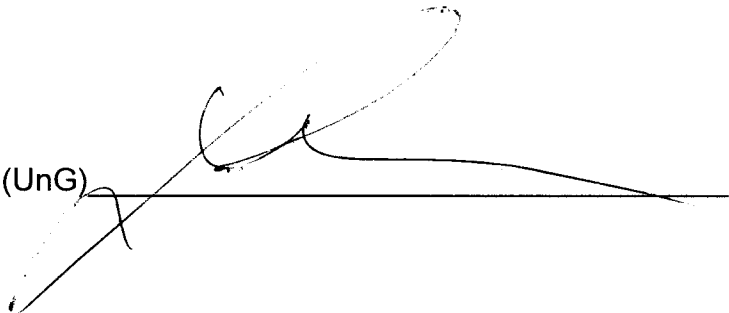
1. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (UnG)



2. Profa. Dra. Flavia Matarazzo (UEM)



3. Prof. Dr. Leandro Chambrone (UnG)



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho aos meus pais, Jair da Silva Rebello (in memoriam) e Clelia Pacomio Rebello, meus exemplos de fé, garra, determinação, honestidade. Eles são meu porto seguro!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e por guiar meus passos.

Aos meus pais Jair da Silva Rebello (in memoriam) e Clelia Pacomio Rebello que me apoiou, me ajudou, para que esse sonho se tornasse realidade.

Aos meus irmãos Jair Jr. (Jairzinho) e George, pelo apoio, amizade, companheirismo, e confiança.

Aos meus sobrinhos Giulliana (Giugiu) e Miguel (Miguelito), sobrinhos do meu coração, obrigado por fazerem parte da minha vida.

Agradeço o meu orientador Marcelo de Faveri, pela paciência, pelos ensinamentos, orientação e ajuda durante esses 2 anos. Exemplo de pessoa, de profissionalismo e competência. Obrigado professor.

Aos demais professores, Magda Feres, Poliana Duarte, Luciene Figueredo, Jamil Shibli, Alessandra Cassoni, André Reis, José Augusto Rodrigues, Marta Bastos, Leandro Chambrone, que com muito profissionalismo contribuíram muito para a minha formação durante esses 2 anos.

As funcionárias da universidade Cristina, Samanta, Cintia e Izilvânia, por toda a ajuda com a parte burocrática, com os pacientes, com a parte de utilização dos laboratórios e clínicas.

Agradeço meus colegas de turma Daniel, Daiane, Eislá, Giovana, Priscila, por toda essa experiência e aprendizado que foi a convivência nesses 2 anos.

Aos pacientes voluntários a pesquisa.

Muito obrigado a todos !!!!!

*“Se podemos sonhar, também podemos  
tornar nossos sonhos realidade.”  
Walt Disney*

## RESUMO

O propósito do presente estudo foi avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos de uso concomitante de metronidazol (MTZ) e amoxicilina (AMX) à RAR no tratamento de tabagistas e não tabagistas com periodontite crônica generalizada. Trinta e dois indivíduos tabagistas e 32 indivíduos não tabagistas receberam raspagem e alisamento radicular, combinado com MTZ (400 mg / TID) e AMX (500 mg / TID) por 14 dias. Exames clínicos e microbiológicos foram realizados no início e 3 meses pós tratamento. Nove amostras de placa subgengival por indivíduo foram analisadas pela técnica do checkerboard DNA-DNA hybridization. Ambos os grupos apresentaram melhora estatisticamente significativa em todos os parâmetros clínicos em 3 meses pós-terapia ( $p < 0,05$ ). Os indivíduos não tabagistas apresentaram menor média do número de sítios com profundidade de sondagem residual (PS)  $\geq 5$  mm. Além disso os não tabagistas apresentaram um menor número de indivíduos em alto risco para progressão de periodontite ( $\geq 9$  sítios com PS  $\geq 5$  mm) aos 3 meses após o tratamento. Indivíduos não tabagistas exibiram em média reduções mais significativas na PS e ganho de inserção clínica entre o início e 3 meses após a terapia em sítios ( $p < 0,01$ ) inicialmente profundos (PS  $\geq 7$  mm). As alterações mais benéficas no perfil de microrganismos foi também observada no grupo de indivíduos não tabagistas, que apresentou as menores proporções do complexo laranja, bem como um aumento significativo na proporção das espécies *Actinomyces* após o tratamento. Os tabagistas mostraram resultados clínicos e microbiológicos menos favoráveis pelo uso concomitante de raspagem e alisamento radicular combinado com MTZ + AMX em comparação aos não tabagistas.

**Palavras-chave:** doença periodontal; raspagem e alisamento radicular; metronidazol, amoxicilina; periodontite crônica; Fumantes.



## ABSTRACT

To evaluate the clinical and microbiological effects of the adjunctive use of metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) in the treatment of smokers and non-smokers with generalized chronic periodontitis (GChP). 64 subjects were assigned into two groups in according to their smoking status (smokers and non-smokers) and received scaling and root planing (SRP) combined with MTZ (400 mg/TID) and AMX (500 mg/TID) for 14 days. Clinical and microbiological examinations were performed at baseline and 3 months post-SRP. Nine subgingival plaque samples per subject were analyzed using checkerboard DNA-DNA hybridization. Both groups presented a statistically significant improvement in all clinical parameters 3 months post-therapy ( $p < 0.05$ ). Non-smokers showed lower mean number of sites with probing depth (PD)  $\geq 5$  mm and fewer subjects exhibiting  $\geq 9$  of these sites at 3 months post-treatment. Non-smokers exhibited the deepest reductions in mean probing depth (PD) and gain in clinical attachment between baseline and 3 months post-therapy at initially deep (PD  $\geq 7$  mm) sites ( $p < 0.01$ ). The most beneficial changes in the microbial profile were also observed in the non-smokers group, which showed the lowest proportions of the orange complex as well as a significant increase in the proportions of *Actinomyces* species after treatment. Smokers showed less favourable clinical and microbiological outcomes by the adjunctive use of SRP combined with MTZ+AMX in comparison to non-smokers.

**Key-words:** periodontal disease; scaling and root planing; metronidazole, amoxicillin; chronic periodontitis; Smokers

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	09
2 PROPOSIÇÃO .....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Seleção da amostra .....	20
3.2 Critérios de inclusão e exclusão .....	20
3.3 Delineamento do estudo.....	21
3.4 Seleção dos sítios-testes.....	22
3.4.1 Coleta das amostras de placa subgengival .....	22
3.5 Monitoramento clínico .....	23
3.6 Procedimentos terapêuticos .....	24
3.6.1 Terapia periodontal básica .....	24
3.6.2 Administração de Metronidazol e Amoxicilina sistêmicos.....	24
3.7 Monitoramento microbiológico.....	25
3.7.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento .....	25
3.7.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas.....	25
3.8 Análise estatística .....	28
3.8.1 Variável primária e variáveis secundárias de avaliação .....	28
3.8.2 Monitoramento clínico .....	29
3.8.3 Monitoramento microbiológico.....	29
Artigo .....	30
4 CONCLUSÃO .....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As periodontites caracterizam-se como doenças infecciosas pois tem como fator etiológico microrganismos específicos presentes no biofilme bucal, que acometem as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, levando a perda de inserção de tecido ósseo que envolve o elemento dental (Løe et al.,1965; Socransky,1970; Listgarten et al.,1978; Loesche et al.,1985; Socransky; Haffajee,1994a; Haffajee ; Socransky,1994; Socransky et al.,1988; Armitage,1999). A comprovação da natureza infecciosa da periodontite foi definida na década de 60, através de estudos epidemiológicos, clínicos e microbiológicos (Lovdal et al.,1958; Løe et al.,1965). O experimento clássico de Løe demonstrou que o acúmulo de biofilme microbiano durante 3 semanas resultou no desenvolvimento de gengivite generalizada (Løe et al. 1965). Por um longo período de tempo, questionavam se a destruição dos tecidos periodontais era causada pela quantidade ou pela especificidade das bactérias presentes no sulco gengival, desta maneira surgiram as teorias conhecidas como hipótese da placa específica, e hipótese da placa não específica (Newman et al.,1976; Slots,1976; Newman; Socransky,1977; Listgarten; Hellden, 1978; Armitage et al.,1982).

Com o desenvolvimento de novas técnicas de detecção de microrganismos que formam o biofilme oral, tais como técnicas imunológicas e de biologia molecular, descrições mais precisas das espécies bacterianas relacionadas às diferentes formas de periodontite foram relatadas (Christersson et al ., 1987; Socransky et al., 1994; Faveri et al., 2009). Socransky et al.(1994) descreveram a técnica de diagnóstico microbiológico do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* que utiliza sondas genômicas de DNA para o diagnóstico microbiológico, e analisaram as associações entre 40 espécies bacterianas presentes no biofilme de indivíduos com periodontite crônica (Socransky et al.,1998). Esses autores observaram a presença de diferentes espécies bacterianas que foram divididas em 5 complexos bacterianos, de acordo com a relação entre as espécies, em complexo vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo. O complexo vermelho, composto pelas espécies bacterianas *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, foi fortemente

relacionado com o aumento da profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem (SS), assim relacionado diretamente à periodontite.

Nas infecções periodontais, assim como em todas as doenças, podem se atribuir fatores que favorecem o agravamento da doença que são denominados fatores de risco. No caso das periodontites os principais fatores de risco são o diabetes e o tabagismo (Løe H, 1993; Bergström; Preber, 1994, 1996; Grossi et al., 1996). O tabagismo é apontado como o principal fator de risco para as doenças periodontais (Bergström; Preber, 1994; Kaldahl et al., 1996; Grossi et al., 1996; Rivera-Hidalgo, 2003; Kim et al., 2004; Meisel et al., 2004; Palmer et al., 2005). Estudos mostraram que indivíduos tabagistas apresentam um risco relativo que varia de 2,0 a 8,0 para o desenvolvimento da periodontite em relação aos não tabagistas (Kim et al., 2004).

Bergström & Eliasson (1987b) examinaram 242 indivíduos, 76 tabagistas e 166 não tabagistas. Nesta amostra, indivíduos tabagistas diferiram na média de PS de indivíduos não tabagistas, 2,59 mm e 2,36 mm, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Também, foi encontrada uma maior frequência de sítios com  $PS \geq 4$  mm nos tabagistas. Preber et al. (1992) avaliaram 32 pacientes (17 tabagistas e 15 não tabagistas). Foi possível observar diferenças na média de PS entre esses dois grupos, sendo que os não tabagistas apresentavam média de PS de 3,8 mm e tabagistas de 4,3 mm ( $p = 0,04$ ). Os autores mostraram também que indivíduos tabagistas possuíam maior número de sítios com  $PS \geq 4$  mm ( $p = 0,05$ ).

No que tange o aspecto clínico periodontal, Stoltenberg et al. (1993) apresentaram dados que demonstram que tabagistas com boa saúde médica possuem um menor número de dentes e maior média de profundidade de sondagem, sendo que 12,7% dos tabagistas possuíam pelo menos um sítio com profundidade de sondagem  $\geq 5,5$  mm, contrapondo-se a 2,4% dos não tabagistas. Bergström et al. (2000), ao examinarem um grupo de 257 indivíduos (20% tabagistas, 23% ex-tabagistas, 52% não tabagistas) em relação à exposição ao fumo (acima ou abaixo de 10 cigarros/dia) e à duração do hábito de fumar (mais ou menos de 15 anos de tabagismo), observaram uma forte associação entre estas variáveis e a doença periodontal. Indivíduos com história de maior exposição ao fumo possuíam uma maior frequência de sítios afetados pela doença.

Haffajee & Socransky (2001a), em um estudo com indivíduos com periodontite crônica em diversas faixas etárias, demonstraram uma maior perda de inserção em indivíduos tabagistas em relação a indivíduos ex-tabagistas e não tabagistas. Indivíduos mais jovens (20-41 anos, média de 31,8 anos) tabagistas tiveram perda de inserção semelhante à de indivíduos acima de 49 anos (média de 59,4) que nunca fumaram.

