



DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

IVAN BORGES JÚNIOR

**INFLUÊNCIA CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DA DOSAGEM E DO  
TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS  
ASSOCIADOS À PAR NO TRATAMENTO DE INDIVÍDUOS COM  
PERIODONTITE CRÔNICA**

Guarulhos  
2012

IVAN BORGES JÚNIOR

**INFLUÊNCIA CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DA DOSAGEM E DO  
TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS  
ASSOCIADOS À RAR NO TRATAMENTO DE INDIVÍDUOS COM  
PERIODONTITE CRÔNICA**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magda Feres  
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri

Guarulhos  
2012

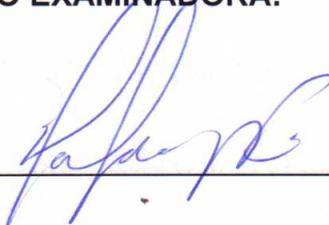
Borges Júnior, Ivan  
B732i      Influência clínica e microbiológica da dosagem e do tempo de administração de antimicrobianos sistêmicos associados à RAR no tratamento de indivíduos com periodontite crônica. / Ivan Borges Júnior. Guarulhos, SP, 2012.  
72 f.; 31 cm  
Dissertação (Doutorado em Odontologia, área de concentração em Periodontia) - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2012.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magda Feres  
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri  
Bibliografia: f. 53-63  
1. Periodontite Crônica. 2 Metronidazol. 3. Amoxicilina. 4. Terapia periodontal. I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 22<sup>st</sup> 617.632

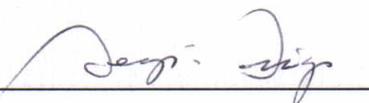
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "INFLUÊNCIA CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DA DOSAGEM E DO TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS ASSOCIADOS À RAR NO TRATAMENTO DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA" em sessão pública realizada em 23 de Novembro de 2012 considerou o candidato Ivan Borges Júnior aprovado.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Profa. Dra. Magda Feres (UnG)



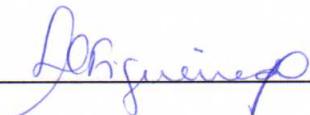
2. Prof. Dr. Sergio Luiz de Souza Salvador (FCFRP - USP)



3. Prof. Dr. Claudio Mendes Pannuti (FOUSP)



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



5. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos (UnG)



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho à minha esposa Josi, que de forma especial e carinhosa deu-me força, coragem, apoiando-me nos momentos de dificuldade. Quero também dedicar aos nossos filhos Joanna, Jéssica e Joaquim, que embora não tivessem conhecimento disto, mas iluminaram de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e por me conceder sabedoria, mansidão e integridade nestes quase cinco anos de estudo.

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

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

Ao meu co-orientador, professor Marcelo de Faveri, pela amizade, por toda ajuda e dedicação.

À professora Luciene Figueiredo, agradeço pela ajuda e amizade, fundamentais em vários momentos.

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

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

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

Aos colegas de turma, Adriana, Daniel, Stella, Fábio, Gláucia, Paulo e Tânia. Fizeram parte desse período de aprendizado e trabalho. Agradeço pela amizade e alegria de estarmos juntos.

À minha aluna e especialista em periodontia Ana Demboski Patrício, pelo seu incansável empenho e dedicação.

À Cristina Pitz, minha secretária, pela colaboração e cuidado na organização da parte clínica.

À *FAPESP*, pelo incentivo científico e financiamento da parte laboratorial. Processo nº 2009/17677-8.

Aos pacientes voluntários, fundamentais para realização desta pesquisa.

*Muito Obrigado a todos!!!!*

*“O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra.”*  
(Aristóteles)

## RESUMO

O objetivo deste estudo clínico duplo-cego, placebo-controlado foi comparar os efeitos clínicos e microbiológicos de diferentes doses de metronidazol (MTZ), bem como da duração da administração sistêmica de MTZ + amoxicilina (AMX) no tratamento da periodontite crônica generalizada (PCG). Cento e dez indivíduos foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos terapêuticos (n=22 por grupo): Controle: raspagem e alisamento radicular (RAR); Teste 1: RAR + AMX 500mg + MTZ 250mg 3x/dia por 7 dias; Teste 2: RAR + AMX 500mg + MTZ 400mg 3x/dia por 7 dias; Teste 3: RAR + AMX 500mg + MTZ 250mg 3x/dia por 14 dias; Teste 4: RAR + AMX 500mg + MTZ 400mg 3x/dia por 14 dias. Os sujeitos receberam monitoramento clínico e microbiológico no início do estudo e três meses pós-terapia. Os parâmetros clínicos avaliados em 6 sítios por dente foram: profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção, placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração. Nove amostras de biofilme subgengival foram coletadas por indivíduo e analisadas para 40 espécies bacterianas pelo teste *checkerboard DNA-DNA hybridization*. Os indivíduos que receberam antibióticos sistêmicos, em qualquer dose ou duração apresentaram melhores resultados clínicos, em comparação com os tratados somente com RAR. No entanto, aos 3 meses pós-terapia, apenas os dois grupos teste que receberam antibióticos sistêmicos durante 14 dias apresentaram uma menor média de sítios residuais com PS  $\geq$  5mm (RAR + AMX 500mg + MTZ 250mg =  $9,2 \pm 8,9$ ; RAR + AMX 500mg + MTZ 400mg =  $7,4 \pm 10,2$ ), em comparação com o grupo controle ( $18,1 \pm 14,1$ ) ( $p < 0,05$  entre cada grupo teste e o grupo controle). As alterações mais marcantes na composição da microbiota subgengival, foram observadas nos dois grupos teste que receberam antibióticos sistêmicos por 14 dias. Indivíduos nestes dois grupos mostraram uma redução estatisticamente significativa nos níveis e proporções dos três patógenos do complexo vermelho, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, bem como em três ou quatro espécies do complexo laranja. Além disso, três meses após a terapia, apenas estes dois grupos teste demonstraram menores proporções médias de complexo vermelho (RAR + AMX 500mg + MTZ 250mg = 6,3%; RAR + AMX 500mg + MTZ 400mg = 6,2%) em comparação com o grupo controle (11,0%) ( $p < 0,05$  entre cada grupo teste e o grupo controle). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos que tomaram 250 ou 400 mg de MTZ por 7 dias, ou entre aqueles que tomaram 250 ou 400 mg de MTZ por 14 dias. O uso adjunto de AMX + MTZ por 14 dias no tratamento da PCG, oferece benefícios clínicos e microbiológicos além dos obtidos com a RAR, independentemente da dosagem de MTZ utilizada (250mg ou 400mg).

**Palavras-chave:** Periodontite crônica. Metronidazol. Amoxicilina. Terapia periodontal.

## ABSTRACT

The aim of this double-blind, placebo-controlled clinical trial was to compare the clinical and microbiological effects of different dosages of metronidazole (MTZ), and duration of systemic administration of MTZ + amoxicillin (AMX) in the treatment of generalized chronic periodontitis (GChP). One hundred and ten individuals were randomly assigned to five treatment groups (n= 22 per group): Control: scaling and root planning (SRP), Test 1: SRP + AMX 500mg + MTZ 250mg 3x/day for 7 days; Test 2: SRP + AMX 500mg + MTZ 400mg 3x/day for 7 days; Test 3: SRP + AMX 500mg + MTZ 250mg 3x/day for 14 days; Test 4: SRP + AMX 500mg + MTZ 400mg 3x/day for 14 days. The subjects received clinically and microbiologically monitoring at baseline and at three months post-therapy. The clinical parameters evaluated at 6 sites per tooth were: probing depth (PD), clinical attachment level, visible plaque, gingival bleeding, bleeding on probing and suppuration. Nine subgingival biofilm samples were collected per subject and analyzed for 40 individual bacterial species by checkerboard DNA-DNA hybridization. Individuals who received systemic antibiotics at any dose or duration showed better clinical results in comparison with those treated with SRP only. However, at 3 months post-therapy, only the two test groups receiving systemic antibiotics for 14 days showed a lower mean number of residual sites with PD  $\geq$  5 mm (SRP + AMX 500mg + MTZ 250mg =  $9.2 \pm 8.9$ , SRP + AMX 500mg + MTZ 400mg =  $7.4 \pm 10.2$ ) compared with the control group ( $18.1 \pm 14.1$ ) ( $p < 0.05$  between each test group and the control group). The most marked changes on the subgingival microbiota were observed in both test groups that received systemic antibiotics for 14 days. Subjects in these two groups showed a statistically significant reduction in the levels and proportions of the three pathogens of the red complex, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*, as well as in three or four species of the orange complex. Moreover, three months after therapy, only these two test groups showed lower mean proportions of red complex (SRP + AMX 500mg + MTZ 250mg = 6.3%; SRP + AMX 500mg + MTZ 400mg = 6.2%) compared with the control group (11.0%) ( $p < 0.05$  between each test group and control group). No statistically significant differences were observed between the groups taking 250 or 400 mg of MTZ for 7 days, or between those who took 250 or 400 mg of MTZ for 14 days. The adjunctive use of MTZ + AMX for 14 days in the treatment of GChP leads to additional microbiological and clinical benefits, beyond those obtained with SRP, regardless the MTZ dose used (250mg or 400mg).

**Keywords:** Chronic periodontitis. Metronidazole. Amoxicillin. Periodontal therapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Delineamento experimental	24
Figura 2	Representação gráfica do <i>Minislot</i> 30 (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de <i>nylon</i> (técnica <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i> )	31
Figura 3	Representação gráfica do <i>Miniblotter</i> 45 (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i> )	32
Figura 4	Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i> )	33
Figura 5	Fluxograma do estudo	39
Figura 6	Níveis (média de contagem $\times 10^5$ ) das 40 espécies bacterianas avaliadas no início do estudo e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos	46
Figura 7	Proporção das 40 espécies bacterianas avaliadas no início do estudo e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos	47
Figura 8	Comparação dos grupos que receberam antibióticos por 7, 14 dias ou controle em relação à contagem e proporção das 40 espécies bacterianas avaliadas 3 meses pós-terapia	48
Figura 9	Média das proporções dos complexos microbianos (SOCRANSKY et al. 1998) nos cinco grupos terapêuticos no início do estudo e em 3 meses pós-terapia	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos	29
Tabela 2	Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgingival	33
Tabela 3	Características demográficas e média ( $\pm$ DP) de boca toda dos parâmetros clínicos no início do estudo e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos	40
Tabela 4	Média ( $\pm$ DP) na redução de PS e ganho de IC entre o início e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos	41
Tabela 5	Média do número ( $\pm$ DP) de sítios com PS $\geq$ 5mm, PS $\geq$ 6mm e PS $\geq$ 7mm e percentual de redução no início e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos	42
Tabela 6	Número e porcentagem de indivíduos que apresentaram baixo ( $\leq$ 4 sítios com PS $\geq$ 5mm), moderado (5-8 sítios com PS $\geq$ 5mm) ou alto risco ( $\geq$ 9 sítios com PS $\geq$ 5mm) para progressão da periodontite de acordo com Lang & Tonetti (2003), assim como os indivíduos apresentando 0, 1-2 ou $\geq$ 3 sítios com PS $\geq$ 6, $\geq$ 7, 3 meses pós-terapia	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>1.1</b>	<b>Etiologia das doenças periodontais</b>	12
<b>1.2</b>	<b>Tratamento periodontal</b>	13
1.2.1	Antibioticoterapia no tratamento periodontal	14
1.2.1.1	Metronidazol e amoxicilina	15
1.2.1.2	Metronidazol associado à amoxicilina	17
1.2.1.3	Dosagem e duração da terapia com metronidazol e amoxicilina	19
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b>	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
<b>3.1</b>	<b>Cálculo da potência</b>	22
<b>3.2</b>	<b>Seleção dos indivíduos</b>	22
<b>3.3</b>	<b>Crerios de inclusão e exclusão</b>	22
<b>3.4</b>	<b>Delineamento experimental</b>	23
<b>3.5</b>	<b>Avaliação clínica</b>	24
3.5.1	Exame clínico periodontal	24
<b>3.6</b>	<b>Procedimentos terapêuticos</b>	25
3.6.1	Terapia periodontal básica	25
3.6.2	Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos e placebos	26
<b>3.7</b>	<b>Avaliação microbiológica</b>	27
3.7.1	Seleção dos sítios-testes	27
3.7.2	Coleta das amostras de biofilme subgengival	27
3.7.3	Cepas bacterianas e condições de crescimento	28
3.7.4	Isolamento do DNA e preparo das sondas	28
3.7.5	<i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	30
3.7.6	Detecção das espécies	30
<b>3.8</b>	<b>Variável primária e variáveis secundárias de avaliação</b>	34
<b>3.9</b>	<b>Análise estatística</b>	34
3.9.1	Monitoramento clínico	34
3.9.2	Monitoramento microbiológico	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	36
<b>4.1</b>	<b>Retenção dos indivíduos ao estudo e efeitos adversos</b>	36
<b>4.2</b>	<b>Resultados clínicos</b>	36
<b>4.3</b>	<b>Resultados microbiológicos</b>	44
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	50
<b>5.1</b>	<b>Dados clínicos</b>	50
<b>5.2</b>	<b>Dados microbiológicos</b>	53
<b>5.3</b>	<b>Comentários finais e aplicabilidade clínica dos resultados obtidos</b>	55
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	57
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	58
	<b>ANEXOS</b>	70

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Etiologia da doenças periodontais

As periodontites são um grupo de infecções que acometem o periodonto de proteção e sustentação dos dentes, causando uma perda progressiva de inserção, de tecido ósseo e, eventualmente, do elemento dentário (ARMITAGE, 1999). Em relação à microbiota associada a essas infecções, já está bem estabelecido na literatura que a gengivite é decorrente do acúmulo indiferenciado de bactérias na margem gengival, enquanto que as doenças periodontais estão associadas ao aumento nos níveis e proporções de espécies patogênicas e à concomitante diminuição de espécies compatíveis com o hospedeiro (TELES et al., 2006).