Em um estudo prospectivo de 10 anos descrito por Baljoon et al., em 2005, foram avaliados 24 indivíduos tabagistas, 24 ex-tabagistas e 43 não tabagistas portadores de periodontite crônica. Observou-se perda óssea radiográfica estatisticamente significativa nos indivíduos tabagistas comparados aos não tabagistas. Após ajuste para idade, verificaram-se diferenças tanto nos valores de perda óssea vertical, quanto nos valores para profundidade de sondagem entre os dois grupos ao longo do período de 10 anos. Os valores médios de altura óssea foram representados em porcentagem proporcional à medida da raiz, sendo que os valores iniciais foram de 80,3%, 80,7% e 85,1% (tabagistas, ex-tabagistas e não tabagistas, respectivamente) e após 10 anos: 78%, 80% e 84,2% ( $p < 0,01$ ). Para profundidade de sondagem os valores médios iniciais foram de 2,2 mm, 2,1 mm e 2,0 mm; e os finais de 2,9 mm, 2,2 mm e 2,2 mm ( $p < 0,01$ ). Com relação à exposição ao tabaco, não houve diferenças entre indivíduos ex-tabagistas e não tabagistas; entretanto para indivíduos tabagistas leves (63,5 a 174,8 cigarros/ano) o risco relativo de perda óssea foi de 2,3 e para tabagistas pesados (350 a 602 cigarros/ano), 5,3 ( $p < 0,05$ ).

A principal relação pelos quais o fumo parece afetar os tecidos periodontais são pela alteração do ecossistema bucal (Umeda et al., 1998; Zambom et al., 1996; Kazor et al., 1999), alteração do calibre dos vasos sanguíneos (Mirbod et al., 2001), na resposta inflamatória (Rezavandi et al., 2002), na resposta imune (Sopori; Kozak, 1998), além da alteração da homeostase e do potencial cicatricial dos tecidos periodontais (Typton; Dabbous, 1995; Checci et al., 1999). Grande parte dos efeitos prejudiciais dos produtos liberados pelo fumo resulta da exposição sistêmica da droga, por meio da absorção pulmonar, mas pode ocorrer também pela absorção tópica na cavidade bucal (Palmer et al., 2000). Mavropoulos et al. (2001) relataram um aumento no fluxo sanguíneo gengival após a aplicação tópica de fumaça de

tabaco no sulco gengival. O monóxido de carbono é um dos produtos liberados pelo fumo, este produto afeta a saturação de oxigênio da hemoglobina (Palmer et al., 2005; Kumar et al., 2012). Hanioka et al. (2000), examinando a tensão de oxigênio nas bolsas periodontais de indivíduos tabagistas e não tabagistas encontraram uma tensão de oxigênio menor nas bolsas dos tabagistas. Palmer et al. (2005) salientam que essa propriedade pode ter um impacto na microbiota subgengival.

Em um estudo que utilizou método de cultura bacteriana, Preber et al. (1992) não encontraram diferenças na contagem e na prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* entre indivíduos acima de 32 anos tabagistas (n=83) e não tabagistas (n=62), em coletas de biofilme subgengival de sítios  $\geq 6$  mm. Foi considerado tabagista aquele que consumia 15 cigarros ou mais por dia. Stoltenberg et al. (1993), ao utilizarem técnica de imunofluorescência direta, também, não encontraram diferenças significantes ao testarem a prevalência de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *E. corrodens* e *F. nucleatum* entre tabagistas (126) e não tabagistas (63).

Como parte do *Erie County Study*, foi realizada uma pesquisa sobre a microbiota bucal em uma população de 1426 voluntários, dos quais 60,8 % eram tabagistas (Zambon et al., 1996). Nesse trabalho foi avaliada a relação entre o consumo de cigarro e a prevalência de 8 espécies bacterianas periodontopatogênicas. Foram coletadas 12 amostras de biofilme subgengival por indivíduo, sendo 6 do arco superior e 6 do arco inferior. As amostras foram coletadas com cones de papel estéreis de sítios méso-vestibulares e foi feito um pool para cada arco, totalizando 2 amostras por indivíduo. Para a análise microbiológica foi utilizada a técnica de imunofluorescência. Nesse estudo transversal foi observado que os indivíduos tabagistas possuem um risco aumentado para a presença de *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia* (3,11 e 2,32, respectivamente).

Umeda et al. (1998) também avaliaram amostras de um *pool* de biofilme subgengival das 4 bolsas mais profundas de voluntários tabagistas (21), não tabagistas (145) e ex-tabagistas (33). Nesse estudo foi possível demonstrar que havia um risco maior de indivíduos tabagistas em apresentar *T. denticola* (4,61), em relação aos não-tabagistas.

Kazor et al. (1999) examinaram 55 indivíduos tabagistas, 38 ex-tabagistas e 79 que nunca fumaram. Foram coletadas de 2 a 4 amostras de biofilme interproximal dos primeiros molares de cada indivíduo, totalizando 670 amostras. Estas amostras foram analisadas para a reação de hidrólise de substrato sintético de tripsina, benzoil-DL-arginina naftilamida (BANA), teste diagnóstico que detecta *T. forsythia*, *T. denticola* e/ou *P. gingivalis*. A maioria (81%) do total de resultados negativos para o teste BANA se deu em indivíduos que nunca fumaram. Setenta e cinco por cento dos sítios sem sangramento em tabagistas apresentaram-se positivos para o teste. Nesse trabalho, os sítios de indivíduos tabagistas possuíam uma chance 4 vezes maior em apresentar-se BANA positivos do que em sítios daqueles que nunca fumaram. Considerando-se apenas os sítios que não sangraram, esta relação foi 11 vezes maior.

Em artigo apresentado em 2001, Boström et al. investigaram a presença de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *M. micros*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *S. noxia*, *S. intermedius* no biofilme subgingival de 33 indivíduos tabagistas e 31 não tabagistas. Os pesquisadores utilizaram cones de papel para a coleta, e para a análise microbiológica foi utilizado o método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Foram coletadas 4 amostras de sítios com profundidade de sondagem  $\geq 5$  mm em cada indivíduo, totalizando 256 amostras. Foi avaliada a prevalência dessas espécies por indivíduo e a relação entre as espécies bacterianas e a condição de tabagismo (tabagista ou não). Nesse estudo, não foram observadas diferenças na microbiota de tabagistas e não tabagistas, com exceção na prevalência de indivíduos com bolsas profundas ( $> 6$  mm) no que diz respeito à presença de *T. forsythia* (88,9% e 37,5%, respectivamente). Entretanto, os autores questionam o achado devido à quantidade pequena de indivíduos comparados e com estas características (18 tabagistas e 8 não tabagistas).

Haffajee & Socransky (2001b) utilizaram a técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para avaliar a microbiota subgingival em indivíduos tabagistas (50), ex-tabagistas (98) e não tabagistas (124). Os pesquisadores não encontraram diferenças estatisticamente significativas no biofilme subgingival dos 3 grupos de voluntários em bolsas maiores ou iguais a 4 mm no que se refere à contagem, proporção e prevalência das 29 espécies

bacterianas avaliadas. Porém, foi observada uma maior prevalência de microrganismos do complexo vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*) e de algumas espécies do complexo laranja (*P. intermedia*, *P. micra*, *P. nigrescens*, *E. nodatum*, *F. nucleatum* ss. *vincentii*) nos sítios menores de 4 mm em indivíduos tabagistas.

Em um estudo sobre o impacto do cigarro nos parâmetros clínicos e microbiológicos de indivíduos tabagistas não-tratados, Apatzidou et al. (2005) avaliaram, por meio de PCR, a presença ou ausência de alguns periodontopatógenos no biofilme subgengival do sítio mais profundo de cada quadrante em 40 indivíduos. Os autores observaram diferenças limitadas no que tange a prevalência de indivíduos portadores de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *T. denticola*. A exceção de *P. gingivalis*, os outros microrganismos apareceram com menor frequência em indivíduos tabagistas.

Após analisar, por meio de cultura, a presença de periodontopatógenos nos 4 sítios mais profundos de cada indivíduo (um em cada quadrante), Van der Velden et al. (2003), também, não observaram diferenças na prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* e *P. micra* entre 30 tabagistas e 29 não tabagistas (média de idade 41,5 anos). Os indivíduos não tabagistas, após se submeterem a tratamento periodontal cirúrgico e não cirúrgico, tiveram uma redução na prevalência dos periodontopatógenos até dois anos após o tratamento. Os indivíduos tabagistas, todavia, mostraram redução apenas em *P. gingivalis* no mesmo período de avaliação. Outros autores também observaram uma deficiência na resposta microbiológica de indivíduos tabagistas após diferentes formas de terapia periodontal (Grossi et al., 1997).

Gomes et al. (2006) utilizando a técnica PCR Real Time compararam os níveis de algumas bactérias (*P. gingivalis*, *P. micra*, *Dialister pneumosintes*, *A. actinomycetemcomitans*) nos sítios subgengivais de indivíduos tabagistas e não tabagistas. *P. gingivalis* foi encontrada em níveis similares em ambos os grupos. Números significativamente mais elevados de *P. micra* e *D. pneumosintes* foram encontrados no grupo dos indivíduos tabagistas, principalmente em bolsas moderadas e profundas.



Ainda em 2006, Cruz comparou a composição da microbiota de indivíduos brasileiros tabagistas e não tabagistas com periodontite crônica, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. O grupo de não tabagistas apresentou valores superiores na média da contagem total de espécies bacterianas ( $3,2 \times 10^7$ ) comparados aos tabagistas ( $2,1 \times 10^7$ ). Diferenças estatísticas foram observadas apenas para a contagem das espécies *S. sanguinis*, *A. actinomycetemcomitans* e *L. buccalis*, as quais se apresentaram diminuídas nos tabagistas. Em conclusão, os resultados deste estudo demonstraram que não houve diferenças marcantes no perfil microbiológico entre indivíduos brasileiros tabagistas e não tabagistas com periodontite crônica.

Apesar da microbiota de indivíduos tabagistas ter sido investigada por alguns autores, muitos dos resultados desses estudos ainda são controversos (Palmer et al., 2005). Essas diferenças podem ser devido às técnicas de diagnóstico microbiológico empregadas. O método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* (Socransky et al., 1994), utilizado no presente estudo, permite uma avaliação sistemática da microbiota bucal por meio da detecção e quantificação de um grande número de amostras e de espécies bacterianas, viabilizando a realização de estudos ecológicos e terapêuticos de infecções mistas, como a periodontite crônica.

O tratamento periodontal mais utilizado atualmente é a raspagem e alisamento radicular (RAR). Apesar de ser eficaz para uma boa parcela dos pacientes, muitas vezes não leva a uma melhora dos parâmetros clínicos e microbiológico necessários para manter os benefícios conseguidos pela terapia em longo prazo. Um dos principais motivos da falta de eficácia da RAR são dificuldades técnicas de intervir no biofilme em áreas de difícil acesso, como bifurcações, concavidades radiculares e bolsas periodontais profundas. Com o objetivo de potencializar os efeitos da RAR, outras formas de tratamento, tais como a associação de antibióticos sistêmicos têm sido propostas no tratamento de indivíduos com periodontite (Herrera et al., 2002; Haffajee et al., 2003). Outro ponto interessante, é que indivíduos tabagistas apresentam uma resposta menos favorável do que os não tabagistas ao tratamento periodontal com RAR (Haffajee et al., 1997; Palmer et al., 1999; Söder et al., 1999; Winkel

et al., 2001; Van der Velden et al., 2003; Mascarenhas et al., 2005). Van der Velden et al. (2003) avaliaram a influência do fumo no tratamento da periodontite e na composição da microbiota subgengival utilizando RAR. Os autores demonstraram que os não tabagistas exibiram um maior ganho de inserção e uma redução mais acentuada na prevalência das bactérias patogênicas (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra*) do que os tabagistas.

Estudos vêm relatando um efeito benéfico da associação sistêmica da amoxicilina (AMX) e do metronidazol (MTZ) à RAR na resposta clínica e na composição da microbiota subgengival em indivíduos com periodontite crônica pós-terapia (Berglundh et al., 1998; Winkel et al., 1998; Winkel et al., 2001; Serino et al., 2001; Rooney et al., 2002; Silva et al., 2011). 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; Xajigeorgiou 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 6 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. actinomycetonecomitans*, *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 sistêmicos, 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 antibioticoterapia 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.

A associação de MTZ e AMX combinada a RAR também tem sido sugerida no tratamento de indivíduos tabagistas (Söder et al. 1999, Winkel et al. 2001, Pahkla et al. 2006, Matarazzo et al. 2008). Matarazzo et al. (2008) avaliaram o tratamento periodontal em 43 indivíduos tabagistas com periodontite crônica tratados por meio da RAR isoladamente, comparado com RAR associado com metronidazol (400mg, 3x/dia durante 14 dias) e RAR combinado com metronidazol (400mg, 3x/dia durante 14 dias) e amoxicilina (500mg, 3x/dia, durante 14 dias), e concluíram que a associação de metronidazol a RAR e principalmente de ambos os antibióticos a RAR melhoram consideravelmente os parâmetros clínicos e microbiológicos 3

meses após a terapia. Entretanto, nestes indivíduos, apesar da melhora clínica e microbiológica, todos os grupos apresentaram altas proporções de espécies do complexo laranja após a terapia (principalmente espécies de *Fusobacterium ssp.*) e sugeriram que isto poderia ser um fator contribuinte para a recidiva da periodontite nestes pacientes a longo prazo.

Entretanto, apesar dos benefícios clínicos e microbiológicos observados em estudos que utilizaram MTZ associado a AMX no tratamento da periodontite crônica de não tabagistas (Silva et al., 2011, Goodson et al., 2012, Feres et al. 2012) e tabagistas (Matarazzo et al., 2008), nenhum estudo comparou diretamente o efeito clínico e microbiológico desta associação terapêutica em 2 grupos distintos de indivíduos, fumantes e não fumantes.

## **2. PROPOSIÇÃO**

Comparar os resultados clínicos e microbiológicos do efeito da associação da raspagem e alisamento radicular e o uso sistêmico de metronidazol e amoxicilina no tratamento periodontal de indivíduos tabagistas e não tabagistas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Seleção da amostra**

Sessenta e quatro indivíduos, sendo 32 tabagistas e 32 não tabagistas, com periodontite crônica generalizada, foram selecionados na Clínica de Estudos Avançados da Universidade Guarulhos para a participação no estudo no período correspondente de julho/2010 à setembro/2012. A triagem e seleção seguiu os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Os participantes foram informados dos objetivos do estudo, bem como de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas, coletas e terapias realizadas. Um profissional experiente explicou os procedimentos odontológicos que seriam realizados durante o estudo e os pacientes que concordaram em participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, responderam a um questionário de saúde/anamnese e receberam a terapia periodontal gratuitamente, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96). O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos.

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

Critérios de inclusão

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

- Indivíduos portadores de periodontite crônica generalizada;
- Idade superior ou igual a 35 anos;
- Possuir no mínimo 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal apresentando PS e nível clínico de inserção (NCI)  $\geq$  5mm em dentes não contíguos.
- Mínimo de 30% dos sítios periodontias apresentando PS e NCI  $\geq$  4mm e sangramento a sondagem.
- Os indivíduos tabagistas deveriam fazer uso de pelo menos 10 cigarros por dia por um período mínimo de 5 anos (Ammenheuser et al., 1997).

## Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Pacientes grávidas ou lactantes;
- História de tratamento periodontal prévio (RAR subgengival);
- História de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- História de uso constante de anti-sépticos bucais nos últimos 6 meses;
- História de doenças sistêmicas que comprometa a resposta do hospedeiro ou exija medicação profilática ao tratamento (ex: diabetes);
- Relato de alergia à amoxicilina e metronidazol;
- indivíduos ex-tabagistas.

### 3.3. Delineamento do estudo

Foram selecionados 64 indivíduos para participar deste estudo clínico coorte. Cada grupo apresentou 32 indivíduos, sendo um grupo de indivíduos tabagistas e um grupo de indivíduos não tabagistas. Para o cálculo dessa amostragem foi realizado cálculo de potência onde a variável de interesse foi a diferença no ganho de inserção clínica em sítios inicialmente profundos ( $PS \geq 7\text{mm}$ ). Baseado em estudos prévios (Matarazzo et al. 2008, Feres et al. 2012) estipulou-se uma diferença de 1,0 mm sítios entre grupos e um desvio padrão de 1,0 mm. Baseado nestes valores, foi calculada uma potência de 85% para uma amostragem de 26 indivíduos por grupo. Considerando uma taxa de 20% de desistência durante o curso do estudo, optou-se por incluir 32 indivíduos por grupo. Ambos os grupos foram tratados por meio de RAR associada ao uso sistêmico de amoxicilina (500mg, 3x/dia durante 14 dias) e metronidazol (400mg, 3x/dia durante 14 dias).

Inicialmente, todos os pacientes receberam monitoramento clínico e microbiológico, seguido de raspagem supragengival (RSP) de todos os dentes e instrução de higiene oral. Todos os sujeitos da pesquisa foram orientados a utilizar o mesmo dentífrício contendo triclosan/gantrez (Colgate Total<sup>®</sup>, Anakol Ind. Com. Ltda- Kolynos do Brasil - Colgate Palmolive Co, São Bernardo do Campo, SP, Brazil). A terapia básica de raspagem (RAR) foi realizada de 4 a 6

sessões e finalizada em 14 dias. Os indivíduos dos dois grupos experimentais (tabagista e não tabagista) foram orientados a iniciar o uso da antibioticoterapia no primeiro dia do tratamento periodontal, seguindo este tratamento por 14 dias. Ao final da RAR e da antibioticoterapia sistêmica os indivíduos de ambos os grupos foram submetidos a um questionário de efeitos colaterais. Os pacientes foram monitorados clínica e microbiologicamente 3 meses após a terapia. Devido as características deste estudo clínico, o profissional que tratou os indivíduos e que realizou os exames clínicos e microbiológicos não foi o mesmo que realizou os procedimentos da terapia periodontal.

### **3.4. Seleção dos sítios-teste**

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

#### **3.4.1. Coleta das amostras de placa subgengival**

Após a remoção da placa supragengival a coleta de amostras de biofilme subgengival foi realizada com curetas Gracey do tipo mini-five 11/12 (HuFriedy, USA), posicionadas na porção mais apical dos sítios selecionados. As amostras foram depositadas em tubos plásticos individuais (eppendorf) contendo 100  $\mu\text{l}$  de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). Imediatamente após a coleta da amostra, está foi homogeneizada por 1 minuto em vortex e posteriormente acrescida de 100  $\mu\text{l}$  de solução de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo para análise por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* . Estes tubos foram identificados e armazenados à  $-80^{\circ}\text{C}$ .



### 3.5. Monitoramento clínico

O monitoramento clínico foi realizado no momento inicial (-14 dias) e 3 meses após o término da terapia de RAR por meio de sondas periodontais manuais (PCPUNC - BR15, HuFriedy do Brasil, RJ, Brasil). Um examinador foi treinado e calibrado com o objetivo de se conseguir a melhor reprodutibilidade nas medições realizadas. A metodologia utilizada para a calibração foi preconizada por Araujo et al. (2003) onde se avaliou o erro padrão da medida (e.p.m) e o erro médio percentual (e.m.p) para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção). O e.p.m e e.m.p intra-examinador demonstrou que o examinador obteve e.p.m. de 0,17mm e 0,20mm para a PS e NCI, respectivamente. Esses valores de e.p.m. indicam uma reprodutibilidade aceitável dentro dos parâmetros de pesquisa clínica periodontal. Para as variáveis categóricas (índice de placa visível e índice de sangramento gengival), considerando somente a presença ou a ausência do parâmetro clínico, foi realizada a média do nível de concordância e o examinador apresentou uma concordância intra-examinador igual a 91% (Teste Kappa).

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

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

\* *Índice de Sangramento Gengival – ISG* (Ainamo; Bay, 1975): Observou-se a presença ou ausência de sangramento na gengiva marginal após percorrer levemente com a sonda periodontal ao longo do sulco gengival. A ausência de sangramento recebeu o escore 0 e a presença de sangramento recebeu escore 1.

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

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

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

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

### **3.6. Procedimentos terapêuticos**

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

Após o exame clínico e coleta de placa dentária subgengival para análise microbiológica, os indivíduos foram submetidos à raspagem supragengival e instruções de higiene oral (IHO). Em seguida, receberam 4 a 6 sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy, Chicago, EUA), sob anestesia local com BioPressin<sup>®</sup> - cloridrato de prilocaína a 3%, felipressina 0,03UI (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Estas sessões de RAR tiveram uma duração de aproximadamente 1 hora e foram realizadas em 14 dias. O tratamento periodontal recebido foi gratuito durante toda a duração do estudo. As outras necessidades de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da Clínica de Graduação da Universidade Guarulhos.

#### **3.6.2. Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos**

Os indivíduos do estudo receberam RAR e administração de 1,2 g/dia de metronidazol (400 mg de 8/8 hs) combinado com 1,5 g/dia de amoxicilina (500 mg de 8/8 horas) via oral por 14 dias, iniciada em conjunto a terapia periodontal básica. Os antibióticos foram manipulados especialmente para este estudo na Farmácia de Manipulação da Universidade Guarulhos, e fornecido gratuitamente aos indivíduos do estudo. Os indivíduos foram monitorados de 3 em 3 dias quanto a reações adversas da medicação e para controle da cooperação na ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, por um aluno de iniciação científica.

### 3.7. Monitoramento microbiológico

#### **Análise microbiológica por meio da técnica do *Checkerboard DNA DNA Hybridization***

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

A lista das 40 cepas bacterianas que foram utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA foram descritas previamente no estudo de Mestnik et al. (2010). Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, USA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub>). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado e 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado, 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma). *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose, 400µg/ml de niaciamida, 150µg/ml espermina tetraidroclorídrica, 20µg/ml de isobutirato de Na, 1mg/ml de L-cisteína, 5µg/ml de tiamina pirofosfato e 0,5% de soro bovino.

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

As cepas bacterianas foram anaerobicamente cultivadas na superfície de ágar-sangue contido em placas de Petri, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo de cultura, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos de microcentrífuga de 1,5ml contendo 1ml de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células das cepas Gram-negativas

foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). As cepas Gram-positivas foram lisadas em 150µl de uma mistura enzimática contendo 15mg/ml de lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão de TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas multi-genômicas (*whole-genomic*) foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do random primer digoxigenin labeling kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, in, USA), de acordo com o método descrito por Feinberg e Vogelstein (1983). As espécies bacterianas avaliadas foram selecionadas segundo sua associação com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Haffajee; Socransky, 1994).

#### Hibridização DNA-DNA

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

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

Em seguida, a membrana foi posicionada no Miniblotter (Immunelectrics, Figura 3) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. E em

cada canaleta do Miniblotter (Immunetics) adicionado uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130 µl de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período mínimo de 20 horas, a 42° C.

#### Detecção das espécies

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

Os próximos passos foram a incubação da membrana por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-Star<sup>TM</sup> Detection Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England,UK). A seguir, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30x40cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca Kodak X-Omat K, 18x24cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, sempre mantidas à temperatura de 20°C.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> 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 aproximadamente  $10^5$  células; 3, entre  $10^5$  e  $10^6$  células; 4 aproximadamente  $10^6$  células e 5, mais de  $10^6$  células (Tabela 1). Estes registros então foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nos sítios e indivíduos do estudo.