O caráter infeccioso específico das periodontites foi sugerido nas décadas de 1970 e 1980 (LOESCHE, 1976; LISTGARTEN & HELLDÉN, 1978; LÖE et al., 1978,1986). Porém, dificuldades em se cultivar vários patógenos periodontais, principalmente as espécies anaeróbias estritas, como as espiroquetas, atrasaram sobremaneira os estudos microbiológicos de maior porte em periodontia. A partir do final da década de 1980, o desenvolvimento de técnicas imunológicas e de biologia molecular permitiu a detecção mais precisa das espécies bacterianas que compõem os biofilmes orais e começou-se então a estabelecer a relação dos diferentes perfis microbianos com as diversas formas de periodontite (CHRISTERSSON et al., 1987; SOCRANSKY et al., 1988; WATANABE & FROMMEL, 1993; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994; ÁVILA-CAMPOS et al., 1999; GOMES et al., 2006; FAVERI et al., 2008, 2009). A maior vantagem dessas técnicas é a possibilidade de detecção de espécies difíceis de serem identificadas pelos métodos tradicionais de diagnóstico microbiológico, como a cultura bacteriana. Esse seria o caso de espécies como a *Tannerella forsythia* e as espiroquetas. Socransky et al. (1994) descreveram a técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para diagnóstico microbiológico, que utiliza sondas de ácido desoxirribonucléico (DNA) para identificação bacteriana. Esse mesmo grupo de pesquisadores utilizou essa técnica de diagnóstico para avaliar as associações entre 40 espécies bacterianas presentes em 13.261 amostras de biofilme subgengival de 185 indivíduos (160 com periodontite e 25 saudáveis) (SOCRANSKY et al., 1998). Os autores descreveram cinco complexos bacterianos

principais nas amostras de biofilme subgingival desses indivíduos. Um deles, denominado complexo vermelho, é composto pelas espécies *T. forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, e foi fortemente relacionado com profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem (SS). Outro grupo, denominado complexo laranja, que parece preceder a colonização do complexo vermelho, foi dividido em dois subgrupos: um central, composto por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*; e outro grupo periférico, formado por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracili* e *Streptococcus constellatus*. Os outros três complexos, denominados amarelo, verde e roxo demonstraram grande associação entre si e menor associação com os dois primeiros, e são compostos por diversas espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro. O complexo verde é formado por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a. O complexo amarelo é composto por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*; e o complexo roxo inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As espécies de *Selenomonas noxia* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b não se correlacionaram com outras espécies. Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces oris*) foram agrupadas e consideradas compatíveis com o hospedeiro, relacionadas diretamente com estado de saúde (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

## 1.2 Tratamento periodontal

Já está bem determinado na literatura que os principais objetivos da terapia periodontal são reduzir PS, SS e supuração (SUP), além de promover um ganho no nível clínico de inserção (NCI) e mantê-lo estável no longo prazo. Esses objetivos clínicos são alcançados quando os níveis, proporções e percentual dos sítios colonizados por patógenos periodontais do complexo laranja e, principalmente, do complexo vermelho são efetivamente reduzidos após a terapia, e uma nova

comunidade bacteriana com maiores proporções de bactérias compatíveis com saúde é estabelecida na cavidade oral (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005; TELES et al., 2006).

A raspagem e alisamento radicular (RAR) é a terapia periodontal mais comumente utilizada para o tratamento periodontal. Apesar de levar, na maioria das vezes, a uma melhora nos parâmetros clínicos periodontais, a RAR é muitas vezes insuficiente para modificar profundamente o perfil bacteriano patogênico para um perfil relacionado à saúde periodontal, principalmente em casos de doenças mais avançadas ou associadas a fatores de risco, como o fumo (HAFFAJEE et al., 1997; CUGINI et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; MATARAZZO et al., 2008). Sendo assim, outras terapias coadjuvantes à RAR, como os antibióticos sistêmicos, têm sido propostos com o objetivo de potencializar os efeitos clínicos e microbiológicos desta forma de terapia (HERRERA et al., 2002; HAFFAJEE et al., 2003; HERRERA et al., 2008).

### 1.2.1 Antibioticoterapia no tratamento periodontal

Os estudos clínicos sobre o efeito dos antibióticos nas doenças periodontais iniciaram-se na década de 70, quando Slots et al. (1979) observaram a ação positiva da tetraciclina hidrocloreídica no tratamento da periodontite agressiva localizada em indivíduos jovens. Posteriormente, esses medicamentos começaram também a ser estudados no tratamento de outras formas de periodontite. Os antibióticos mais utilizados como adjuntos à terapia periodontal básica no tratamento da periodontite crônica são a tetraciclina e seus derivados, como a doxiciclina e a minociclina (HELLDEN et al., 1979; SLOTS et al., 1979; SCOPP et al., 1980; CIANCIO et al., 1982; LINDHE et al., 1983b; MÜLLER et al., 1990; FREEMAN et al., 1992; MÜLLER et al., 1993; CROUT et al., 1996; LOESCHE et al., 1996; FERES et al., 1999a, 1999b; GONÇALVES et al., 2004); as penicilinas, principalmente a amoxicilina (AMX) (HELOVUO & PAUNIO, 1989; ABU-FANAS et al., 1991; HELOVUO et al., 1993; FERES et al., 2001); o metronidazol (MTZ) (LINDHE et al., 1983a; LOESCHE et al., 1984, 1987, 1991, 1992, 1996; FERES et al., 2001; CARVALHO et al., 2004; POULET et al., 2005; HAFFAJEE et al., 2007); e mais recentemente a azitromicina (MASCARENHAS et al., 2005; DASTOOR et al., 2007, GOMI et al., 2007a, 2007b;

HAFFAJEE et al., 2007,2008). Outros estudos mostraram excelentes resultados clínicos e microbiológicos utilizando a associação do MTZ e da AMX no tratamento da doença periodontal em indivíduos jovens (MESTNIK et al., 2010,) ou adultos (PAVICIC et al., 1994; LÓPEZ et al., 1998, 2000; WINKEL et al., 2001; LÓPEZ et al., 2006; DANNEWITZ et al., 2007; MOEINTAGHAVI et al., 2007; MATARAZZO et al., 2008). Em geral, os estudos mostram benefícios clínicos e microbiológicos com a utilização desses antibióticos; benefícios esses que variam de acordo com o tipo de droga administrada, com a população estudada e, principalmente, com a adesão dos pacientes ao protocolo terapêutico (GUERRERO et al., 2007).

#### 1.2.1.1 Metronidazol e amoxicilina

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

A vantagem do MTZ no tratamento da periodontite crônica é seu espectro de ação direcionado às espécies bacterianas anaeróbias estritas, como é o caso dos 3 patógenos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*). Uma série de estudos iniciados por Loesche e colaboradores desde o final da década de 1980 sugeriram a redução da necessidade de se realizar procedimento cirúrgico no tratamento periodontal quando indivíduos com periodontite crônica eram tratados com MTZ sistêmico. Os autores observaram que o MTZ, na dosagem de 750mg a 1 g por dia, administrado por 14 dias associado à terapia mecânica, diminuía em até 93% o número de dentes com necessidade de tratamento cirúrgico, e em até 81% o números de dentes com indicação de extração por doença periodontal (LOESCHE et al., 1987, 1991, 1992, 1996, 2002 e 2005). Os efeitos do MTZ nos diversos

parâmetros clínicos periodontais, como redução da PS e ganho de inserção clínica (IC), foram estudados por diferentes grupos de pesquisa. De forma geral, a maioria dos estudos que associaram o MTZ à RAR no tratamento da periodontite crônica mostrou resultados clínicos melhores do que os obtidos somente com a terapia mecânica (JOYSTON-BECHAL et al., 1986; LOESCHE et al., 1992; WINKEL et al., 1997; ELTER et al., 1997; FERES, 1999; HAFFAJEE et al., 2003, 2007; CARVALHO et al., 2004, MATARAZZO et al., 2008).

Além dos aspectos clínicos, alguns estudos também avaliaram as alterações na composição da microbiota subgengival após a utilização do MTZ em indivíduos com periodontite crônica não-fumantes (GOODSON & FERES, 1999; FERES et al., 2001; ROONEY et al., 2002; CARVALHO et al., 2005; EHMKE et al., 2005; TELES et al., 2006; MOENTAGHAVI et al., 2007; HAFFAJEE et al., 2008; ou fumantes (PALMER et al., 1999; SÖDER et al., 1999; WINKEL et al., 2001; PAHKLA et al., 2006 e MATARAZZO et al., 2008). Haffajee et al. (2008) observaram alterações mais positivas no perfil microbiológico subgengival em indivíduos com periodontite crônica que receberam MTZ ou azitromicina sistêmicos, superiores às observadas com RAR somente. Em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa (MATARAZZO et al., 2008) observamos que a combinação de MTZ, AMX e RAR foi mais eficaz em reduzir os níveis de *T. denticola*, *C. rectus*, *E. nodatum* e *P. gingivalis* do que a RAR somente, em indivíduos fumantes com periodontite crônica.

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

Feres et al. (2001) compararam diretamente os efeitos da AMX ou do MTZ na composição da microbiota subgengival de indivíduos com periodontite crônica. Os voluntários receberam RAR associada ao MTZ (250mg 3 x dia) ou à AMX (500mg 3 x dia), ambos por 14 dias. Foi observado que os níveis e as proporções de *T.*

*forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* reduziram drasticamente durante a administração dos antibióticos e se mantiveram mais baixas que no tempo inicial aos 360 dias pós-terapia, principalmente no grupo que recebeu o MTZ. Além disso, o MTZ afetou muito pouco as espécies consideradas benéficas, como *Actinomyces*, *Streptococcus* e *Capnocytophaga*. O grupo que recebeu AMX também apresentou redução dos níveis das 3 espécies do complexo vermelho; no entanto, após 360 dias ocorreu uma maior recolonização de patógenos, principalmente das espécies *T. forsythia* e *T. denticola*.

#### 1.2.1.2 Metronidazol associado à amoxicilina

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

RAR em 24hs. O grupo que recebeu antibioticoterapia mostrou menor frequência de *A. 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, ou ao tratamento cirúrgico (C). A terapia de RAR foi realizada em 14 dias. O MTZ (250mg 3x/dia) e a AMX (500mg 3x/dia) foram administrados por 14 dias, iniciando no primeiro dia da terapia mecânica. A Tetraciclina foi aplicada nos sítios com PS  $\geq$ 5mm, logo após à sessão de RAR e removida após 7 dias. A terapia cirúrgica foi realizada após a reavaliação de 3 meses pós terapia nos sítios que permaneciam com PS  $\geq$ 5mm e SS. Formaram no total 8 grupos (RAR, RAR+C+MTZ+AMX, RAR+C+T, RAR+C, RAR+MTZ+AMX+T, RAR+MTZ+AMX, RAR+T, RAR+C+MTZ+AMX+T). Os autores observaram 2 anos pós-terapia que, quando associada a outras terapias, a RAR levou a melhores resultados clínicos do que quando realizada sozinha. Aparentemente a associação de mais de 2 terapias não levou a benefícios sinérgicos e os melhores benefícios foram observados quando a RAR foi associada à antibióticoterapia sistêmica, associada ou não tetraciclina local ou ao tratamento cirúrgico. Mdala et al. (2012) avaliaram os mesmos grupos experimentais do estudo descrito anteriormente e observaram que a associação de RAR à MTZ+AMX+T+C foi a terapia que conseguiu manter os melhores resultados clínicos após 2 anos de acompanhamento.

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

consideradas patogênicas, como as do complexo vermelho. Além disso, esses indivíduos tiveram os aumentos mais significantes nas espécies compatíveis com saúde, quando comparados com indivíduos que receberam apenas RAR ou RAR associada ao MTZ. Silva et al., (2011) seguindo a mesma metodologia do estudo anterior, observaram em não fumantes melhores resultados nos parâmetros clínicos e microbiológicos para o grupo que associou o MTZ e AMX à RAR, quando comparado com os indivíduos que receberam apenas RAR ou associada apenas ao MTZ, após 3 meses de acompanhamento. Ademais, Feres et al. (2012) avaliaram os efeitos longitudinais de antibióticos sistêmicos associados à RAR para o tratamento da doença periodontal crônica. Os autores concluíram, após 1 ano de avaliação, que o uso combinado de ambos os protocolos antibióticos (MTZ 400mg 3 x dia por 14 dias; MTZ 400mg+AMX 500mg 3 x dia por 14 dias) melhorou significativamente o tratamento da periodontite crônica, quando comparado com o grupo que recebeu somente RAR.

#### 1.2.1.3 Dosagem e duração da terapia com metronidazol e amoxicilina

Apesar da terapia com MTZ e AMX ter se mostrado promissora no tratamento periodontal, a dosagem (principalmente de MTZ) e a duração ideais desses antibióticos ainda não estão determinadas em periodontia. Normalmente são utilizados protocolos empíricos, na maioria das vezes extraídos da literatura médica. Esse é um problema grave, uma vez que o sucesso da terapia antibiótica está diretamente relacionado com a dosagem e duração adequadas das drogas (van WINKELHOFF et al., 1999). Dosagens e tempo de administração mais alta do que os necessários podem levar a efeitos colaterais acentuados, enquanto que subdosagens podem não ser efetivas e ainda gerar resistência bacteriana às drogas utilizadas.

Em relação à AMX, parece haver uma maior padronização de protocolos. A maioria dos estudos que avaliaram os efeitos da AMX no tratamento periodontal (LÓPEZ & GAMONAL, 1998; LÓPEZ et al., 2000, 2006; GUERRERO et al., 2005, XAJIGEORGIU et al., 2006), incluindo três estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (FERES et al., 2001; MATARAZZO et al., 2008; MESTNIK et al., 2010), utilizou 1.500mg/dia desse antibiótico (500mg, 3x/dia). Porém, a dose ideal de MTZ

é mais controversa. Os estudos pioneiros utilizaram 700 a 750mg/dia deste antibiótico para o tratamento periodontal (LINDHE et al., 1983a; LOESCHE et al., 1984, 1987, 1991; PALMER et al., 1998, 1999). Porém, o conhecimento de que dosagens baixas dos antibióticos sistêmicos podem comprometer o resultado clínico e microbiológico desta terapia (van WINKELHOFF et al., 1999) levou a um aumento generalizado na dose do MTZ por nós (CARVALHO et al., 2004, 2005; D'AVILA et al., 2005; MATARAZZO et al., 2008; MESTNIK et al., 2010) e por diferentes grupos de pesquisadores (GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIOU et al., 2006).

Outra questão importante é a duração do tratamento com MTZ em combinação com a AMX, que também não está totalmente definido, e normalmente varia entre 7 (GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIOU et al., 2006; PAHKLA et al., 2006; MOEINTAGHAVI et al., 2007), 10 (KANER et al., 2007) e 14 dias (MATARAZZO et al., 2008, MESTNIK et al., 2010). Quando as dosagens e os tempos de duração das terapias com antibióticos sistêmicos são consideradas em conjunto a variação dos protocolos é ainda muito maior. Sendo assim, até hoje não é possível concluir, por exemplo, se o benefício de uma dose de 250mg de MTZ instituída por 14 dias é semelhante a uma dose maior (ex.: 400mg) instituída por menos tempo. Se fossem constatados efeitos benéficos semelhantes entre esses dois protocolos, além de efeitos colaterais semelhantes (em 250mg ou 400mg da droga), optaríamos pela dose mais alta por menos tempo (7 dias), pois assim poderíamos aumentar a adesão do paciente ao tratamento e minimizar problemas de resistência bacteriana às drogas. Vale destacar que a administração de antibióticos sistêmicos durante longos períodos de tempo é a principal causa da falta de colaboração do paciente (GREENBERG, 1984). Logo, esse conhecimento é de fundamental importância para que a terapia antibiótica leve ao maior benefício para o paciente causando o menor dano possível. Todas essas dúvidas somente serão esclarecidas quando os diferentes protocolos de utilização desta terapia forem comparados diretamente por estudos clínicos aleatorizados, cegos e controlados por placebo.

## **2 PROPOSIÇÃO**

Comparar os efeitos clínicos e microbiológicos de diferentes doses de MTZ (250mg ou 400mg) e a duração da terapia com AMX+MTZ sistêmicos (7 ou 14 dias) no tratamento da periodontite crônica generalizada (PCG).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Cálculo do poder**

O tamanho amostral ideal para garantir um poder adequado a esse estudo clínico controlado foi calculado com base na diferença de pelo menos 1mm no ganho de IC entre os grupos experimentais nos sítios com PS  $\geq$  7mm. O desvio padrão estabelecido para essas alterações foi de 1mm (MATARAZZO et al., 2008; FERES et al., 2009, 2012) e foi utilizado  $\alpha=0,05$ . Foi encontrado um poder superior a 80% para uma amostragem de 17 pacientes. Considerando-se uma taxa de 30% de desistência durante o curso do estudo, optou-se por incluir 22 indivíduos por grupo.

### **3.2 Seleção dos indivíduos**

Cento e dez indivíduos de ambos os sexos que compareceram na clínica odontológica da Universidade Guarulhos buscando tratamento e que preencheram os critérios de inclusão e exclusão foram selecionados. A seleção foi feita por um examinador previamente calibrado (ver item 3.5.1 Exame clínico periodontal). Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas, coletas, terapias e caráter longitudinal do estudo. Os que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) 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 submetido e aprovado (Anexo A) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos.

### **3.3 Critérios de inclusão e exclusão**

#### Critérios de inclusão

Para a inclusão no estudo foram selecionados indivíduos com periodontite crônica generalizada com base em critérios previamente descritos (ARMITAGE et al. 1999, FAVERI et al. 2009): idade igual ou superior a 30 anos; mínimo de 15 dentes,

excluindo-se os terceiros molares e os com indicação de extração; mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal, não contíguo, com PS e NCI  $\geq$  5mm, preferencialmente distribuídos em sextantes distintos.

#### Critérios de exclusão

Indivíduos fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos; gestantes ou lactantes; com histórico de tratamento periodontal prévio nos últimos seis meses; com histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses ou de uso prolongado de medicação antiinflamatória; com histórico de uso de antissépticos orais nos últimos 6 meses; portadores de doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro ou que necessitassem de medicação profilática ao tratamento; alérgicos ao MTZ e/ou à penicilina e portadores de reabilitações protéticas extensas.

### **3.4 Delineamento experimental**

No início deste estudo duplo cego, aleatorizado, placebo controlado, todos os indivíduos (n=110) foram submetidos à anamnese, exame clínico periodontal, instrução de higiene bucal, raspagem supragengival e coleta de amostras de biofilme subgengival dos sítios selecionados (ver 3.7.1 Seleção dos sítios-teste). Em seguida, um pesquisador não envolvido diretamente no estudo realizou a distribuição aleatória dos indivíduos por meio do *software Randomized.com* nos cinco grupos terapêuticos descritos a seguir (n=22 por grupo):

Controle (C): RAR + AMX e MTZ placebos durante 14 dias.

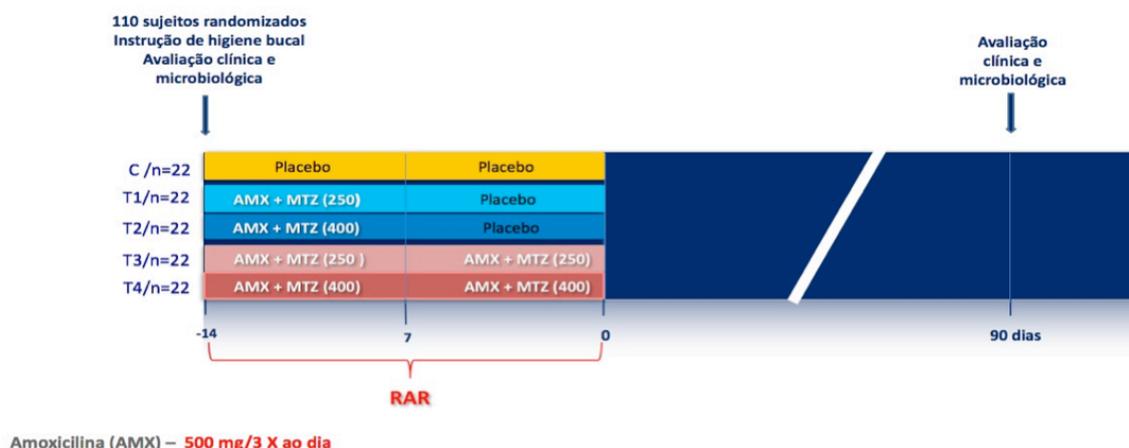
Teste 1 (T1): RAR + AMX (500mg) e MTZ (250mg) 3 vezes/dia durante 7 dias + AMX placebo (500mg) e MTZ placebo (250mg) 3 vezes/dia por mais 7 dias.

Teste 2 (T2): RAR + AMX (500mg) e MTZ (400mg) 3 vezes/dia durante 7 dias + AMX placebo (500mg) e MTZ placebo (400mg) 3 vezes/dia por mais 7 dias.

Teste 3 (T3): RAR + AMX (500mg) e MTZ (250mg) 3 vezes/dia durante 14 dias.

Teste 4 (T4): RAR + AMX (500mg) e MTZ (400mg) 3 vezes/dia durante 14 dias.

A terapia básica de RAR foi realizada entre 4 a 6 sessões e finalizada em 14 dias. Avaliações clínicas e microbiológicas foram repetidas em 90 dias após o término do tratamento. O protocolo experimental está apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Delineamento experimental. RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; C, controle; T, teste.

### 3.5 Avaliação clínica

#### 3.5.1 Exame clínico periodontal

Todos os exames clínico-periodontais foram efetuados no início do estudo e aos 90 dias pós-terapia por um examinador treinado e calibrado (Ivan Borges Júnior), que não teve conhecimento do grupo terapêutico ao qual cada paciente pertencia. 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 - PS e nível clínico de inserção - NCI). O e.p.m e e.m.p intra-examinador demonstrou que o examinador obteve e.p.m. de 0,21mm e 0,26 mm para a PS e NCI, respectivamente. Esses valores de e.p.m. indicam uma reprodutibilidade aceitável para a realização de pesquisa clínica periodontal. Para as variáveis categóricas (índice de placa visível (IPV), índice de sangramento gengival (ISG), sangramento à sondagem (SS) e supuração (SUP), considerando

somente a presença ou a ausência do parâmetro clínico, foi realizada a média do nível de concordância e o examinador apresentou uma concordância intra-examinador igual a 92% (Teste Kappa). As mensurações foram realizadas em 6 sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares) utilizando-se sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15 HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os parâmetros clínicos avaliados foram:

- IPV: presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa supragengival visível;
- ISG: presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento da gengiva marginal, após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival;
- PS: distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;
- NCI: distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;
- SS: presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento, após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada;
- SUP: presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de SUP espontânea ou após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada.

### **3.6 Procedimentos terapêuticos**

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

Após o registro das medidas clínicas e coleta de biofilme subgengival para a análise microbiológica, todos os indivíduos foram submetidos a sessões de adequação do meio bucal que incluem instrução de higiene bucal (IHB), raspagem supragengival de todos os dentes (RSP) com instrumentos manuais, desgaste de restaurações em excesso, selamento provisório das lesões cáries cavitadas, curativos endodônticos e exodontias. Durante as sessões de instrução de higiene bucal, os indivíduos foram orientados a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental Colgate Total® (Anacol Ind. E Com. Ltda - Kolynos do

Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Em seguida, os indivíduos receberam seis sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy) sob anestesia local. Dois periodontistas treinados realizaram a RAR, que foi feita em 4 a 6 sessões de aproximadamente 1h, distribuídas em um período de 14 dias. Os sítios mais comprometidos foram tratados com prioridade. Os dois periodontistas não tiveram conhecimento do grupo terapêutico ao qual cada paciente pertencia.

### 3.6.2 Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos e placebos

Indivíduos do grupo controle receberam RAR e comprimidos placebo (AMX e MTZ) durante 14 dias. Os do grupo teste 1 receberam RAR e 1,5 g/dia de AMX (500mg de 8/8 horas) combinado com 750 mg/dia de MTZ (250mg de 8/8 hs) via oral por 7 dias. Em seguida, receberam comprimidos placebo (AMX e MTZ) pelos próximos 7 dias. Os pacientes do grupo teste 2 receberam RAR e 1,5 g/dia de AMX (500mg de 8/8 horas) combinado com 1,2 g/dia de MTZ (400mg de 8/8 hs) via oral por 7 dias. Em seguida, receberam comprimidos placebo (AMX e MTZ) pelos próximos 7 dias. Indivíduos do grupo teste 3 receberam RAR e 1,5 g/dia de AMX (500mg de 8/8 horas) combinado com 750 mg/dia de MTZ (250mg de 8/8 hs) via oral por 14 dias. Indivíduos do grupo teste 4 receberam RAR e 1,5 g/dia de AMX (500mg de 8/8 horas) combinado com 1,2 g/dia de MTZ (400mg de 8/8 hs) via oral por 14 dias. Todos os medicamentos (antibióticos e placebos) começaram a ser administrados na primeira consulta de RAR.

Os antibióticos e os placebos foram manipulados especialmente para este estudo em uma Farmácia de Manipulação. Todas as cápsulas apresentaram a mesma coloração e tamanho, e foram estocados em frascos plásticos leitosos com 21 unidades, devidamente codificados. Quanto ao controle da ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, os indivíduos foram orientados a retornar na semana seguinte à clínica trazendo o frasco antigo para depois receberem outro frasco contendo a mesma medicação. Assim foi possível realizar a contagem de conferência dos medicamentos ingeridos. Além disso, também foram monitorados de 2 em 2 dias, pessoalmente (enquanto estavam em procedimento de RAR) ou via telefone para acompanhamento da adesão ao protocolo terapêutico. Após o término do

período de administração da droga e/ou placebo, os indivíduos responderam a um questionário sobre possíveis reações adversas da medicação (Anexo B).

### **3.7 Avaliação microbiológica**

#### **3.7.1 Seleção dos sítios-teste**

Foram selecionados nove sítios por indivíduo, distribuídos uniformemente de acordo com a profundidade de sondagem inicial nas seguintes categorias (3 sítios por categoria): rasas (PS  $\leq$  3mm), intermediárias (PS 4-6mm), e profundas (PS  $\geq$  7mm). Caso um dos 3 sítios profundos não tivesse sido encontrado, o mesmo fora substituído por sítio intermediário. Estes sítios deveriam estar localizados em faces dentais interproximais não-contíguas, e preferencialmente distribuídos entre os quatro quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados. Amostras de biofilme foram coletadas no início do estudo e em 90 dias pós-terapia.

#### **3.7.2 Coleta das amostras de biofilme subgingival**

Após a remoção de cálculo e biofilme supragengivais, as amostras de biofilme subgingival foram coletadas com curetas Gracey do tipo *minifive* 11-12 estéreis, posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único golpe de raspagem no sentido ápico-coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150 $\mu$ L de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 mM EDTA (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil), pH 7,6, e a estas foi acrescentado 100 $\mu$ L de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permaneça viável por um longo período de tempo. Esses tubos plásticos foram previamente identificados com o código do indivíduo, data e sítio, e após a coleta foram armazenados sob refrigeração a -20°C até as amostras serem analisadas por meio da técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 cepas bacterianas no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da UnG.

### 3.7.3 Cepas bacterianas e condições de crescimento

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

### 3.7.4 Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrífuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500xg por 10 minutos.

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

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

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection); <sup>b</sup> Forsyth Institute

Em seguida, as 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, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0).