**Tabela 1.** Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de placa subgengival.

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

### 3.8. Análise estatística

#### 3.8.1 Variável primária e variáveis secundárias de avaliação

A variável primária de avaliação no presente estudo foi a diferença entre os grupos terapêuticos no ganho de inserção de sítios inicialmente profundos (PS  $\geq$  7mm). As variáveis secundárias foram a diferença entre os grupos no ganho de inserção clínica e redução de PS entre o início e 3 meses pós-terapia na avaliação de boca-toda, em sítios inicialmente intermediários (PS 4-6mm); alterações ocorridas no decorrer do estudo em todos os parâmetros clínicos, número de indivíduos apresentando risco baixo, moderado e alto para progressão de doença (Lang & Tonetti, 2003), e de indivíduos com 0, 1-2 ou  $\geq$  3 sítios com PS  $\geq$  6mm, aos 3 meses pós-terapia; número de sítios com PS  $\geq$  5mm ou  $\geq$  6 mm aos 3 meses após a terapia; alterações ocorridas nos níveis bacterianos durante o período experimental e alterações ocorridas nas proporções dos complexos microbianos.

### 3.8.2. Monitoramento clínico

A média das medidas clínicas de PS e NCI, assim como a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração,  $PS_{\geq 5\text{mm}}$  e  $PS_{\geq 6\text{mm}}$  foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. As diferenças dentro de cada grupo, entre os tempos experimentais foram avaliadas utilizando o teste t de Student para amostras pareadas. O teste t de Student foi utilizado para examinar diferenças entre os 2 grupos terapêuticos nos diferentes tempos experimentais.

A significância estatística foi estabelecida em 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3.8.3. Monitoramento microbiológico

Os dados microbiológicos da análise das 40 espécies bacterianas em 9 amostras de biofilme subgengival por indivíduo foram expressos em contagem (níveis) e proporção. Para comparar os níveis médios de cada uma das espécies bacterianas, os dados foram expressos como contagem  $\times 10^5$  em cada sítio e avaliados por indivíduo e depois entre indivíduos, dentro de cada grupo, em cada tempo do estudo. De maneira semelhante a proporção de cada espécie foi computada para cada sítio, e depois calculadas as médias entre os sítios em cada indivíduo, e então entre os indivíduos de um mesmo grupo em cada tempo experimental. Todos os dados iniciais e de 3 meses pós-terapias (níveis) foram analisados pelo teste de Mann–Whitney para detectar possíveis diferenças significantes entre os 2 grupos. Diferenças nos níveis médios de microrganismos dentro de cada grupo, entre o início do estudo e 3 meses pós-terapia, foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon. Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, considerando  $p < 0,00125$  ( $p < 0,05$ ), como proposto por Socransky et al. (1991). A significância estatística foi estabelecida em 5%.

## ARTIGO CIENTÍFICO

### **Clinical and microbiological effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized chronic periodontitis: Smokers versus non-Smokers.**

**Running title:** MTZ plus AMX in the treatment of smokers and non-smokers.

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

---

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

Marcelo Favero  
Centro de Pós-Graduação e Pesquisa-CEPPE  
Universidade Guarulhos  
Praça Tereza Cristina, 229 Centro  
07023-070 Guarulhos, SP, Brazil  
e-mail: mfavero@prof.ung.br



## ABSTRACT

**Aim:** To evaluate the clinical and microbiological effects of the adjunctive use of metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) in the treatment of smokers and non-smokers with generalized chronic periodontitis (GChP). **Methods:** Thirty two smokers and 32 non-smokers were selected and received scaling and root planing (SRP) combined with MTZ (400 mg/TID) and AMX (500 mg/TID) for 14 days. Clinical and microbiological examinations were performed at baseline and 3 months post-SRP. Nine subgingival plaque samples per subject were analyzed using checkerboard DNA-DNA hybridization. **Results:** Both groups presented a significant improvement in all clinical parameters at 3 months post-therapy ( $p < 0.05$ ). Non-smokers showed lower mean number of sites with probing depth (PD)  $\geq 5$  mm after therapy. Fewer non-smokers exhibited  $\geq 9$  of these sites at 3 months post-treatment. Non-smokers also presented the greatest reductions in mean probing depth (PD) and gain in clinical attachment between baseline and 3 months post-therapy at initially deep (PD  $\geq 7$  mm) sites ( $p < 0.01$ ). The most beneficial changes in the microbial profile were also observed in the non-smokers group, which showed the lowest proportions of the orange complex at 3 months, as well as a significant increase in the proportions of *Actinomyces* species after treatment. **Conclusion:** Smokers showed less favourable clinical and microbiological outcomes after SRP combined with MTZ+AMX in comparison with non-smokers.

**Key-words:** Periodontal disease; Scaling and root planing; Metronidazole, Amoxicillin; Generalized chronic periodontitis; Periodontal treatment; Smokers

**Conflict of interest and source of funding statement-** the authors declare that they have no conflict of interests.

## INTRODUCTION

Smoking plays a significant role in the pathogenesis of chronic periodontitis (ChP) (Gelskey 1999, Thomson et al. 2007, Johnson & Guthmiller 2007, Corraini et al. 2008) and it is one of the main, and most prevalent risk factors of this infection (Johnson & Guthmiller 2007, Susin et al. 2004). There are significant associations between dose and “years of exposure” to tobacco products with the severity periodontal disease (Grossi et al. 1995, Martinez-Canut et al. 1995) with an increased odds ratio of 2 to 8, depending on the definition of periodontal disease and smoking history (Bergstrom 1989, 2003, Susin et al. 2004, Johnson & Guthmiller 2007). The negative effects of smoking on bacterial challenge (Kazor et al. 1999, Haffajee and Socransky 2001, Gomes et al. 2008, 2006, Kumar 2012) and the reduced immune-inflammatory response (Soder et al. 2002, Bostrom et al. 1998, 1999, Fredriksson et al. 2002) have been suggested as possible mechanisms by which smokers are at increased risk of periodontitis.

Several studies reported greater reduction in probing depth (PD) and gain in clinical attachment (CA) in non-smokers compared with smokers after different periodontal therapies, including non-surgical (Preber et al. 1995, Kaldahl et al. 1996, Renvert et al. 1998, Jin et al. 2000, Wan et al. 2009) and surgical approaches (Trombelli et al. 2003, Papantonopoulos et al. 2004). Jin et al. (2000) reported significant greater reduction in mean PD reduction in non-smokers ( $2.4 \pm 0.2$  mm) in comparison with smokers ( $1.1 \pm 0.3$  mm) at 3 months post-scaling and root planing (SRP). In addition, a systematic review evaluating the effect of smoking on non-surgical periodontal therapy (Labriola et al. 2005) demonstrated that the mean difference in PD reduction between smokers and non-smokers in sites with initial  $PD \geq 5$  mm were 0.43 mm in favor of non-smokers. Hence, smokers seem to respond less favorable to periodontal therapy, suggesting that these subjects might need additional treatments in order to achieve better and more sustained clinical outcomes.

Randomized controlled clinical trial have demonstrated that the use of amoxicillin (AMX) and metronidazole (MTZ) as adjuncts to mechanical therapy improves the clinical and microbiological outcomes of SRP in non-smokers (Winkel et al. 2001, Rooney et al. 2002, Cionca et al. 2010, Silva et al. 2011,

Feres et al. 2012). We have recently described certain clinical and microbiological benefits of SRP+MTZ+AMX also in smokers (Matarazzo et al. 2008), but apparently this therapy was less effective in reducing certain putative pathogens from the orange complex in comparison with a group of non-smokers (Silva et al. 2011). However, to date, the effects of this antibiotic protocol have not been directly compared in non-smokers and smokers. Therefore, the aims of this study was to compare the clinical and microbiological effects of the adjunctive use of MTZ+AMX to SRP in smokers and non-smokers subjects with ChP. It was hypothesized that non-smokers would better be benefited from this combination of therapies than the smokers.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample size calculation**

This study was designed to compare the clinical and microbiological effects of the treatment of smokers and non-smokers subjects with SRP+MTZ+AMX. The ideal sample size to assure adequate power for this clinical trial was calculated considering differences of at least 1mm between groups for clinical attachment level (CAL) in initially deep periodontal sites (PD  $\geq$  7 mm). It was also determined that the standard deviation of CAL change at deep sites was 1.0 mm based on our earlier studies of smokers and non-smokers receiving SRP combined with MTZ+AMX (Matarazzo et al. 2008, Silva et al. 2012). Based on these calculations, it was defined that 26 subjects per group would be necessary to provide an 85% power with a  $\alpha$  of 0.01. Considering an attrition of about 20%, it was established that at least 32 subjects should be included in each treatment group.

### **Subject Population, Inclusion and Exclusion Criteria**

Subjects' recruitment started in July 2010 and was completed at the end of June 2012. Sixty-four subjects - 32 smokers and 32 non-smokers - 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. This study protocol was approved by the Guarulhos University Clinical Research Ethics Committee.

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:  $\geq 35$  years of age, presence of at least 15 teeth and a minimum of 6 teeth with at least one site each with PD and clinical attachment level (CAL)  $\geq 5$  mm, as well as at least 30% of the sites with PD and CAL  $\geq 4$  mm and bleeding on probing (BOP). The smokers considered for this investigation had smoked at least 10 cigarettes per day for a minimum of 5 years before the beginning of the study (Ammenheuser et al. 1997) and expressed no interest in quitting smoking. Non-smokers had never smoked. The exclusion criteria were as follows: previous subgingival periodontal therapy, pregnancy, nursing, systemic diseases that could affect the progression of periodontal disease (e.g. diabetes, osteoporosis), long-term administration of anti-inflammatory medications, need for antibiotic pre-medication for routine dental therapy, continuous use of mouthrinses containing antimicrobials, antibiotic therapy in the previous 6 months and allergy to MTZ or AMX.

### **Experimental design, allocation concealment and treatment protocol**

In this cohort clinical trial, subjects were assigned according to their smoking status, in smoker and non-smokers.. All subjects received SRP combined with systemic MTZ (400 mg) and AMX (500 mg). Both antibiotics were administered T.I.D. for 14 days. Before the study began, all subjects received full-mouth supragingival scaling and instruction on proper home-care techniques. They were also given the same dentifrice to use during the study period (Colgate Total<sup>®</sup>, Anakol Ind. Com. Ltda- Kolynos do Brasil - Colgate Palmolive Co, São Bernardo do Campo, SP, Brazil). All subjects received full-mouth SRP performed under local anesthesia from four to six appointments lasting approximately 1h each. Treatment of the entire oral cavity was completed from 10 to 14 days. SRP was performed by one trained periodontist using manual instruments (I.B.J). The antibiotic therapies started immediately after the first session of mechanical instrumentation. Guarulhos University

Pharmacy prepared the antibiotic pills and sent them to the study coordinator (M. Fa.), who marked the code number of each subject on a set of two packs, , and gave them to the examiner (R.A). All subjects received clinical and microbiological monitoring at baseline and at 3 months post-therapy.

### **Monitoring of compliance and adverse events**

The subjects were asked to bring the packs containing the medication once a week when compliance was checked. The packs contained 21 capsules of each antibiotic, enough for 1 week of medication. During these visits, subjects returned the old pack containing the antibiotic and received a new pack of medication. They also answered a questionnaire about any self-perceived side-effects of the medication. Two study assistants conducted this inquiry, and were also responsible for calling the subjects every 2 days to monitor compliance.