O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies avaliadas foram

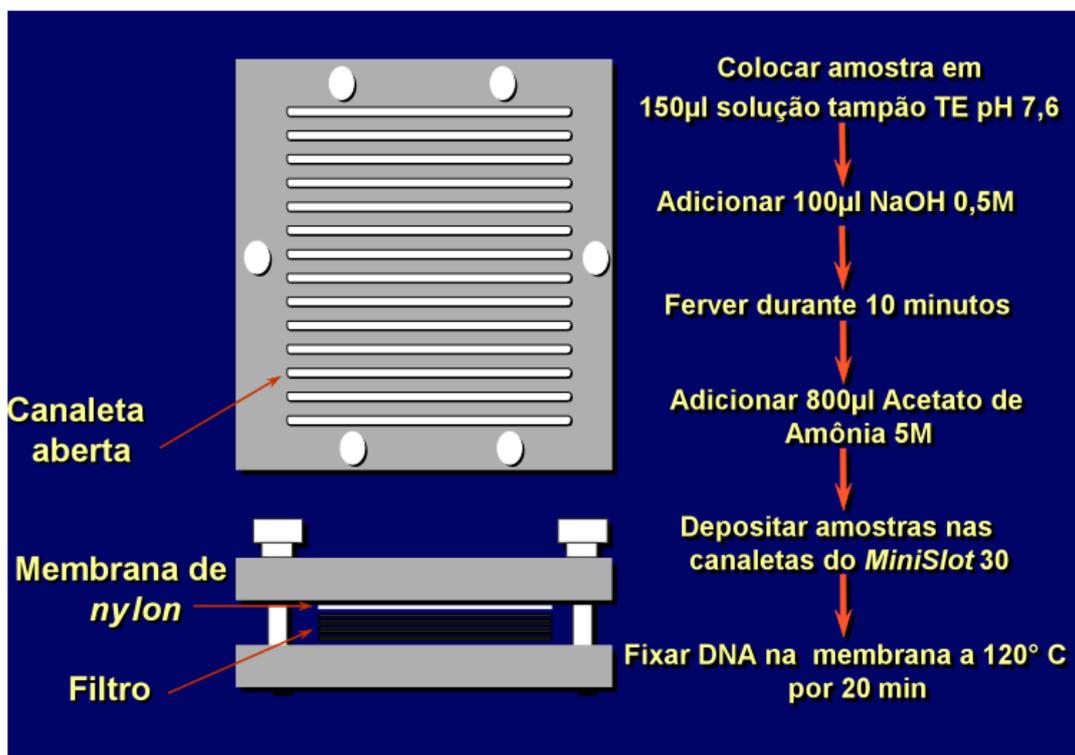
selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

### 3.7.5 Checkerboard DNA-DNA hybridization

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immuntetics, Cambridge, MA, EUA – Figura 2) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a  $10^5$  e  $10^6$  células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente (HAFFAJEE et al, 1997). A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a  $120^{\circ}\text{C}$  por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a  $42^{\circ}\text{C}$ , por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) (1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0, 25mM de fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immuntetics, Cambridge, MA, EUA – Figura 3) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 ng/mL, em 130  $\mu\text{L}$  de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a  $42^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7.6 Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetcs), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

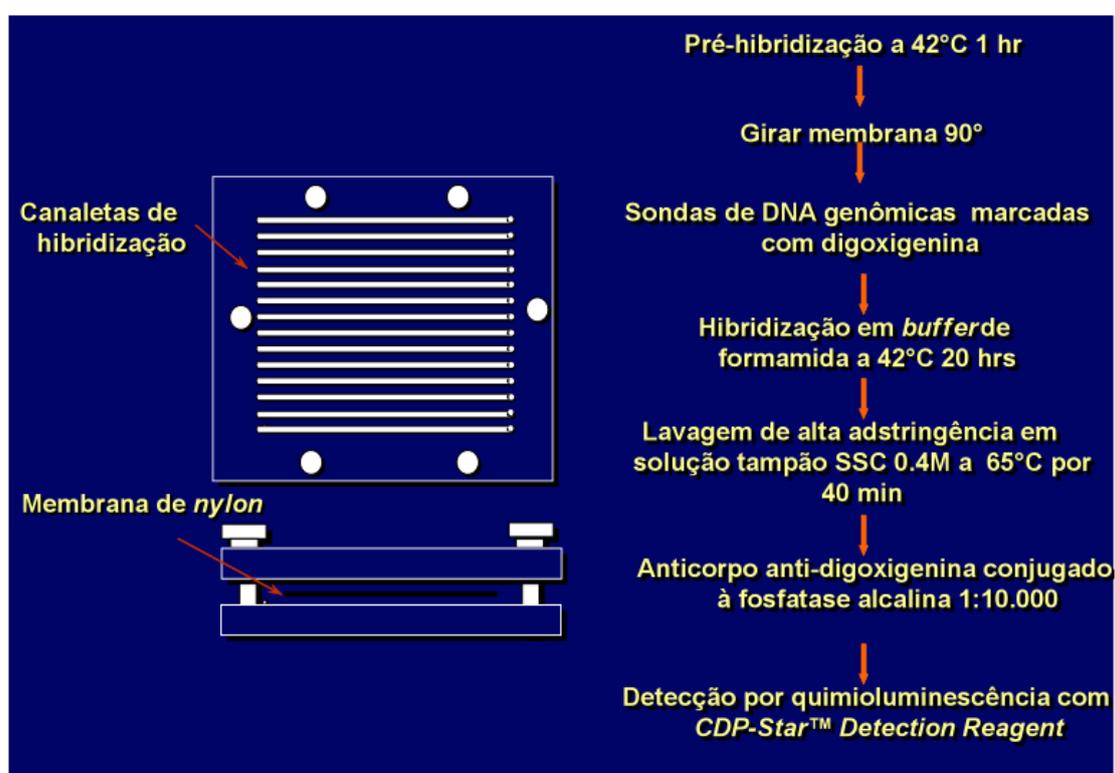


**Figura 2.** Representação gráfica do *Minislot* 30 (Immunetcs, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

Para a detecção dos sinais a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star*<sup>TM</sup> *Detection Reagent* (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um

cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado (Figura 4) manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas a temperatura de 20°C.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2



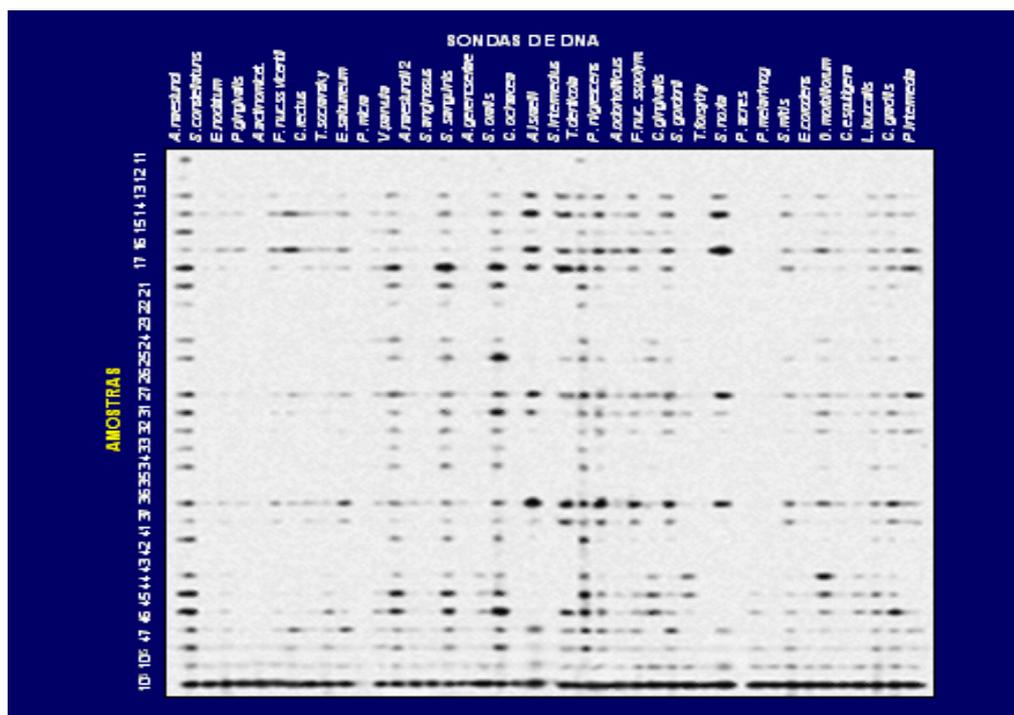
**Figura 3.** Representação gráfica do Miniblotter 45 (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo  $10^5$  e  $10^6$  bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaliu a um sinal menos intenso que o controle de  $10^5$  células; 2 equivaliu a  $10^5$  células; 3 entre  $10^5$  e  $10^6$  células; 4 a aproximadamente  $10^6$  células

e 5 mais de  $10^6$  células (Tabela 2). Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas.

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

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



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

### 3.8 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 clínica (IC) em bolsas inicialmente profundas (PS  $\geq$  7mm), entre o início do estudo e três meses. As variáveis secundárias foram diferenças entre os grupos para os seguintes parâmetros: médias de alterações entre início do estudo e 3 meses no NCI em bolsas inicialmente intermediárias (PS 4-6mm), na PS nas duas categorias de bolsas e NCI e PS na avaliação de boca toda; média do número de sítios com PS  $\geq$  5mm,  $\geq$  6mm e  $\geq$  7mm aos 3 meses pós-terapia; número e percentual de indivíduos apresentando risco baixo, moderado e alto para progressão de doença, e de indivíduos com 0, 1-2 ou  $\geq$  3 sítios com PS  $\geq$  6mm e 7mm, aos 3 meses pós-terapia; média nos níveis e das proporções individuais das 40 espécies avaliadas e dos complexos bacterianos aos 3 meses de avaliação.

### 3.9 Análise estatística

#### 3.9.1 Monitoramento clínico

A média das medidas clínicas de PS e NCI, assim como a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível (PV), sangramento gengival (SG), SS e SUP, PS  $\geq$  5mm e PS  $\geq$  6mm, PS  $\geq$  7mm 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*” pareado. O teste de variância ANOVA de um fator e Teste Tukey de múltiplas comparações foram utilizados para examinar diferenças entre os grupos terapêuticos nos diferentes tempos experimentais. Teste qui-quadrado foi utilizado para comparar as diferenças na frequência de gênero, de indivíduos apresentando diferentes categorias de sítios residuais aos 3 meses de acompanhamento e da auto-percepção de efeitos adversos. A significância estatística foi estabelecida em 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 3.9.2 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 e a prevalência de cada espécie foram computadas para cada sítio, e depois calculadas as médias entre os sítios em cada indivíduo, e então entre os indivíduos de um mesmo grupo terapêutico em cada tempo experimental. Todos os dados iniciais e de 3 meses pós-terapia (níveis e proporções) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste Dunn para detectar possíveis diferenças significantes entre os grupos terapêuticos. Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microorganismos 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%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Retenção dos indivíduos ao estudo e efeitos adversos

A Figura 5 apresenta o fluxograma do estudo. Cento e dez indivíduos foram incluídos nesse estudo; porém, 1 indivíduo (do grupo T3), foi excluído da análise dos resultados por ter comparecido apenas na consulta inicial. Os motivos da desistência desse indivíduo não foram identificados, uma vez que não conseguimos mais contato por telefone ou telegrama. Logo, o total de indivíduos em cada grupo terapêutico foi como a seguir: controle (n=22), T1 (n=22), T2 (n=22), T3 (n=21) e T4 (n=22).

De uma maneira geral, os efeitos adversos foram reportados (Anexo B) por 4 indivíduos do grupo controle, 13 do grupo T1, 11 do grupo T2, 14 do grupo T3 e 17 do grupo T4. Tais efeitos incluíram: diarreia (controle, n=1; T1, n=2; T2, n=1; T3, n=2; T4, n=2); dor de cabeça (controle, n=1; T1, n=5; T2, n=4; T3, n=2; T4, n=6); gosto metálico (controle, n=1; T1, n=3; T2, n=3; T3, n=7; T4, n=6); vômito (controle, n=1; T1, n=2; T2, n=1; T3, n=2; T4, n=3); irritabilidade (controle, n=0; T1, n=1; T2, n=2; T3, n=1; T4, n=0). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que ingeriram antibióticos, em relação ao relatório individual de efeitos adversos ( $p > 0,05$ ). Apenas 3 indivíduos, dos que reportaram algum efeito adverso, relataram que a ingestão dos medicamentos atrapalhou sua rotina diária (T2, n=2; T4, n=1). Somente 2 sujeitos não tomariam novamente os medicamentos, ambos do grupo T4. Dos 109 indivíduos que foram avaliados, apenas 1 (T4) não ingeriu completamente todas as cápsulas, pois após o segundo dia de terapia apresentou hipersensibilidade a um dos componentes das drogas ingeridas.

### 4.2 Resultados clínicos

As características epidemiológicas e as médias dos parâmetros clínicos avaliados no exame inicial e 3 meses pós-terapia, nos cinco grupos terapêuticos, estão apresentadas na Tabela 3. No início do estudo não houve diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos parâmetros avaliados ( $p > 0,05$ )

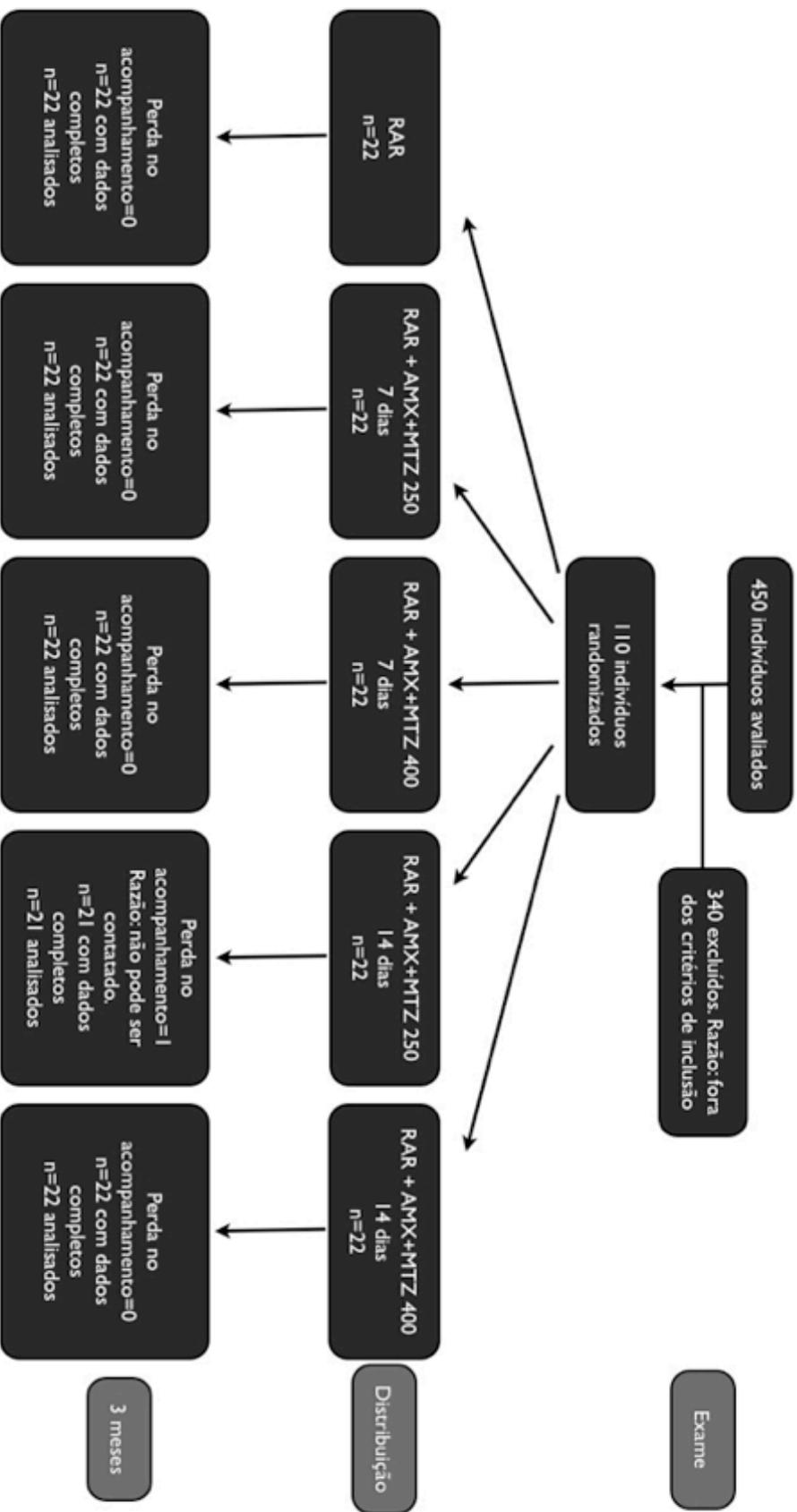
Porém, aos 3 meses após a terapia, os grupos que receberam antibióticos como parte do tratamento periodontal apresentaram menores médias de PS, SS e SUP em comparação ao grupo controle ( $p>0,05$ ). Já os parâmetros IPV, IG e NCI de boca toda não diferiram significativamente entre os grupos terapêuticos em 3 meses ( $p>0,05$ ). Todos os grupos mostraram melhoras estatisticamente significativas em todos os parâmetros avaliados entre o início do estudo e 3 meses após os tratamentos ( $p<0,05$ ).

A Tabela 4 apresenta a média de redução de PS e de ganho de IC entre o início do estudo e após 3 meses, na avaliação de boca toda, em sítios inicialmente intermediários (PS 4-6mm) e profundos (PS  $\geq$  7mm). De forma geral, todos os grupos que receberam antibióticos sistêmicos tiveram maiores reduções na PS do que o grupo controle. Porém, esse benefício não atingiu significância estatística no grupo que recebeu MTZ 250mg por 7 dias (T1), tanto na média de boca toda quanto em sítios inicialmente moderados e na avaliação de boca toda no grupo de MTZ 400 mg por 7 dias (T2). Já em relação ao ganho de IC, apenas os grupos que tomaram antibiótico por 14 dias mostraram ganhos significativamente maiores ( $p<0,05$ ) do que o grupo controle nos sítios inicialmente intermediários e profundos.

A Tabela 5 mostra as médias no número de sítios com PS  $\geq$  5mm,  $\geq$  6mm e  $\geq$  7mm, bem como o percentual de redução, no início e 3 meses pós-terapia. Apesar de que os grupos não diferiram em relação a esses parâmetros no início do estudo, diferenças importantes foram observadas aos 3 meses. Os dois grupos que receberam antibióticos por 14 dias mostraram uma média significativamente menor (MTZ 400mg =  $7,4 \pm 10,2$ , MTZ 250mg =  $9,2 \pm 8,9$ ) de sítios com PS  $\geq$  5mm do que o grupo controle ( $18,0 \pm 14,0$ ) ( $p<0,05$ ). Os grupos que receberam MTZ por 7 dias também apresentaram menos desses sítios residuais (MTZ 400mg =  $12,3 \pm 9,2$ , MTZ 250mg =  $11,0 \pm 11,4$ ) em relação ao grupo controle; porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ). O número médio de sítios nas outras duas categorias de sítios residuais ( $\geq$  6mm e  $\geq$  7mm) estava menor em todos os grupos que receberam antibióticos, em relação ao grupo controle ( $p<0,05$ ).

Os resultados individuais para sítios residuais estão representados na Tabela 6. O painel superior apresenta o número e percentual de indivíduos exibindo diferentes limiares de sítios residuais com PS  $\geq$  5mm, de acordo com o perfil de risco individual para a progressão da doença periodontal proposto por Lang & Tonetti

(2003). Menos indivíduos nos grupos de AMX+MTZ/14 dias (grupos T3 e T4) ainda apresentavam perfil de "alto risco" para a progressão da doença (isto é,  $\geq 9$  sítios com PS  $\geq 5$ mm) em 3 meses ( $n = 6$ ) em comparação com os grupos AMX+MTZ/7 dias (MTZ 400 mg = 13; MTZ 250 mg = 11) (grupos T2 e T1) e com o grupo controle ( $n = 15$ ). Por outro lado, 9 indivíduos nos grupos AMX+MTZ/14 dias e apenas 4 no grupo controle apresentavam "baixo risco" para a progressão da doença (isto é,  $\leq 4$  sítios com PS  $\geq 5$  mm) no final do período do estudo. Essa mesma tendência foi observada em indivíduos que apresentam diferentes limiares de sítios residuais com PS  $\geq 6$ mm e  $\geq 7$ mm.



**Figura 5.** Fluxograma do estudo. RAR, raspagem e alisamento radicular; AMX, amoxicilina; MTZ, metronidazol.

**Tabela 3.** Características demográficas e média ( $\pm$  DP) de boca toda dos parâmetros clínicos no início do estudo e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos.

Variáveis	Tempo	Tratamento				ANOVA p-valor	
		7 dias (AMX +)		14 dias (AMX +)			
		RAR n=22	MTZ 250mg n=22	MTZ 400mg n=22	MTZ 250mg n=21	MTZ 400mg n=22	
<u>Gênero (F/M)*</u>	Início	12/9	13/8	12/10	11/10	12/10	0,5678
<u>Idade (anos)</u>	Início	45,6 $\pm$ 8,0	46,6 $\pm$ 8,9	45,9 $\pm$ 7,8	47,0 $\pm$ 8,6	48,5 $\pm$ 7,4	0,77861
PS (mm)	Início	3,7 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	3,8 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	3,9 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	3,7 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	3,9 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	0,68417
	3 meses	3,0 $\pm$ 0,6 <sup>bA</sup>	2,6 $\pm$ 0,4 <sup>bB</sup>	2,7 $\pm$ 0,5 <sup>bB</sup>	2,5 $\pm$ 0,3 <sup>bB</sup>	2,7 $\pm$ 0,4 <sup>bB</sup>	<b>0,00837</b>
NCI (mm)	Início	4,4 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	4,5 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	4,7 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	4,1 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	4,8 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	0,23595
	3 meses	4,1 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	3,9 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	4,1 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	3,5 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	4,1 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	0,30501
% sites com:							
Placa	Início	61,0 $\pm$ 16,3 <sup>a</sup>	55,4 $\pm$ 17,2 <sup>a</sup>	58,2 $\pm$ 21,3 <sup>a</sup>	55,3 $\pm$ 18,8 <sup>a</sup>	63,1 $\pm$ 19,1 <sup>a</sup>	0,56003
	3 meses	30,2 $\pm$ 18,6 <sup>b</sup>	29,4 $\pm$ 13,8 <sup>b</sup>	24,6 $\pm$ 16,1 <sup>b</sup>	22,1 $\pm$ 12,6 <sup>b</sup>	24,0 $\pm$ 13,1 <sup>b</sup>	0,31136
Sangramento gengival	Início	45,7 $\pm$ 20,2 <sup>a</sup>	48,2 $\pm$ 19,5 <sup>a</sup>	47,1 $\pm$ 20,8 <sup>a</sup>	38,3 $\pm$ 16,8 <sup>a</sup>	50,0 $\pm$ 23,1 <sup>a</sup>	0,38290
	3 meses	28,6 $\pm$ 16,6 <sup>b</sup>	26,7 $\pm$ 12,0 <sup>b</sup>	26,9 $\pm$ 12,4 <sup>b</sup>	22,1 $\pm$ 13,9 <sup>b</sup>	23,6 $\pm$ 11,1 <sup>b</sup>	0,49926
Sangramento a sondagem	Início	67,9 $\pm$ 14,6 <sup>a</sup>	64,9 $\pm$ 18,5 <sup>a</sup>	68,0 $\pm$ 21,2 <sup>a</sup>	62,8 $\pm$ 18,9 <sup>a</sup>	69,1 $\pm$ 20,5 <sup>a</sup>	0,80606
	3 meses	42,9 $\pm$ 17,3 <sup>bA</sup>	32,5 $\pm$ 12,9 <sup>bB</sup>	31,9 $\pm$ 15,1 <sup>bB</sup>	24,3 $\pm$ 14,4 <sup>bB</sup>	28,7 $\pm$ 13,1 <sup>bB</sup>	<b>0,00134</b>
Supuração	Início	9,4 $\pm$ 9,2 <sup>a</sup>	13,3 $\pm$ 12,9 <sup>a</sup>	13,8 $\pm$ 10,1 <sup>a</sup>	11,6 $\pm$ 8,4 <sup>a</sup>	16,3 $\pm$ 12,4 <sup>a</sup>	0,29742
	3 meses	1,9 $\pm$ 2,5 <sup>bA</sup>	0,7 $\pm$ 1,1 <sup>bB</sup>	0,3 $\pm$ 0,6 <sup>bB</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>bB</sup>	0,8 $\pm$ 1,2 <sup>bB</sup>	<b>0,00035</b>

As diferenças significantes entre o início do estudo e 3 meses pós-terapia foram avaliadas usando o teste T de "Student" pareado (letras minúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre os tempos). As diferenças significantes entre os grupos, a cada tempo, foram analisadas usando teste de variância ANOVA de um fator e teste Tukey de múltiplas comparações (letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre o grupos), RAR, raspagem e alissamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; DP, desvio padrão; PS, profundidade de sondagem; NCI, nível clínico de inserção.

**Tabela 4. Média ( $\pm$ DP) na redução de PS e ganho de IC entre o início e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos.**

Variáveis	Tempo	Tratamentos				ANOVA p-valor	
		7 dias (AMX +)					
		RAR	MTZ 250mg	MTZ 400mg	MTZ 250mg		MTZ 400mg
Boca-Toda	redução PS	0,73 $\pm$ 0,44 <sup>A</sup>	1,13 $\pm$ 0,65	1,20 $\pm$ 0,52	1,16 $\pm$ 0,46 <sup>B</sup>	1,29 $\pm$ 0,62 <sup>B</sup>	<b>0,01115</b>
	ganho IC	0,25 $\pm$ 0,29 <sup>A</sup>	0,50 $\pm$ 0,49	0,50 $\pm$ 0,45 <sup>B</sup>	0,59 $\pm$ 0,29 <sup>B</sup>	0,68 $\pm$ 0,29 <sup>B</sup>	<b>0,00511</b>
PS - inicial	redução PS	1,15 $\pm$ 0,49 <sup>A</sup>	1,59 $\pm$ 0,49	1,66 $\pm$ 0,34 <sup>B</sup>	1,74 $\pm$ 0,34 <sup>B</sup>	1,71 $\pm$ 0,51 <sup>B</sup>	<b>0,00013</b>
4-6mm	ganho IC	0,57 $\pm$ 0,51 <sup>A</sup>	0,85 $\pm$ 0,63	0,90 $\pm$ 0,63	1,05 $\pm$ 0,39 <sup>B</sup>	0,97 $\pm$ 0,49 <sup>B</sup>	<b>0,04857</b>
PS - inicial	redução PS	2,10 $\pm$ 1,11 <sup>A</sup>	3,28 $\pm$ 1,19 <sup>B</sup>	3,23 $\pm$ 0,75 <sup>B</sup>	3,66 $\pm$ 0,94 <sup>B</sup>	3,47 $\pm$ 1,04 <sup>B</sup>	<b>0,00005</b>
$\geq$ 7mm	ganho IC	1,27 $\pm$ 1,02 <sup>A</sup>	1,95 $\pm$ 1,29	1,82 $\pm$ 0,84	2,47 $\pm$ 1,23 <sup>B</sup>	2,64 $\pm$ 0,88 <sup>B</sup>	<b>0,00038</b>

As diferenças significantes entre os grupos foram avaliadas utilizando teste de variância ANOVA de um fator e teste Tukey de múltiplas comparações (letras diferentes indicam diferenças significantes entre os grupos), RAR, raspagem e alisamento radicular; PS, profundidade de sondagem; IC, inserção clínica; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; DP, desvio padrão.

**Tabela 5.** Média do número ( $\pm$  DP) de sítios com PS  $\geq 5$ mm, PS  $\geq 6$ mm e PS  $\geq 7$ mm e percentual de redução no início e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos.