### **Clinical Monitoring**

Clinical monitoring was performed by one calibrated examiner and the treatment was carried out by another clinician. Thus, the examiner and the clinician were masked as to the nature of the treatment groups. Visible plaque (presence or absence), gingival bleeding (presence or absence), bleeding on probing (BOP; presence or absence), suppuration (presence or absence), PD (mm) and clinical attachment level (CAL, mm) were measured at six sites per tooth (mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual and mesiolingual) in all teeth, excluding third molars. The PD and CAL measurements were recorded to the nearest millimeter using a North Carolina periodontal probe (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

### **Investigator' Calibration**

The examiner participated in a calibration exercise that was performed in 10 non-study subjects with periodontitis. The calibration exercise was previously described in Mestnik et al. (2010). The standard error of measurement was calculated and the intra-examiner variability was 0.17 mm for PD and 0.20 mm for CAL.

## **Microbiological Monitoring**

### ***Sample Collection***

Subgingival plaque samples were collected at baseline and at 3 months post-SRP from nine non-contiguous interproximal sites per subject. The selected sites were randomized in different quadrants and subset according to baseline PD, three samples in each of the following categories: shallow ( $PD \leq 3$  mm), intermediate (PD 4–6 mm) and deep ( $PD \geq 7$  mm). After the clinical parameters had been recorded, the supragingival plaque was removed and the subgingival samples were taken with individual sterile mini-Gracey curettes (#11-12) and immediately placed in separate Eppendorf tubes containing 0.15 ml of TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6). One hundred microliters of 0.5 M NaOH was added to each tube and the samples were dispersed using a vortex mixer.

### ***Checkerboard DNA–DNA hybridization***

Counts of 40 bacterial species were determined in each sample, using the Checkerboard DNA–DNA hybridization technique (Socransky et al. 1994, Matarazzo et al. 2008). The microbiological analysis was entirely performed at the Laboratory of Microbiology of Guarulhos University. The samples were boiled for 10 min. and neutralized using 0.8 ml of 5M ammonium acetate. The released DNA was then placed into the extended slots of a Minislot 30 apparatus (Immunitics, Cambridge, MA, USA), concentrated on a 15X15 cm positively charged nylon membrane (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) and fixed to the membrane by baking it at 120°C for 20 min. The membrane was placed in a Miniblotter 45 (Immunitics) with the lanes of DNA at 90° to the lanes of the device. Digoxigenin-labelled whole genomic DNA probes for 40 bacterial species were hybridized in individual lanes of the Miniblotter. After hybridization, the membranes were washed at high stringency and the DNA probes were detected using the antibody to digoxigenin conjugated with alkaline phosphatase and chemiluminescence detection. The last two lanes in each run contained standards at concentrations of  $10^5$  and  $10^6$  cells of each species. Signals were converted to absolute counts by comparison with the standard lanes on the membrane. The sensitivity of the assay was adjusted to

permit the detection of  $10^4$  cells of a given species by adjusting the concentration of each DNA probe.

### **Primary and secondary outcome variables**

The primary outcome variable of this study was the mean CAL change at 3 months post-SRP in sites with initial PD  $\geq 7$  mm. Secondary outcome variables were differences between groups for the following parameters: number and percentage of subjects with low, moderate and high risk for disease progression, mean CAL and PD changes in the full-mouth as well as in sites with initial PD between 4–6 mm; mean number and percentage of sites/subjects with PD $\geq 5$  mm and PD $\geq 6$  mm; percentage of sites with BOP, plaque accumulation, gingival bleeding and suppuration, as well as differences in the occurrence of adverse events and differences between therapies for the mean changes in levels of the 40 bacterial species analyzed and changes in the mean proportion of the microbial complex.

### **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  $\geq 7$  mm or the mean number/percentage of sites with PD $< 5$  mm or  $\geq 5$  mm,  $\geq 6$  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 paired Student's *t*-Test, and between groups (at each time point) using the Student's *t*-Test test. Chi-square test was used to compare the differences in the frequency of gender, of subjects exhibiting different categories of residual sites at 3 months post-therapy and of self-perceived adverse effects. Mean counts ( $\times 10^5$ ) of individual bacterial species were averaged within each subject and then across subjects in both groups. The percentage of the total DNA probe counts was determined initially in each site, then per subject and averaged across subjects in the two groups. The significance of differences between groups for the microbiological parameters was sought using the Mann–Whitney U-test. The Wilcoxon test was used to detect statistically significant differences within each group between the

time points. Adjustments for multiple comparisons (Socransky et al. 1991) were performed when the 40 bacterial species were evaluated simultaneously. The level of significance was set at 5%.

## **Results**

### **Subject retention, compliance and adverse effects**

There were no dropouts during the course of the study period. All subjects returned for the three-month follow-up visit. Thus, a total of 64 subjects completed the study, 32 in each group (smokers and non-smokers). Figure 1 presents the flow chart of the study design. All subjects reported that they completed the course of the antibiotics, and this information was confirmed by pill counts. Five subjects from both groups reported adverse events (diarrhea and vomiting) during the study. No significant differences were observed between groups for the number of subjects reporting adverse events ( $p>0.05$ ). All subjects reported that they would start the treatment again if necessary.

### **Clinical Findings**

Table 1 presents the demographic characteristics and the full-mouth mean clinical data for the clinical parameters evaluated at baseline and at 3 months post-therapies. There were no significant differences between groups for any parameter at baseline ( $p>0.05$ ), except for the mean number of cigarette per day ( $p>0.05$ ). All therapies led to a significant decrease in mean PD, CAL and in the percentage of sites with visible plaque, gingival bleeding, BOP and suppuration. At 3 months the full-mouth mean PD and mean percentage of site with BOP was statistically significantly lower in the non-smoker group in comparison with the smoker group.

The mean PD reduction and clinical attachment (CA) gain between baseline and 3 months post-therapy are presented in Table 2. Non-smokers taking MTZ+AMX exhibited a greater reduction in PD and gain in CA (primary outcome variable) in initially deep sites ( $PD\geq 7$  mm;  $p<0.01$ ) in comparison with smokers. They also showed the greatest reduction in the mean PD of initially intermediate sites (PD 4-6mm).



Table 3 presents the mean number and mean percentage of sites with PD $\geq$ 5 mm and PD $\geq$ 6 mm at 3 months post-treatment. Both groups exhibited a significant reduction in the number/percentage of these sites over the course of the study ( $p < 0.05$ ). The non-smoker group had statistically significantly fewer sites with PD $\geq$ 5 mm compared with the smoker group at 3 months post-therapy. Although not statistically significant, the non-smoker group showed fewer sites with PD $\geq$ 5 mm with BOP ( $n=5.15$ ) in comparison with the smoker group ( $n=8.0$ ) (Data not shown).

Data for residual sites at subject level are presented in Table 4. The upper panel of Table 4 was organized according to the individual risk profile for periodontal disease progression proposed by Lang & Tonetti (2003), as follows: low risk:  $\leq 4$  sites with PD $\geq 5$ mm; moderate risk: 5-8 sites with PD $\geq 5$ mm and high risk:  $\geq 9$  sites with PD $\geq 5$  mm. Fewer subjects in the non-smoker group ( $n=9$ , 28.2%) still had high risk for disease progression at 3 months post-therapy ( $\geq 9$  sites with PD $\geq 5$  mm), in comparison with the smoker group ( $n=18$ , 56.3%). Conversely, 16 subjects in the non-smoker group and 9 in the smoker group showed low risk for disease progression ( $\leq 4$  sites with PD $\geq 5$  mm) at the end of the study period. Although not statistically significant, this same trend was observed for different thresholds (none, 1-2 or  $\geq 3$ ) of residual sites with PD $\geq 6$ mm.

### **Microbiological Findings**

Four species (*Veillonella parvula*, *Capnocytophaga ochracea*, *Campylobacter gracilis* and *Selenomonas noxia*) presented significant higher levels in smokers in comparison to non-smokers (data not shown,  $p < 0.001$ ). Figure 2 presents the mean counts ( $\times 10^5$ ) as well as the mean changes of the 40 species evaluated over the course of the study. The species were grouped according to the microbial complexes described by Socransky et al. (1998). In general, counts of most of the host-compatible species did not change significantly from baseline to 3 months post-therapy for both groups (*Actinomyces* species, purple, yellow and green complexes). *Actinomyces oris* was the only species that presented a statistically significant increase in levels in the non-smokers group. A reduction in mean counts of several periodontal

pathogens from the red and orange complexes was observed, especially in the non-smoker group ( $p < 0.05$ ). *Eubacterium nodatum* was the only species from the orange complex that was reduced in the smoker group, while six species (*C. gracilis*, *E. nodatum*, *Fusobacterium nucleatum* ss. *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* ss. *vincentii*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*) were reduced in the non-smoker group. The counts of the three pathogens from the red complex, *T. forsythia*, *P. gingivalis* and *T. denticola*, were significantly reduced in both groups ( $p < 0.05$ ). Overall, the mean changes at 3 months post-therapy on the levels of the 40 bacterial species evaluated were quite similar between the two groups, except for several orange complex species, which were less affected by therapy in smokers. *F. nucleatum* ss. *nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum* and *Parvimonas micra* presented a statistically significantly lower mean reduction in smokers.

Figure 3 shows changes in the proportions of the microbial complexes in the two groups at baseline and 3 months post-treatments. The microbial profiles were profoundly affected by treatments, and the most beneficial changes were observed in the non-smokers group. These subjects showed a significant reduction in the proportions of red and orange complexes from baseline to 3 months post-therapy as well as an increase in the proportion of beneficial *Actinomyces* species, purple, green and yellow complexes. In the smokers group, the treatment led to a statistically significant reduction of the mean proportions of the red complex and an increase in the proportions purple and green complexes. At 3 months post-treatment there was a significantly lower proportion of the orange complex species and a higher proportion of the *Actinomyces* species in the non-smokers group in comparison with the smokers group ( $p < 0.05$ ).

## **DISCUSSION**

To our knowledge, this was the first case-control clinical trial specially designed to directly compare the adjunctive effects of MTZ+AMX in the treatment of smokers and non-smokers with generalized ChP. These short-term results indicated that the clinical and microbiological benefits observed with the use of this therapeutic protocol were more profound in non-smokers than in

smokers Overall, the results of this study confirm that smokers respond less favorable to periodontal therapy than non-smokers. Interestingly, even the very powerful therapy used in this study –that has been showing excellent results for the treatment of non-smokers – was not as effective for the treatment of smokers. These results suggest that other adjunctive therapies, such as lasers and alternative antibiotics could be further explored for improving the clinical and microbiological outcomes of this group of patients.

At 3 months post-therapy non-smokers submitted to SRP plus MTZ+AMX exhibited significant greater reduction in mean PD and gain in mean CA in initially deep sites, as well as lower mean number of sites with PD $\geq$ 5 mm (Tables 2 and 3) compared with the smokers submitted to the same therapy. In addition, data for remaining deep sites with PD $\geq$ 5 mm at the subject level were also rather informative (Table 4). Sixteen (50%) non-smokers and only 9 (28.2%) smokers achieved a low risk for future disease recurrence according to Lang & Tonetti (2003) at 3 months, i.e. presented at most 4 sites with PD $\geq$ 5mm. It should be emphasized that the presence of residual sites after treatment is an important clinical endpoint of therapy (Matuliene et al. 2008, 2010, Feres et al. 2012) and the weaker effect of the tested therapy on reducing these residual sites should be taken with caution.

The fact that smokers respond less favorable to mechanical non-surgical periodontal therapy than non-smokers is a quite well established concept (Preber et al. 1995, Kaldahl et al. 1996, Renvert et al. 1998, Jin et al. 2000, Wan et al. 2009). However, the literature is very scarce in terms of the effects of the adjunctive use of MTZ+AMX to SRP in the treatment of smokers. The few data available come from some clinical trials that have included some smokers (Söder et al. 1999, Winkel et al. 2001, Pahkla et al. 2006) and from one study that included only smokers (Matarazzo et al. 2008). Taken together, the results of these studies as well those from the present investigation demonstrate that smokers normally exhibit, in average, from 50 to 75% of the clinical improvements achieved by the non-smokers (Johnson & Guthmiller 2007), even when MTZ and AMX were used, as observed in the present investigation.