Variáveis	Tempo	Tratamento				ANOVA p-valor	
		RAR	7 dias (AMX +)		14 dias (AMX +)		
			MTZ 250mg	MTZ 400mg	MTZ 250mg	MTZ 400mg	
PS $\geq 5$ mm	Início	35,6 $\pm$ 20,7 <sup>a</sup>	36,0 $\pm$ 23,8 <sup>a</sup>	37,7 $\pm$ 21,1 <sup>a</sup>	33,6 $\pm$ 25,1 <sup>a</sup>	33,3 $\pm$ 19,6 <sup>a</sup>	0,97733
	3 meses	18,1 $\pm$ 14,1 <sup>b,A</sup>	11,0 $\pm$ 11,4 <sup>b</sup>	12,3 $\pm$ 9,2 <sup>b</sup>	9,2 $\pm$ 8,9 <sup>b,B</sup>	7,4 $\pm$ 10,2 <sup>b,B</sup>	<b>0,03580</b>
	% redução	49,1	69,4	70,5	75,1	77,9	
PS $\geq 6$ mm	Início	22,50 $\pm$ 15,2 <sup>a</sup>	25,1 $\pm$ 20,5 <sup>a</sup>	24,6 $\pm$ 16,3 <sup>a</sup>	22,8 $\pm$ 20,9 <sup>a</sup>	20,5 $\pm$ 15,9 <sup>a</sup>	0,93302
	3 meses	10,2 $\pm$ 10,8 <sup>b,A</sup>	5,1 $\pm$ 7,0 <sup>b,B</sup>	5,1 $\pm$ 4,4 <sup>b,B</sup>	4,7 $\pm$ 3,9 <sup>b,B</sup>	2,2 $\pm$ 4,8 <sup>b,B</sup>	<b>0,00650</b>
	% redução	54,5	79,6	79,5	79,2	89,1	
PS $\geq 7$ mm	Início	11,7 $\pm$ 9,3 <sup>a</sup>	16,0 $\pm$ 15,7 <sup>a</sup>	13,9 $\pm$ 11,4 <sup>a</sup>	10,0 $\pm$ 14,2 <sup>a</sup>	11,4 $\pm$ 9,4 <sup>a</sup>	0,35091
	3 meses	4,9 $\pm$ 6,2 <sup>b,A</sup>	2,5 $\pm$ 3,7 <sup>b,B</sup>	2,4 $\pm$ 2,2 <sup>b,B</sup>	1,9 $\pm$ 1,8 <sup>b,B</sup>	0,9 $\pm$ 3,1 <sup>b,B</sup>	<b>0,01917</b>
	% redução	58,3	84	83,1	81	92,1	

As diferenças significantes entre o início do estudo e 3 meses pós-terapia foram avaliadas usando o test T de "Student" pareado (letras minúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre os tempos). As diferenças significantes entre os grupos, a cada tempo, foram analisadas usando teste de variância ANOVA de um fator e teste Tukey de múltiplas comparações (letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre o grupos), RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; DP, desvio padrão; PS, profundidade de sondagem.

**Tabela 6.** Número e porcentagem de indivíduos que apresentaram baixo ( $\leq 4$  sítios com PS  $\geq 5$ mm), moderado (5-8 sítios com PS  $\geq 5$ mm) ou alto risco ( $\geq 9$  sítios com PS  $\geq 5$ mm) para progressão da periodontite de acordo com Lang & Tonetti (2003), assim como os indivíduos apresentando 0, 1-2 ou  $\geq 3$  sítios com PS  $\geq 6$  e  $\geq 7$ , 3 meses pós-terapia.

Variáveis	Número de sítios	Tratamentos				Qui- quadrado p-valor	
		RAR	7 dias (AMX +)		14 dias (AMX +)		
			MTZ 250mg	MTZ 400mg	MTZ 250mg	MTZ 400mg	
Risco para progressão de doença	Baixo risco ( $\leq 4$ sítios, PS $\geq 5$ mm)	4 (18%)	7 (32%)	8 (36%)	9 (43%)	9 (40%)	
	Moderado risco (5-8 sítios, PS $\geq 5$ mm)	3 (14%)	4 (18%)	1 (5%)	6 (29%)	7 (32%)	<b>0,0001</b>
	Alto risco ( $\geq 9$ sítios, PS $\geq 5$ mm)	15 (68%)	11 (50%)	13 (60%)	6 (29%)	6 (27%)	
PS $\geq 6$ mm	0	1 (4%)	6 (27%)	5 (23%)	6 (28%)	6 (27%)	
	1-2	2 (10%)	6 (27%)	4 (19%)	5 (24%)	5 (23%)	<b>0,0005</b>
	$\geq 3$	19 (86%)	10 (45%)	12 (58%)	10 (48%)	11 (50%)	
PS $\geq 7$ mm	0	3 (14%)	12 (54%)	10 (45%)	12 (57%)	10 (45%)	
	1-2	10 (45%)	3 (14%)	5 (23%)	7 (32%)	9 (41%)	<b>0,0090</b>
	$\geq 3$	9 (41%)	7 (32%)	7 (32%)	2 (10%)	3 (14%)	

As diferenças significantes entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste Qui-quadrado. RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; PS, profundidade de sondagem.

### 4.3 Resultados microbiológicos

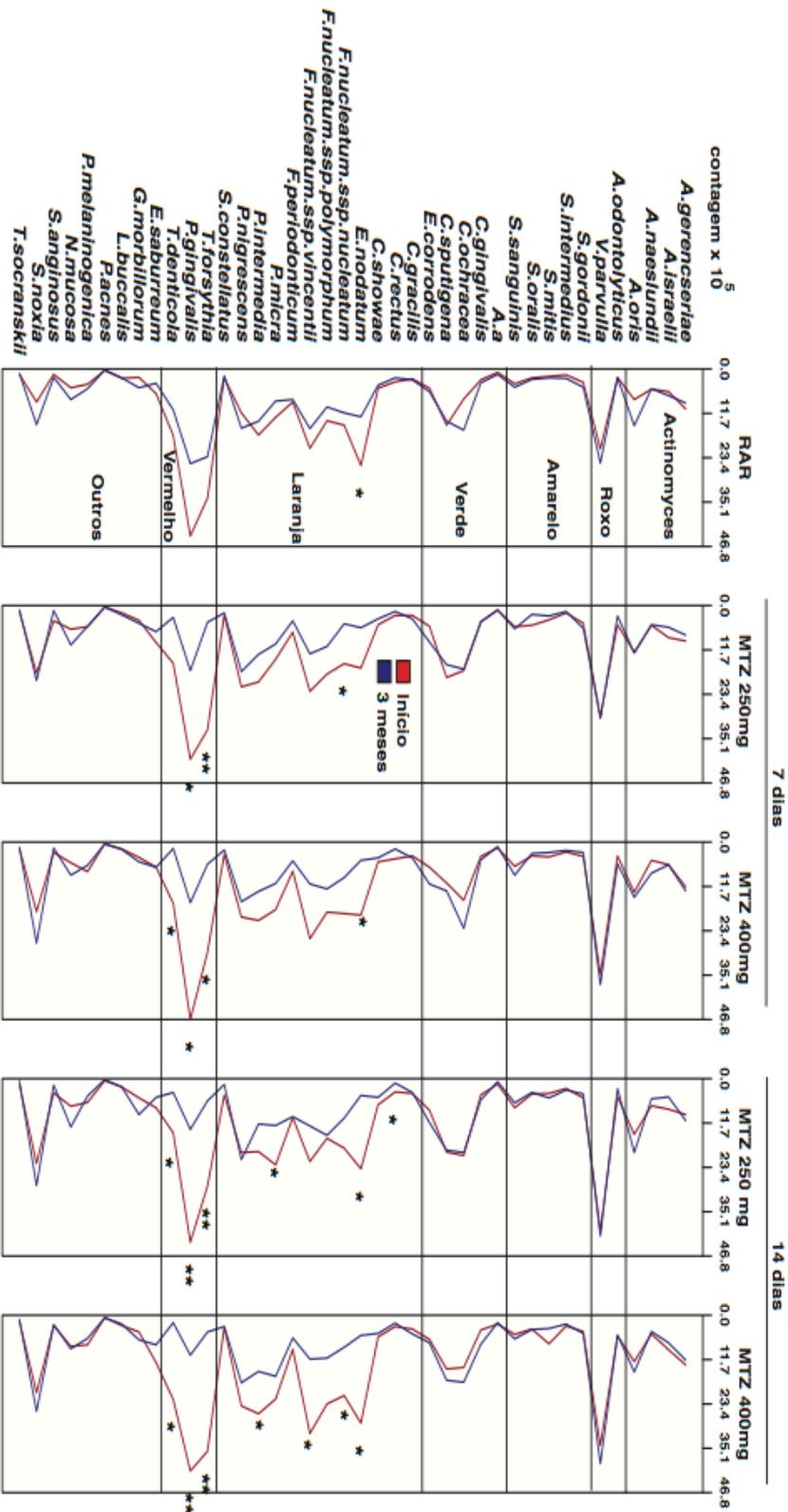
Os resultados obtidos nas avaliações microbiológicas estão representados nas Figuras 6 a 9. Os níveis (média de contagem  $\times 10^5$ ) das 40 espécies bacterianas avaliadas no início do estudo e aos 3 meses pós-terapia estão apresentados na Figura 6. No início do estudo o perfil microbiano observado apresentava altos níveis das espécies dos complexos vermelho e laranja e baixos níveis das espécies compatíveis com saúde, como os *Actinomyces* e espécies dos complexos roxo, amarelo e verde. De forma geral, a média de contagem da maioria das espécies compatíveis com o hospedeiro se manteve estável após as terapias, enquanto que os níveis das espécies do complexo vermelho e da maioria das espécies do complexo laranja reduziram em todos os grupos. Porém, diferenças importantes foram observadas na alteração do perfil microbiológico em cada grupo terapêutico. As reduções observadas nas três espécies do complexo vermelho não foram estatisticamente significativas no grupo controle, duas espécies foram significativamente reduzidas no grupo MTZ/250mg/7 dias (T1) e os três patógenos sofreram reduções estatisticamente significativas no grupo MTZ/400mg/7 dias (T2) e nos dois grupos de antibiótico/14 dias (T3 e T4). Além disso, esses dois grupos obtiveram uma redução significativa em 3 ou 4 espécies do complexo laranja (*C. rectus*, *E. nodatum*, *Fusobacterium nucleatum* ssp *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* ssp *vincentii*, *P. micra*, *P. intermedia*), contra apenas uma espécie reduzida nos demais 3 grupos.

A Figura 7 mostra os mesmos tipos de dados da Figura 6 mas para as proporções individuais das espécies avaliadas em cada grupo, antes e depois da terapia. Os resultados foram bem semelhantes aos observados nos níveis médios bacterianos. As duas terapias que associaram antibióticos por 14 dias (T3 e T4) e a que associou MTZ/400mg/7 dias (T2) reduziram significativamente as proporções dos três patógenos do complexo vermelho, contra dois patógenos no grupo MTZ/250mg/7 dias (T1) e apenas uma espécie desse complexo reduzida no grupo controle. O grupo que recebeu dose e duração máxima de MTZ mostrou também redução estatisticamente significativa de quatro espécies do complexo laranja, enquanto que um número menor de espécies foram afetadas nos demais grupos,

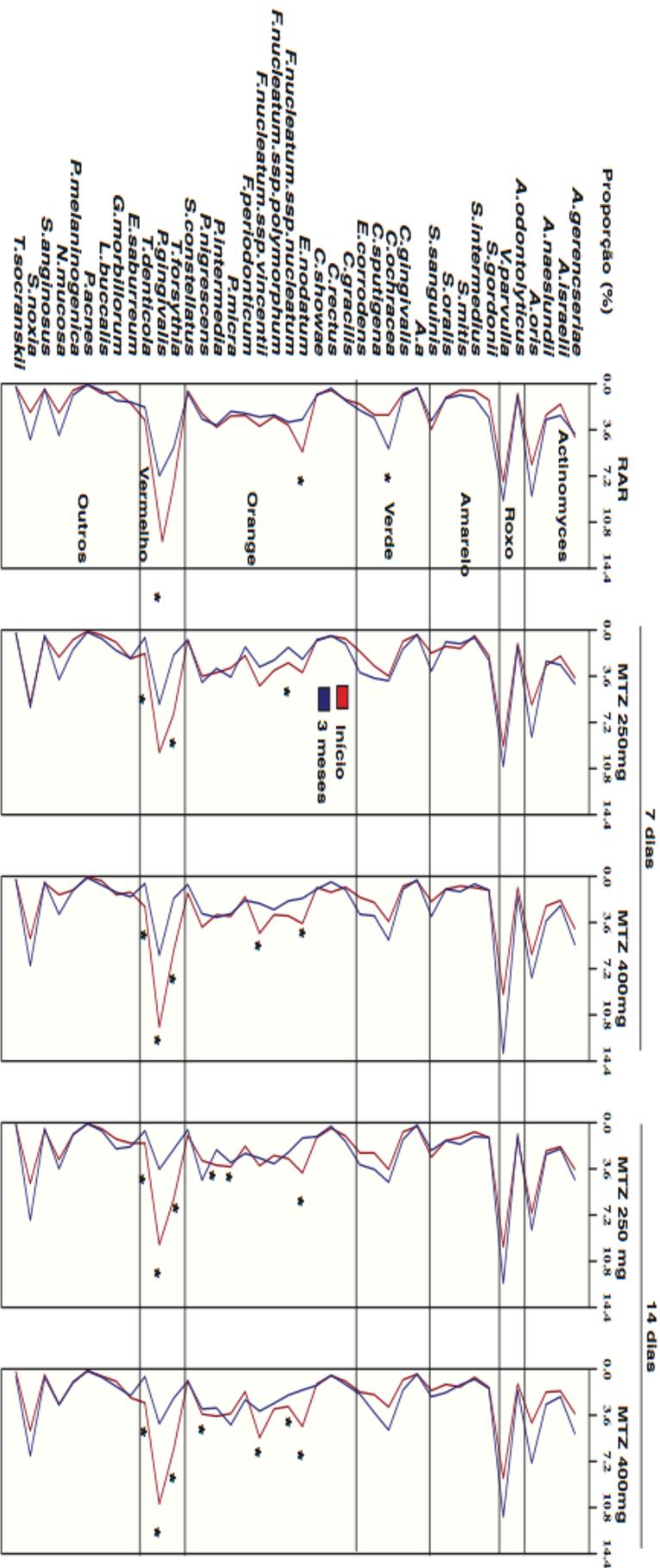
como descrito a seguir: *E. nodatum*, *P. micra* e *P. intermedia* (T3); *E. nodatum* e *F. nucleatum vincentii* (T2), *F. nucleatum nucleatum* (T1) e *E. nodatum* (controle).