In agreement with the clinical results, non-smokers presented the most favourable changes in the subgingival microbial profile after treatment. Both groups showed a striking reduction in the mean levels of the three red complex

pathogens (*T.forsythia*, *P.gingivalis* and *T. denticola*), as well as on the proportions of this complex (Figs. 2 and 3). These results are in agreement with studies that also demonstrated the adjunctive effects of these two antibiotics in reducing red complex species in population mainly composed of smokers (Söder et al. 1999, Winkel et al. 2001, Matarazzo et al. 2008) or of non-smokers with ChP (Berglundh et al. 1998, Winkel et al. 1998, Silva et al. 2011). When the putative pathogens from the orange complex were evaluated, it was observed that although the therapy employed was effective in reducing orange complex in non-smokers, this effect was not observed in the smokers group (Figure 3). Indeed, the only species from this complex that showed a statistically significant reduction in smokers was *E. nodatum* (Fig. 2) and, interestingly, the *Fusobacterium* species were only reduced in non-smokers (Fig. 2). In fact, the proportion of the orange complex did not change between time-points (31.0% to 31.1%) in smokers, while in the non-smoker group this complex presented a significant reduction (30.8% to 18.9%) (Figure 3). The minor effect of the mechanical therapy combined of not with this antibiotic regimen in suppressing individual levels of orange complex species or the mean proportion of this complex in smokers has been suggested previously (Matarazzo et al. 2008, van Winkelhoff et al. 2001, Grossi et al. 2007). We have reported that species from the orange complex might persist after periodontal therapy in smokers, even when MTZ+AMX was used as adjuncts to mechanical treatment. At 3 months post-therapy, smokers who received SRP combined with MTZ+AMX showed a trend to increase the mean proportion of this complex, that went from 30.9% to 32.2%. Those who received SRP-only showed an even higher increase in these pathogens, from 29.1% to 36.7% (Matarazzo et al. 2008). Since the suppression of this complex is one of the important endpoints of the periodontal therapy (Teles et al. 2006, Matarazzo et al. 2008), it might be speculated that the lower clinical effects observed in smokers in the present study might be associated with the lack of efficacy of treatment in reducing orange complex, more specifically *Fusobacterium* species. There was a trend towards an increase in some host-compatible species, particularly those from the purple and green complexes in both groups. These results are in agreement with previous reports (Matarazzo et al. 2008, Silva et al. 2011). However, it is interesting to note that the proportions of the *Actinomyces* species, highly

associated with periodontal health, showed a statistically significant increase post-therapy only in the non-smoker group.

Several biological pathways, such as the alteration of the neutrophil function (Matthews et al. 2011, Güntsch et al. 2006), antibody production (Palmer et al. 1999), local effects of nicotine (Tipton et al. 1995, Makino et al. 2008), differences in the subgingival microbiota (Kazor et al. 1999, van Winkelhoff et al. 2001, Gomes et al. 2006, Kumar 2012) or in the production of inflammatory mediators (Boström et al. 1998, Fredriksson et al. 2002, Makino et al. 2008) have been suggested as possible causes for the poorer response to therapy observed in smokers when compared with non-smokers with chronic periodontitis (Preber et al. 1995, Kaldahl et al. 1996, Renvert et al. 1998, Jin et al. 2000, Matarazzo et al. 2008, Wan et al. 2009). Another possible explanation particularly associated with the treatment regimen used in the present study is that smoking might interfere with the bioavailability of metronidazole in plasma (Montalli et al. 2012). Montalli et al. (2012) detected a statistically significant reduction in plasmatic metronidazole concentration in smokers compared with non-smokers. Since there is a positive correlation between the bioavailability of metronidazole in plasma and in the gingival crevicular fluid (GCF) (Pähkla et al. 2005), the antibiotic concentration in the subgingival environment may be impaired by smoking leading to the reduced clinical and microbiological effects of the therapy observed in the present study. Therefore, this hypothesis regarding antibiotic bioavailability in GCF of smokers should be further explored.

## **CONCLUSION**

Smokers with chronic periodontitis treated with SRP+AMX+MTZ show less favourable clinical and microbiological outcomes than non-smokers. Other treatment modalities should be studied for the treatment of these subjects.

## References

Gelskey SC. Cigarette smoking and periodontitis: methodology to assess the strength of evidence in support of a causal association. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999 Feb;27(1):16-24.

Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Risk indicators for increased probing depth in an isolated population in Brazil. *J Periodontol.* 2008 Sep;79(9) :1726-34.

Thomson WM, Slade GD, Beck JD, Elter JR, Spencer AJ, Chalmers JM. Incidence of periodontal attachment loss over 5 years among older South Australians. *J Clin Periodontol.* 2004 Feb;31(2):119-25.

Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000.* 2007;44:178-94.

Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in an urban Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2004 Nov;31(11):951-8.

Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol.* 1995 Jan;66(1):23-9.

Martinez-Canut P, Lorca A, Magán R. Smoking and periodontal disease severity. *J Clin Periodontol.* 1995 Oct;22(10):743-9.

Bergström J. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1989 Oct;17(5):245-7.

Bergström J. Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2003 Feb;30(2):107-13.

Kazor C, Taylor GW, Loesche WJ. The prevalence of BANA-hydrolyzing periodontopathic bacteria in smokers. *J Clin Periodontol.* 1999 Dec;26(12):814-21.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2001 May;28(5):377-88.

Gomes SC, Nonnenmacher C, Susin C, Oppermann RV, Mutters R, Marcantonio RA. The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2008 Dec;79(12):2297-304.

Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, Marcantonio RA. 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.

Kumar PS. Smoking and the subgingival ecosystem: a pathogen-enriched community. *Future Microbiol.* 2012 Aug;7(8):917-9.

Söder B, Jin LJ, Wickholm S. Granulocyte elastase, matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002 May;29(5):384-91.

Boström L, Linder LE, Bergström J. Clinical expression of TNF-alpha in smoking-associated periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1998 Oct;25(10):767-73.

Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and cervicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1999 Jun;26(6):352-7.

Fredriksson M, Bergström K, Asman B. IL-8 and TNF-alpha from peripheral neutrophils and acute-phase proteins in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002 Feb;29(2):123-8.

Preber H, Linder L, Bergström J. Periodontal healing and periopathogenic microflora in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol.* 1995 Dec;22(12):946-52.

Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1996 Jul;67(7):675-81.

Renvert S, Dahlén G, Wikström M. The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):153-7.

Jin L, Wong KY, Leung WK, Corbet EF. Comparison of treatment response patterns following scaling and root planing in smokers and non-smokers with untreated adult periodontitis. *J Clin Dent.* 2000;11(2):35-41.

Wan CP, Leung WK, Wong MC, Wong RM, Wan P, Lo EC, Corbet EF. Effects of smoking on healing response to non-surgical periodontal therapy: a multilevel modelling analysis. *J Clin Periodontol.* 2009 Mar;36(3):229-39.

Trombelli L, Cho KS, Kim CK, Scapoli C, Scabbia A. Impaired healing response of periodontal furcation defects following flap debridement surgery in smokers. A controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2003 Jan;30(1):81-7.

Papantonopoulos GH. Effect of periodontal therapy in smokers and non-smokers with advanced periodontal disease: results after maintenance therapy for a minimum of 5 years. *J Periodontol.* 2004 Jun;75(6):839-43.

Labriola A, Needleman I, Moles DR. Systematic review of the effect of smoking on nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2005;37:124-37.

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

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 Jan;81(1):15-23.

Silva MP, Feres M, Siroto TA, Soares GM, Mendes JA, Faveri M, Figueiredo LC.

Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2011 Sep;38(9):828-37.

Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS, Kent R, Teles R, Hasturk H, Bogren A, Van Dyke T, Wennstrom J, Lindhe J. 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 Jun;39(6):526-36.

Feres M, Soares GM, Mendes JA, Silva MP, Faveri M, Teles R, Socransky SS, Figueiredo LC. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2012 Dec;39(12):1149-58.

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.

Lang NP, Tonetti MS. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health Prev Dent*. 2003;1(1):7-16.

Armitage, G. C. (1999) Development of a classification and conditions. *Annals of Periodontology* 4, 1-6.

Ammenheuser MM, Hastings DA, Whorton EB Jr, Ward JB Jr. Frequencies of hprt mutant lymphocytes in smokers, non-smokers, and former smokers. *Environ Mol Mutagen*. 1997;30(2):131-8.

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2010 Apr;37(4):353-65.



Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994 Oct;17(4):788-92.

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

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

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 Jul;70(7):761-71.

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.

Matuliene G, Pjetursson BE, Salvi GE, Schmidlin K, Brägger U, Zwahlen M, Lang NP. Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance. *J Clin Periodontol*. 2008 Aug;35(8):685-95.

Matuliene G, Studer R, Lang NP, Schmidlin K, Pjetursson BE, Salvi GE, Brägger U, Zwahlen M. Significance of Periodontal Risk Assessment in the recurrence of periodontitis and tooth loss. *J Clin Periodontol*. 2010 Feb;37(2):191-9.

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.

van Winkelhoff AJ, Bosch-Tijhof CJ, Winkel EG, van der Reijden WA. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol*. 2001 May;72(5):666-71.

Grossi SG, Goodson JM, Gunsolley JC, Otomo-Corgel J, Bland PS, Doherty F, Comiskey J. Mechanical therapy with adjunctive minocycline microspheres reduces red-complex bacteria in smokers. *J Periodontol*. 2007 Sep;78(9):1741-50.

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

Matthews JB, Chen FM, Milward MR, Wright HJ, Carter K, McDonagh A, Chapple IL. Effect of nicotine, cotinine and cigarette smoke extract on the neutrophil respiratory burst. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38(3):208-18.

Güntsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J Periodontal Res.* 2006 Jun;41(3):184-8.

Al-Ghamdi HS, Anil S. Serum antibody levels in smoker and non-smoker saudi subjects with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2007 Jun;78(6):1043-50.

Palmer RM, Scott DA, Meekin TN, Poston RN, Odell EW, Wilson RF. Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. *J Periodontal Res.* 1999 Oct;34(7):363-9.

Makino A, Yamada S, Okuda K, Kato T. Nicotine involved in periodontal disease through influence on cytokine levels. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Mar;52(2):282-6.

Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 1995 Dec;66(12):1056-64.

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

Montalli VA, Bergamaschi Cde C, Ramacciato JC, Nolasco FP, Groppo FC, Brito RB Jr, Haas DA, Motta RH. The effect of smoking on the bioavailability of metronidazole in plasma and saliva. *J Am Dent Assoc.* 2012 Feb;143(2):149-56.

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

**Table 1.** Demographic characteristics and mean ( $\pm$  SD) full-mouth clinical parameters at baseline and 3 months post-therapy.