Uma vez que as análises anteriores mostraram uma tendência a melhores resultados nos grupos que receberam antibióticos por mais tempo, 14 dias, em comparação com os que receberam por 7 dias, a Figura 8 apresenta uma comparação desses dois grupos (independentemente da dose de antibiótico ingerida) e do grupo controle. São apresentadas as médias e proporções individuais das 40 bactérias avaliadas após três meses das terapias. De maneira geral, o grupo controle apresentou níveis e proporções mais elevados de espécies do complexo vermelho e mais baixos de *Actinomyces* do que os dois grupos de antibiótico (por 7 ou 14 dias) em três meses. Essas diferenças foram estatisticamente significativa entre o grupo controle e os dois grupos teste para níveis de *T. forsythia* e *T. denticola*. Observa-se também que o grupo de antibiótico por 14 dias teve uma tendência a apresentar níveis e proporções mais baixos de *P. gingivalis* e níveis mais altos de *V. parvula* do que o grupo de antibiótico por 7 dias.

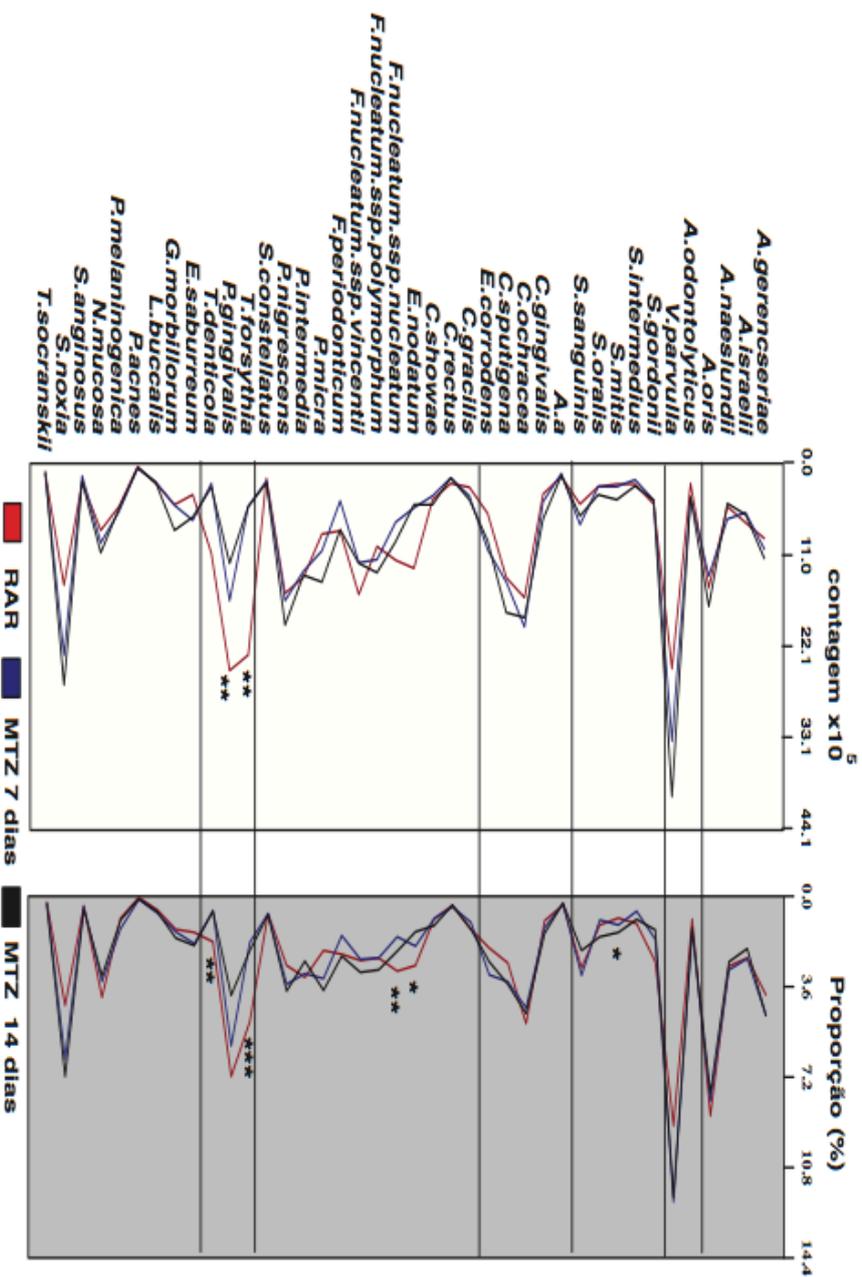
A figura 9 apresenta a média das proporções dos complexos microbianos (SOCRANSKY et al. 1998) nos cinco grupos terapêuticos no início do estudo e em 3 meses pós-terapia. No início do estudo todos os grupos apresentavam altas proporções dos complexos vermelho e laranja ( $\cong$  45 a 50% das espécies avaliadas) e baixas proporções das espécies de *Actinomyces* ( $\cong$  11 a 15% das espécies avaliadas). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os cinco grupos, no início do estudo. Três meses após o tratamento todas as terapias levaram a alterações benéficas nos perfis microbianos. Houve redução das proporções do complexo laranja e, principalmente, do vermelho; e aumento das proporções dos complexos compatíveis com saúde em todos os grupos. Porém, aos 3 meses após os tratamentos os dois grupo que receberam antibiótico por 14 dias apresentaram menores proporções residuais de complexo vermelho ( $\cong$  6%) do que o grupo controle ( $\cong$  11%) ( $p < 0,05$ ). As médias de proporções residuais desses patógenos nos grupos de antibiótico por 7 dias ficaram em um valor intermediário aos demais grupos ( $\cong$  8%), porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas. As proporções de complexo laranja foram estatisticamente reduzidas apenas nos dois grupos que receberam a maior dosagem de MTZ (400mg).



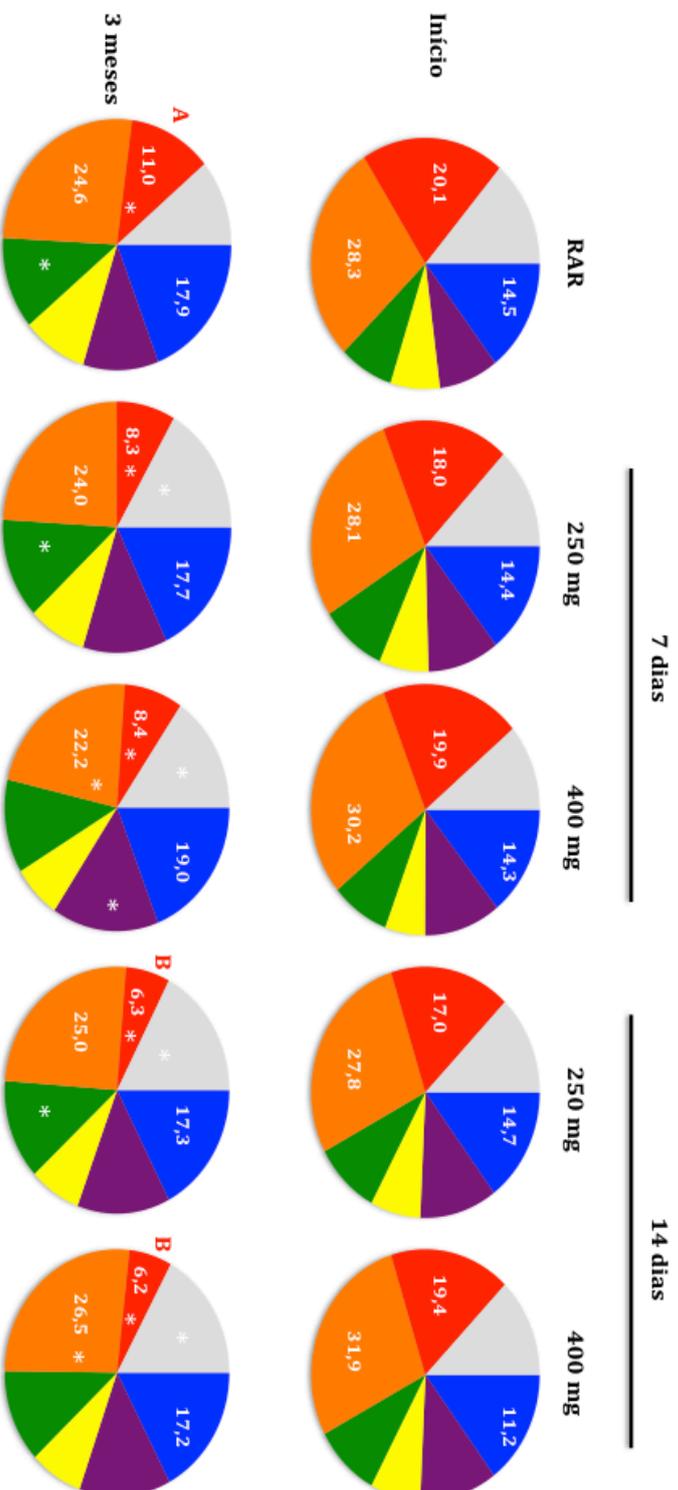
**Figura 6.** Níveis (média de contagem x10<sup>5</sup>) das 40 espécies bacterianas avaliadas no início do estudo e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos. RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol. (As diferenças significantes entre os grupos terapêuticos foram avaliadas usando os testes Kruskal-Wallis e Dunn. As diferenças significantes dentro de cada grupo foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon).



**Figura 7.** Proporção das 40 espécies bacterianas avaliadas no início do estudo e 3 meses pós-terapia nos cinco grupos terapêuticos. RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol. (As diferenças significantes entre os grupos terapêuticos foram avaliadas usando os testes Kruskal-Wallis e Dunn. As diferenças significantes dentro de cada grupo foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon).



**Figura 8.** Comparação dos grupos que receberam antibióticos por 7, 14 dias ou controle em relação à contagem e proporção das 40 espécies bacterianas avaliadas 3 meses pós-terapia. RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol. (As diferenças significantes entre os grupos terapêuticos foram avaliadas usando os testes Kruskal-Wallis e Dunn. As diferenças significantes dentro de cada grupo foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon).



**Figura 9:** Média das proporções dos complexos microbianos (SOCRANSKY et al. 1998) nos cinco grupos terapêuticos no início do estudo e em 3 meses pós-terapia. RAR, raspagem e alisamento radicular. (As diferenças significantes entre os grupos terapêuticos (letras distintas) foram avaliadas usando os testes Kruskal-Wallis e Dunn. As diferenças significantes dentro de cada grupo (representadas por asterisco) foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon).

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo clínico paralelo, duplo-cego, aleatorizado e placebo-controlado foi desenhado com o objetivo de testar o efeito do tempo de administração e de diferentes dosagens de MTZ de um dos protocolos terapêuticos mais promissores para o tratamento da periodontite, que é o uso concomitante de RAR+AMX+MTZ. Mais especificamente, foram testados dois tempos de administração das drogas: 7 ou 14 dias, e duas dosagens de MTZ: 250mg ou 400mg. De forma geral, os resultados sugeriram que o uso adjunto de AMX+MTZ por 14 dias leva a efeitos superiores aos obtidos com a utilização desses agentes por 7 dias. A dosagem do MTZ também parece ter um efeito benéfico adicional, uma vez que o grupo que recebeu a maior dosagem pelo tempo mais longo mostrou uma tendência a apresentar os maiores benefícios clínicos e microbiológicos, enquanto que o grupo que recebeu menor dosagem de MTZ e o menor tempo de administração teve uma tendência contrária, a apresentar as menores vantagens em relação ao grupo controle e aos demais grupos teste.

### 5.1 Dados clínicos

Os cinco grupos terapêuticos (C=RAR; T1=AMX+MTZ 250mg/7 dias; T2=AMX+MTZ 400mg/7 dias; T3=AMX+MTZ 250mg/14 dias e T4=AMX+MTZ 400mg/14 dias) eram clinicamente e microbiologicamente semelhantes no início do estudo. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre eles para nenhum dos parâmetros clínicos ou para os complexos bacterianos avaliados (Tabela 3, Tabela 5, Figura 9). Os parâmetros clínicos da população estudada sugerem que os critérios de inclusão utilizados caracterizaram de forma satisfatória grupos de indivíduos com periodontite crônica generalizada. As médias de PS e de NCI variaram, respectivamente:  $3,7 \pm 0,7$ mm a  $3,9 \pm 0,9$ mm e  $4,1 \pm 0,7$ mm a  $4,8 \pm 1,1$ mm. Houve um alto percentual de sítios apresentando sangramento à sondagem no início do estudo, que variou de  $62,8 \pm 18,9$  a  $69,1 \pm 20,5$  (Tabela 3). A média do número de sítios apresentando PS inicial  $\geq 5$ mm, 6mm e 7mm também foi alta nos cinco grupos terapêuticos no início do estudo (Tabela 5).