Variable	Time-point	Groups		t-test (p-value)
		SRP+MTZ+AMX Non-smokers (n=32)	SRP+MTZ+AMX Smokers (n=32)	
Gender (male/female)*	Baseline	15/17	16/16	0.80250
Age (years)	Baseline	47.59 $\pm$ 8.52	42.86 $\pm$ 7.16	0.06096
Cigarette day	Baseline	0.0 $\pm$ 0.0	14.41 $\pm$ 4.46	<0.05
PD (mm)	Baseline	3.97 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	4.17 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	0.12256
	3 months	2.70 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	3.12 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	<b>0.00005</b>
CAL (mm)	Baseline	4.75 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	4.84 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	0.54568
	3 months	3.93 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	4.07 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	0.30246
% sites with Plaque accumulation	Baseline	73.5 $\pm$ 17.8 <sup>a</sup>	74.6 $\pm$ 18.2 <sup>a</sup>	0.80901
	3 months	34.8 $\pm$ 22.5 <sup>b</sup>	44.0 $\pm$ 21.6 <sup>b</sup>	0.08079
Gingival bleeding	Baseline	45.8 $\pm$ 27.3 <sup>a</sup>	42.2 $\pm$ 34.2 <sup>a</sup>	0.65768
	3 months	19.8 $\pm$ 16.9 <sup>b</sup>	22.4 $\pm$ 21.9 <sup>b</sup>	0.80974
Bleeding on probing	Baseline	73.0 $\pm$ 18.8 <sup>a</sup>	78.9 $\pm$ 23.6 <sup>a</sup>	0.05225
	3 months	31.2 $\pm$ 23.7 <sup>b</sup>	55.4 $\pm$ 25.3 <sup>b</sup>	<b>0.00026</b>
Suppuration	Baseline	0.91 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	0.09972
	3 months	0.03 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.03 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.18323

The significance of differences between baseline and 3 months post-therapy was assessed using paired Student's t-Test (different letters indicate significant differences between time points). The significance of differences between groups at each time point was assessed using the Student's t-Test (t-Test) and Chi-square Test (\*).

SRP, scaling and root planing; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin; PD, probing depth; CAL, clinical attachment level; SD, standard deviation.

**Table 2.** Mean PD reduction and CA gain ( $\pm$  SD) between baseline and 3 months post-therapy.

Site category	Variable	Time-point	Groups		t-test (p-value)
			SRP+MTZ+AMX Non-smokers (n=32)	SRP+MTZ+AMX Smokers (n=32)	
Full-mouth	PD (mm)	0-3 months	1.27 $\pm$ 0.49	1.07 $\pm$ 0.39	0.08079
	CAL (mm)	0-3 months	0.80 $\pm$ 0.34	0.79 $\pm$ 0.39	0.86896
bPD 4-6mm	PD (mm)	0-3 months	1.76 $\pm$ 0.45	1.37 $\pm$ 0.32	<b>0.00164</b>
	CAL (mm)	0-3 months	1.12 $\pm$ 0.47	1.04 $\pm$ 0.36	0.31556
bPD $\geq$ 7mm	PD (mm)	0-3 months	3.44 $\pm$ 1.09	2.79 $\pm$ 0.67	<b>0.00053</b>
	CAL (mm)	0-3 months	2.64 $\pm$ 0.85	2.16 $\pm$ 0.76	<b>0.01604</b>

The significance of differences between groups at each time point was assessed using the Student's t-Test (t-Test).

SRP, scaling and root planing; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin; PD, probing depth; bPD, baseline probing depth; CA, clinical attachment; SD, standard deviation

**Table 3.** Mean number  $\pm$  SD (mean percentage  $\pm$  SD) of sites with PD  $\geq$  5mm and PD $\geq$ 6 mm at baseline and 3 months post-therapy.

Variable	Time-point	Groups		t-Test (p-value)
		SRP+MTZ+AMX Non-smokers (n=32)	SRP+MTZ+AMX Smokers (n=32)	
PD $\geq$ 5 mm	Baseline	42.87 $\pm$ 17.35 <sup>a</sup> (32.9 $\pm$ 14.4)	47.03 $\pm$ 20.31 <sup>a</sup> (38.4 $\pm$ 15.3)	0.13481
	3 months	7.78 $\pm$ 7.58 <sup>b</sup> (6.2 $\pm$ 6.1)	11.87 $\pm$ 10.72 <sup>b</sup> (9.7 $\pm$ 7.8)	<b>0.04901</b>
PD $\geq$ 6 mm	Baseline	22.87 $\pm$ 13.18 <sup>a</sup> (19.0 $\pm$ 11.5)	21.78 $\pm$ 16.67 <sup>a</sup> (18.0 $\pm$ 12.4)	0.77194
	3 months	3.06 $\pm$ 3.58 <sup>b</sup> (2.5 $\pm$ 2.9)	4.61 $\pm$ 5.97 <sup>b</sup> (3.7 $\pm$ 4.3)	0.17961

The significance of differences between baseline and the follow-up visits was assessed using paired Student's t-Test (different letters indicate significant differences between time points). The significance of differences between groups at each time point was assessed using the Student's t-Test (t-Test).

SRP, scaling and root planing; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin; PD, probing depth.

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

PD category	Number of residual sites with:	Groups		Chi-square p-value
		SRP+MTZ+AMX Non-smokers (n=32)	SRP+MTZ+AMX Smokers (n=32)	
PD $\geq 5$ mm	$\geq 4$	16 (50.0%)	9 (28.2%)	<b>0.0119</b>
	5-8	7 (21.8%)	5 (15.5%)	
	$\geq 9$	9 (28.2%)	18 (56.3%)	
PD $\geq 6$ mm	0	9 (28.2%)	5 (15.5%)	0.2935
	1-2	9 (28.2%)	7 (21.8%)	
	$\geq 3$	14 (43.6%)	20 (62.7%)	

The significance of differences between groups was assessed using Chi-Square Test.

SRP, scaling and root planing; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin; PD, probing depth

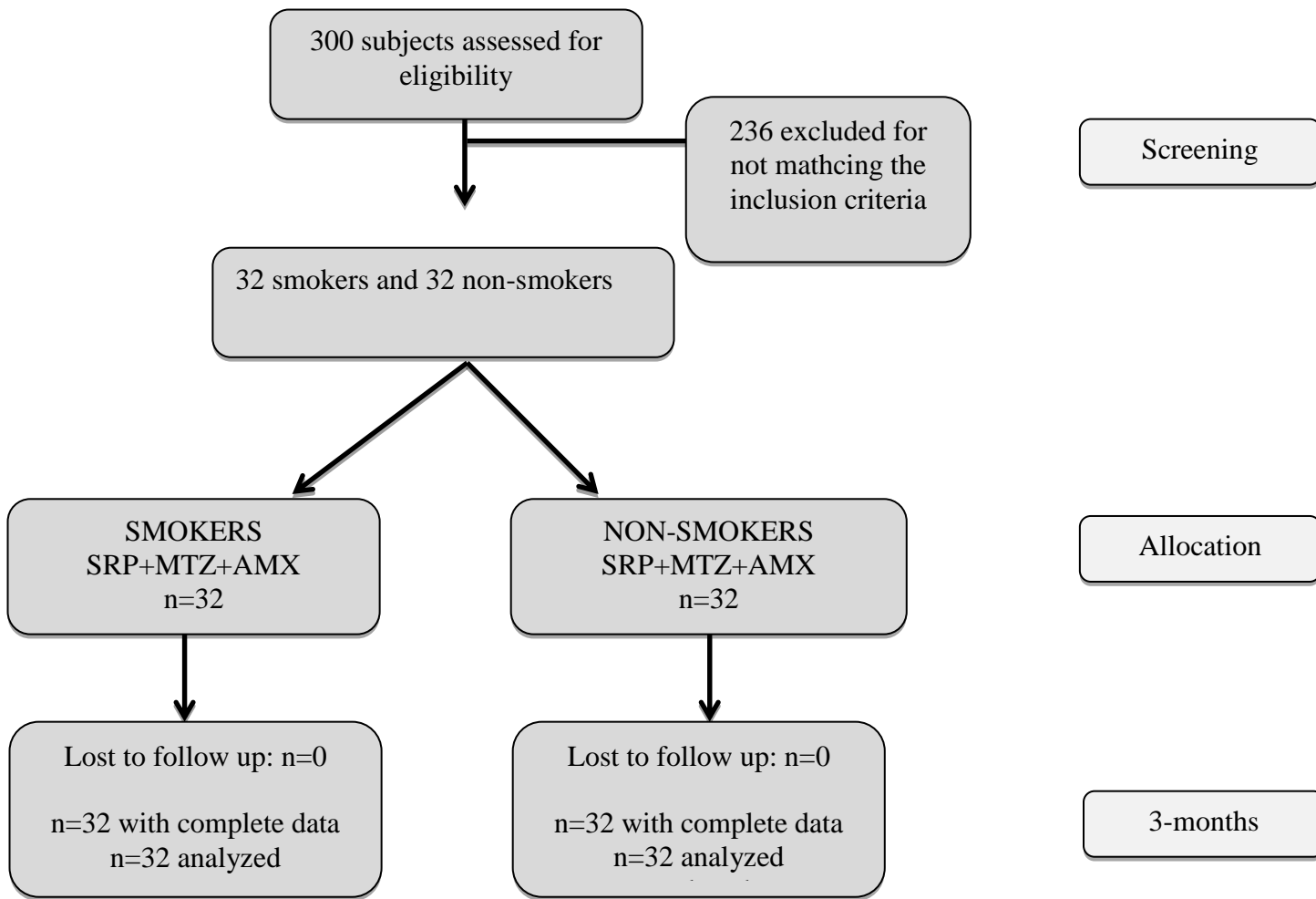


Figure 1.

lost to follow up: n=0  
n=32 with complete data  
n=32 analyzed

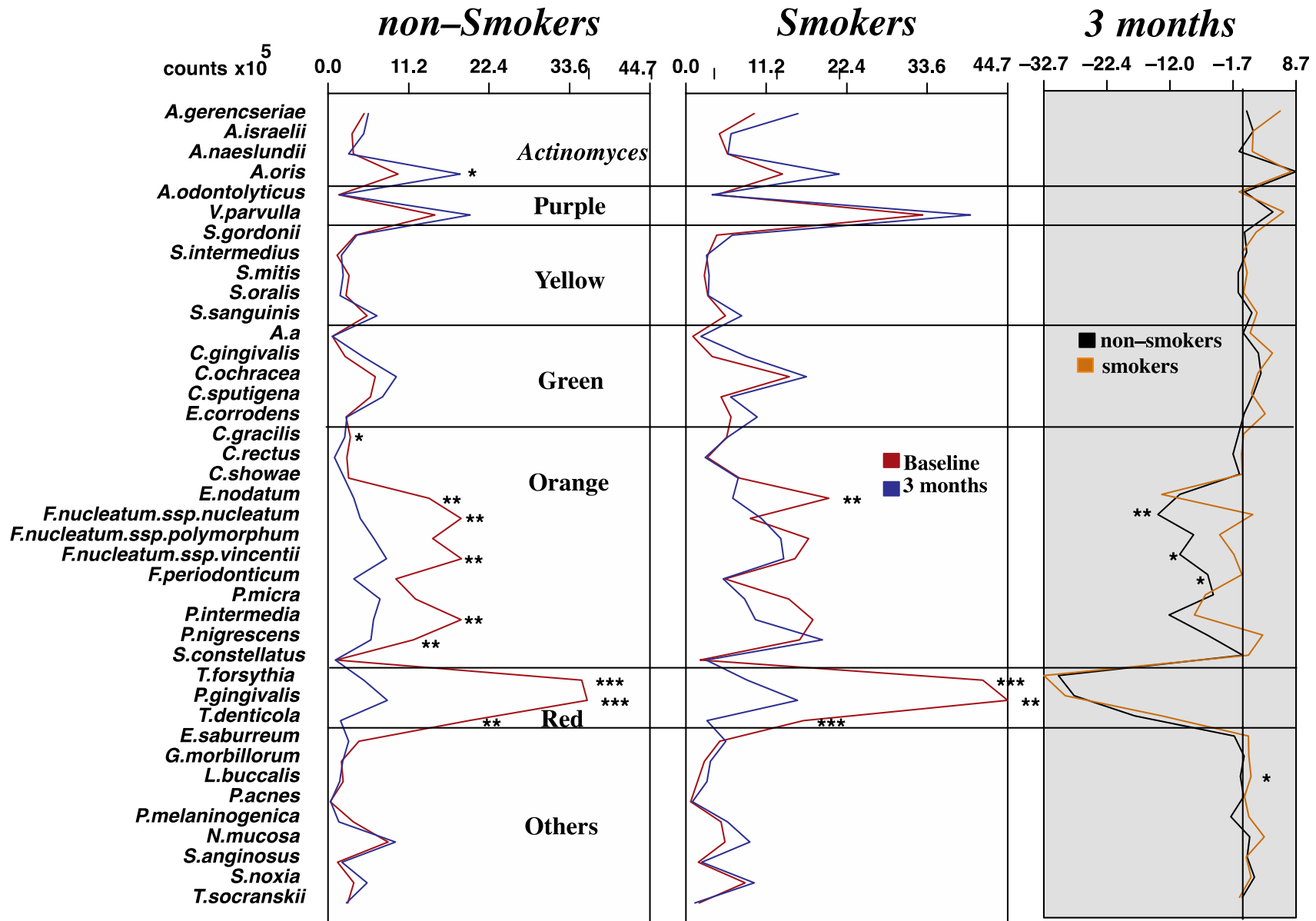


Figure 2.



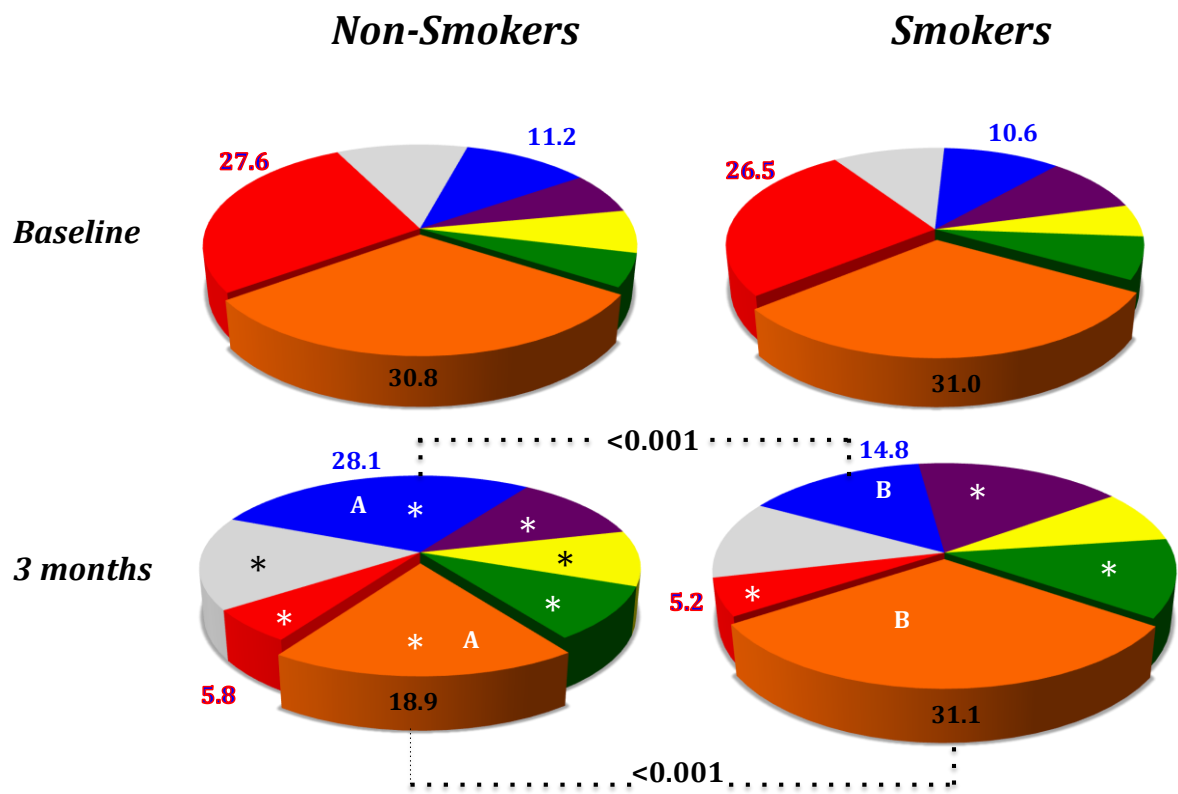


Figure 3.

## Figures legends:

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

**Figure 2.** Mean counts and mean changes in mean levels ( $\times 10^5$ ) of the 40 test species at baseline and 3 months post-SRP in smokers and non-smokers. The species were ordered according to the microbial complexes described by Socransky et al. (1998). Counts of individual species were averaged within a subject and then across subjects in each treatment group at each time point. The significance of differences between baseline and 3 months post-SRP was assessed using the Wilcoxon test (\* $p < 0.05$ ), and adjusted for 40 comparisons (Socransky et al. 1991).

**Figure 3.** Pie charts of the mean proportion of each microbial complex at baseline and 3 months post-SRP in smokers and non-smokers. The colors represent different microbial complexes (Socransky et al. 1998). The significance of differences between baseline and 3 months was assessed using the Wilcoxon test (\*  $p < 0.05$ ). The significance of differences between treatment groups at baseline and 3 months post-therapy was assessed using the Mann-Whitney U-test ( $p < 0.05$ ; different letters indicate statistically significant differences

#### **4. CONCLUSÃO**

Indivíduos tabagistas respondem de forma menos favorável ao tratamento da periodontite crônica por meio do uso sistêmico de AMX+MTZ associado a RAR em comparação a indivíduos não tabagistas.

## 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 Dec;25(4):229-35.

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

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

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

Armitage GC, Dickinson WR, Jenderseck RS, Levine SM, Chambers DW. Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J Periodontol*. 1982 Sep;53(9):550-6.

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

Baljoon M, Natto S, Bergström J. Long-term effect of smoking on vertical periodontal bone loss. *J Clin Periodontol* 2005; 32:789-797.

Bergström J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol*. 1994 May;65(5 Suppl):545-50.

Bergström J, Eliasson S. Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodont Res.* 1987b; 22:513-7.

Bergström J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *J Clin Periodontol.* 2000; 27:61-8.

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.

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

Checchi L, Ciapetti G, Monaco G, Ori G. The effects of nicotine and age on replication and viability of human gingival fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol.* 1999 Oct;26(10):636-42.

Christersson LA, Albin B, Zambon JJ, Wikesjö UM, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol.* 1987 Aug;58(8):529-39.

Cionca N, Giannopoulou C., Ugolotti G, Mombelli A. Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planning of chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009 Mar;80(3):364-71.

Cionca N, Giannopoulou C., Ugolotti G, Mombelli. Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planing with or without amoxicillin/metronidazole in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010 Jan;81(1):15-23. doi: 10.1902/jop.2009.090390.

Cruz, SEB. Avaliação clínica e microbiológica de indivíduos tabagistas e não-tabagistas com periodontite crônica (tese). Guarulhos: Universidade Guarulhos; 2006; 54p.

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.

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.

Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009 Sep;36(9):739-49.

Feres M, Soares GM, Mendes JA, Silva MP, Faveri M, Teles R, Socransky SS, Figueiredo LC. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin. Periodontol.* 2012 Dec;39(12):1149-58. doi:10.11/jcpe.12004. Epub 2012 Sep 27.

Flemmig TF, Milián E, Karch H, Klaiber B. Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol.* 1998 May;25(5):380-7.

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.

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

Grossi SG, Dunford RG, Ho A, Koch G, Machtei EE, Genco RJ. Sources of error for periodontal probing measurements. *J Periodontal Res*. 1996 Jul;31(5):330-6.

Grossi SS, Zambon JJ, Machtei EE, Schinfferle R, Andreana S, Genco RJ et al. Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical therapy. *JADA*. 1997; 128:599-607.

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. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol*. 1997 Oct;24(10):767-76.

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

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

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol*. 2001a; 28:283-95.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2001b; 28:377-88.

Hanioka T, Tanaka M, Ojima M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukuishi S. Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease. 2000 Dec J Periodontol.2000 Dec.;71(12):1846-51.

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. J Clin Periodontol. 2002;29 Suppl 3:136-59; discussion 160-2.

Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. J Periodontol. 1996 Jul;67(7):675-81.

Kazor C, Taylor GW, Loesche WJ. The prevalence of BANA-hydrolyzing periodontopathic bacteria in smokers. J Clin Periodontol. 1999; 26:814-21.

Kim JS, Park JY, Chung WY, Choi MA, Cho KS, Park KK. Polymorphisms in genes coding for enzymes metabolizing smoking-derived substances and the risk of periodontitis. J Clin Periodontol. 2004 Nov;31(11):959-64.

Listgarten MA, Helldén L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans.J Clin Periodontol.1978 May;5(2):115-32.

Listgarten MA, Johnson D, Nowotny A, Tanner AC, Socransky SS. Histopathology of periodontal disease in gnotobiotic rats monoinfected with Eikenella corrodens. J Periodontal Res. 1978 Mar;13(2):134-48.

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

Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. Diabetes Care. 1993;16:329-334.



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

Lovdal A, Arno A, Waerhaug J. Incidence of clinical manifestations of periodontal disease in light of oral hygiene and calculus formation. *J Am Dent Assoc.* 1958 Jan;56(1):21-33.

Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Hill R, Soehren S, Fenno JC, Giannobile WV, Wang HL. Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. *J Periodontol.* 2005 Mar;76(3):426-36.

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.

Mavropoulos A, Aars H, Brodin P. The acute effects of smokeless tobacco (snuff) on gingival blood flow in man. *J Periodontal Res.* 2001 ;36(4):221-6.

Mdala I, Haffajee AD, Socransky SS, de Blasio BF, Thoresen M, 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. doi: 10.3402/jom.v4i0.17535. Epub 2012 Apr 24.

Meisel P, Schwahn C, Gesch D, Bernhardt O, John U, Kocher T. Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *J Periodontol.* 2004 Feb;75(2):236-42.

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010 Apr;37(4):353-65.

Mirbod SM, Ahing SI, Pruthi VK. Immunohistochemical study of vestibular gingival blood vessel density and internal circumference in smokers and non-smokers. *J Periodontol.* 2001 Oct;72(10):1318-23.

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.

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.

Newman HN. The apical border of plaque in chronic inflammatory periodontal disease. *Br Dent J.* 1976 Aug 17;141(4):105-13.

Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontal Res.* 1977 Mar;12(2):120-8.

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.

Palmer RM, Scott DA, Meekin TN, Poston RN, Odell EW, Wilson RF. Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. *J Periodontal Res.* 1999 Oct;34(7):363-9.

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

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

Pavčić MJ, van Winkelhoff AJ, Douqué NH, Steures RW, de 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.

Preber H, Bergström J, Linder L. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. J Clin Periodontol. 1992; 19:667-71.

Rezavandi K, Palmer RM, Odell EW, Scott DA, Wilson RF. Expression of ICAM-1 and E-selectin in gingival tissues of smokers and non-smokers with periodontitis. J Oral Pathol Med. 2002 Jan;31(1):59-64.

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

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

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. J Clin Periodontol. 2008;35,(8 Suppl):3-7.

Serino G, Rosling B, Ramberg P, Hellström MK, Socransky SS, Lindhe J. The effect of systemic antibiotics in the treatment of patients with recurrent periodontitis. J Clin Periodontol. 2001 May ;28(5):411-8.

Silva MP, Feres M, Siroto TA, Soares GM, Mendes JA, Favari M, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2011 Sep;38(9):828-37.

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

Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol.* 1988 Aug;15(7):440-4.

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

Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res.* 1970 Mar-Apr;49(2):203-22.

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.

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 Jul;70(7):761-71.

Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol.* 1998 Mar 15;83(1-2):148-56.

Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aepli DM, Wolff LF et al. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol.* 1993; 64:1225-30.

Typton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 1995 Dec;66(12):1056-64.

Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol.* 1998 Oct;69(10):1111-8.

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

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

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.

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

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

Yek EC, Cintan S, Topcuoglu N, Kulekci G, Issever H & Kantarci A. Efficacy of amoxicilina and metronidazole combination for the management of generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 81,964-974.

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