A variável primária de avaliação utilizada no presente estudo foi a diferença entre os grupos terapêuticos para as médias de alterações no NCI em bolsas inicialmente profundas ( $PS \geq 7\text{mm}$ ), entre o início do estudo e três meses. Os dois grupos que tomaram antibióticos por 14 dias obtiveram ganhos maiores, estatisticamente significativos em relação ao grupo controle para essa variável ( $RAR=1,27 \pm 1,02\text{mm}$ ;  $T3=2,47 \pm 1,23\text{mm}$ ;  $T4=2,64 \pm 0,88\text{mm}$ ,  $p < 0,05$  entre os dois grupos teste e o grupo controle). Esses dois grupos teste de MTZ/14 dias foram significativamente superiores ao grupo controle para todas as demais variáveis clínicas avaliadas e apresentadas nas Tabelas 4 e 5. De forma geral, apesar de também ter sido observada uma tendência constante a melhores resultados clínicos nos grupos de MTZ/7 dias em comparação ao grupo controle, significância estatística não foi alcançada para a variável primária de avaliação e para várias variáveis secundárias. O grupo que menos diferiu significativamente do controle foi o grupo T1. Por outro lado, os grupos que mais diferiram do grupo controle foram os dois grupos de MTZ/14 dias ( $T3=AMX+MTZ\ 250\text{mg}$  e  $T4=AMX+MTZ\ 400\text{mg}$ ). Apesar de esses dois grupos não diferirem significativamente entre si, houve uma tendência a melhores resultados no grupo de MTZ 400mg (T4). Essa tendência pode ser claramente notada na Tabela 5, que apresenta os dados de sítios residuais nos cinco grupos após 3 meses. Pode-se observar claramente que o grupo que recebeu a maior dosagem de MTZ por mais tempo (T4) teve uma menor média de sítios residuais para todas as categorias de bolsa estudadas. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado a superioridade da terapia de  $RAR+AMX+MTZ\ 400\text{mg}/14$  dias no ganho de IC, na redução de PS e na média de sítios residuais sobre a terapia mecânica isoladamente, tanto em periodontite crônica (MATARAZZO et al. 2008, SILVA et al. 2011, FERES et al. 2012) quanto em periodontite agressiva (MESTNIK et al. 2010, 2012). No nosso único estudo aonde um dos grupos utilizou  $RAR+MTZ\ 400\text{mg}$  por um tempo menor (10 dias), os resultados foram no geral menos satisfatórios (CARVALHO et al. 2004) do que os grupos de  $RAR+MTZ\ 400\text{mg}/14$  dias dos demais estudos (MATARAZZO et al. 2008, SILVA et al. 2011, FERES et al. 2012, MESTNIK et al. 2010, 2012). Outros grupos de investigadores utilizaram a associação de  $AMX+MTZ$  por um tempo menor e com dosagens mais baixas, e de forma geral os resultados estão de acordo com os observados no presente estudo para os grupos que também receberam doses mais

baixas de MTZ e/ou o tempo mais curto de antibioticoterapia. Por exemplo, os que adotaram o protocolo de 250mg de MTZ e 375mg de AMX por 7 dias para tratar indivíduos com periodontite agressiva (CASARIN et al. 2012) e crônica (EHMKE et al. 2005), obtiveram resultados semelhantes aos observados nos nossos grupos de RAR+AMX+MTZ (250 ou 400mg)/7 dias, qual sejam: maior redução na média de PS em sítios com PS  $\geq$  7mm em comparação com o grupo controle (terapia mecânica somente;  $p < 0,05$ ); porém, sem benefício adicional, estatisticamente significativo, da terapia antibiótica quanto ao ganho de IC. Ribeiro et al. (2009), utilizaram esse mesmo protocolo de Casarin et al. (2012) para tratamento de 25 indivíduos com periodontite crônica, e a terapia que associou RAR e os antibióticos não levou a resultados superiores, estatisticamente significantes, nem mesmo para a redução de PS em sítios com PS inicial  $\geq$  7mm.

Por outro lado, Winkel et al. (2001) utilizaram esse mesmo protocolo terapêutico e obtiveram benefícios significativos tanto para redução em PS quanto em ganho de IC em sítios inicialmente profundos, em comparação com o grupo de RAR. Porém, vale destacar que o ganho de IC em sítios profundos no estudo de Winkel et al. (2001) foi de 1,5 mm, bem inferior ao do presente estudo (2,64 mm), ainda que a média inicial de PS no presente estudo era menor (3.9 mm) do que a do estudo de Winkel et al. (2001) (4.4 mm). Vale destacar que no caso desses três estudos, não somente a dosagem do MTZ e o tempo de administração das drogas estavam reduzidas, como a dosagem da AMX também foi menor que a do presente estudo, o que pode ter influenciado os resultados. Já Varela et al. (2011) utilizaram a mesma dosagem de AMX do presente estudo (500 mg) e menor dosagem de MTZ (250 mg) e tempo de terapia antibiótica (10 dias). Além disso, os autores associaram aos dois grupos (teste e controle) diversas formas de desinfecção com clorexidina como bochecho, irrigação de bolsas e escovação da língua. Os autores não descrevem redução de PS em sítios profundos, mas na avaliação de boca toda não houve benefício estatisticamente significativa para o grupo teste. No presente estudo esse benefício foi observado no grupo que tomou a menor dosagem de MTZ (250mg), mas somente quando os antibióticos foram administrados por 14 dias (Tabela 4). Uma comparação interessante pode ser feita com o estudo de Goodson et al. (2012), que utilizaram dosagem mais baixa de MTZ, mas por 14 dias, e obtiveram ótimos resultados com essa terapia em comparação com diversos

tratamentos adjuntos, inclusive na comparação com indivíduos que receberam cirurgia periodontal. Esses resultados sustentam a hipótese sugerida pelo presente estudo de que o tempo de administração parece estar mais relacionado com o sucesso terapêutico do que a dosagem de MTZ utilizada (250mg ou 400mg). É importante destacar que o número de indivíduos que relatou cada um dos efeitos colaterais foi semelhante entre os grupos de antibióticos, e mesmo no grupo controle houve relatos de efeitos colaterais como diarreia, náusea/vômito. Ou seja, em relação às terapias antibióticas utilizadas nesse estudo, parece adequado concluir que os efeitos colaterais não têm uma influência fundamental na escolha da terapia mais indicada para o tratamento desses indivíduos. Esse direcionamento deverá ser embasado principalmente nos efeitos clínicos e microbiológicos dos diferentes protocolos terapêuticos.

## 5.2 Dados microbiológicos

Os efeitos de cada terapia na composição da microbiota subgengival foram avaliados no presente estudo e os dados obtidos estão em concordância com os efeitos clínicos (Figuras 6 a 9). Apesar de que todos os tratamentos empregados levaram a uma alteração benéfica na composição da microbiota subgengival aos três meses, os efeitos da RAR foram em geral mais discretos do que os observados nos grupos teste. Por exemplo, a RAR não causou uma redução estatisticamente significativa nos níveis de nenhuma das três espécies do complexo vermelho (Figura 6), e reduziu significativamente a proporção individual de apenas uma dessas espécies: *P. gingivalis* (Figura 7). Por outro lado, quando os antibióticos sistêmicos foram utilizados como adjuntos à RAR, notou-se um efeito mais profundo nesses patógenos, que mostraram redução estatisticamente significativa, tanto em contagem quanto em proporção, nos grupos T2, T3 e T4 aos 3 meses (Figuras 6 e 7). Já os indivíduos do grupo T1, que receberam a menor dosagem e duração de terapia antibiótica, mostraram redução de apenas dois patógenos do complexo vermelho: *P. gingivalis* e *T. forsythia*. Quando os efeitos nos patógenos do complexo laranja são considerados juntamente com os efeitos observados sobre o complexo vermelho, notou-se uma superioridade para os grupos que tomaram antibiótico por 14 dias (T3 e T4) em comparação aos que tomaram por 7 dias (T1 e T2). Essa

tendência pôde ser confirmada pela comparação desses dois grupos com o grupo controle em relação a quantidade residual de cada um desses patógenos em 3 meses (Figura 8). Outro dado interessante, que ressalta o efeito mais profundo da terapia de 14 dias de antibiótico sistêmico é o de média das proporções dos complexos microbianos nos 5 grupos (Figura 9). Em 3 meses pós-terapia as proporções residuais do complexo vermelho estavam estatisticamente menores nos grupos T3 e T4 ( $\approx 6\%$ ) do que no grupo controle ( $11\%$ ); enquanto que os grupos T1 e T2 mostraram valores intermediários ( $\approx 8\%$ ); porém, sem diferença estatística em comparação aos demais grupos. Já as proporções residuais de complexo laranja ou das espécies de *Actinomyces* (grupo azul) não diferiram estatisticamente entre os grupos após o tratamento. Porém, deve-se considerar que pequenas alterações no perfil microbiológico no curto prazo, especialmente as observadas nas espécies do complexo vermelho e em espécies individuais do complexo laranja podem determinar o perfil microbiológico subgingival no longo prazo. Uma análise recente de 450 indivíduos tratados por diferentes formas de terapias periodontais, incluindo antibióticos sistêmicos, revelou que indivíduos que apresentam níveis e proporções próximas ou abaixo de  $6\%$  aos 3 meses pós-terapia tendem a mostrar uma melhora no perfil microbiológico em 1 ano pós-terapia; enquanto que os grupos terapêuticos que mantêm  $8\%$  ou mais de complexo vermelho no curto prazo tendem a mostrar uma piora na composição da placa subgingival no longo prazo (Periodontology 2000, *in press*). Seguindo essa linha de pensamento, os grupos que tomaram antibiótico por 14 dias no presente estudo teriam uma maior probabilidade de manter ou melhorar o perfil microbiológico com o passar do tempo, e conseqüentemente, de manter ou até mesmo melhorar os benefícios clínicos alcançados em 3 meses.

A comparação dos dados microbiológicos obtidos no presente estudo torna-se difícil, uma vez que nenhum outro estudo avaliou alterações no perfil microbiológico obtidos por diferentes protocolos de antibióticos sistêmicos, e a maioria dos estudos que descreveram os efeitos microbiológicos de um certo tipo de protocolo antibiótico avaliaram poucas espécies bacterianas. Assim como observado para os resultados clínicos, de forma geral os estudos que utilizaram dosagens mais baixas de MTZ e/ou AMX ou menor tempo de antibioticoterapia (7 ou 8 dias) obtiveram pouco ou nenhum benefício adicional no perfil microbiológico subgingival em comparação com RAR somente em indivíduos com periodontite crônica (EHMKE et al. 2005,

HAFFAJEE et al. 2008, RIBEIRO et al. 2009, CIONCA et al. 2010) ou agressiva (HELLER et al. 2011, CASARIN et al. 2012). Esses dados corroboram com os efeitos microbiológicos menos marcantes observados no grupo T1 do presente estudo. Por outro lado, Yek et al. (2010) trataram um grupo de indivíduos com periodontite agressiva com um protocolo terapêutico mais semelhante ao nosso (RAR+AMX 500mg+MTZ 500mg por 10 dias) e obtiveram resultados microbiológicos mais satisfatórios. O grupo teste mostrou uma maior redução na prevalência de *T. forsythia* em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) e a prevalência de *T. denticola* foi reduzida estatisticamente somente no grupo teste. A limitação desse estudo é que os autores utilizaram *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e apenas presença ou ausência foram determinadas. A maioria dos estudos prévios do nosso grupo de pesquisa que avaliaram os efeitos da combinação de AMX+MTZ na composição da microbiota subgengival, aplicou o mesmo protocolo de dosagem e tempo de antibiótico utilizado no grupo T4 do presente estudo (AMX 500mg+MTZ 400mg/14 dias) (MATARAZZO et al. 2008, MESTNIK et al. 2010, SILVA et al. 2011). Em concordância com os efeitos microbiológicos benéficos observados no grupo T4, os resultados desses estudos foram sempre favoráveis aos grupos teste e mostraram de forma consistente um melhor perfil microbiológico subgengival aos 3 meses pós-terapia, em comparação aos grupos controle de RAR sem a adição de antibióticos.

### **5.3 Comentários finais e aplicabilidade clínica dos resultados obtidos**

A avaliação global dos resultados clínicos e microbiológicos do presente estudo deixa claro que o tempo de utilização dos antibióticos (14 dias ao invés de 7 dias) está mais associado ao sucesso do tratamento do que a dosagem de MTZ utilizada. Praticamente todas as avaliações clínicas e microbiológicas mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos tratados com antibióticos por 14 dias e o grupo controle, enquanto que na maioria das vezes os benefícios observados nos dois grupos tratados com antibióticos por 7 dias não atingiram significância estatística em relação ao grupo controle. Considerando-se esses pontos, pode-se dizer que a terapia de 14 dias é a mais indicada. Porém, ainda resta uma dúvida não totalmente esclarecida no presente estudo, que é a real

semelhança/diferença entre os dois grupos de 14 dias; T3 (MTZ 250mg) e T4 (MTZ 400mg). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre esses dois grupos terapêuticos para nenhum dos parâmetros avaliados. Porém, em algumas avaliações há uma forte tendência a se observar melhores resultados para o grupo T4, como na média do número de sítios residuais (Tabela 5) e no número de indivíduos apresentando alto risco para progressão de doença periodontal aos 3 meses pós-terapia (Tabela 6). Considerando-se que os efeitos colaterais não diferiram de forma relevante entre os quatro grupos de antibióticos sistêmicos, parece adequado afirmar que o protocolo mais indicado para o tratamento desses indivíduos seria a maior dosagem de MTZ pelo maior tempo (grupo T4). Porém, um dado que não pode ser desconsiderado é que 2 indivíduos do grupo T4 (mas não nos demais grupos) relataram que não tomariam os medicamentos novamente se fosse preciso. Aparentemente, esse relato não se refletiu numa redução da adesão ao tratamento no presente estudo, mas pode indicar uma tendência a uma pior cooperação com essa terapia em outras populações. A avaliação longitudinal dos indivíduos desse estudo será fundamental para esclarecer melhor se o discreto benefício clínico observado no grupo T4 (400mg MTZ) sobre o grupo T3 (250mg MTZ) irá se manter, diminuir ou aumentar até 1 ano pós-terapia. Esses dados serão importantes no sentido de definir melhor a dosagem ideal de MTZ para o tratamento da periodontite crônica generalizada.

## **6 CONCLUSÃO**

O uso adjunto de AMX+MTZ por 14 dias no tratamento da PCG, oferece benefícios clínicos e microbiológicos, além dos obtidos com a RAR, independentemente da dose de MTZ utilizada (250mg ou 400mg).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Fanas SH, Drucker DB, Hull PS. Amoxicillin with clavulanic acid and tetracycline in periodontal therapy. *J Dent.* 1991; 19:97-99.
- 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.
- Araújo 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; 74:1736-40.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann of Periodontol.* 1999; 4:1-6.
- Ávila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Specific Primer For Ap-Pcr Identification Of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 699-704.
- Berglundh T, Krok L, Liljenberg B, Westfelt E, Serino G, Lindhe J. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 1998; 25:354-362.
- Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Goncalves C, Haffajee AD, Socransky SS *et al.* Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II - microbiological results. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 406-411.
- Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population: I. Clinical results. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:1017-1076.
- Casarin RC, Peloso Ribeiro ED, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. The combination of amoxicillin and metronidazole improves clinical and microbiologic results of one-stage, full-mouth, ultrasonic debridement in aggressive periodontitis treatment. *J Periodontol.* 2012; 83:988-98.
- Christersson L, Wikesjö U, Albin B, Zambon J, Genco R. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. *J Periodontol.* 1987; 58:540-545.

Ciancio SG, Slots J, Reynolds HS, Zambon JJ, McKenna JD. The effect of short-term administration of minocycline HCl on gingival inflammation and subgingival microflora. *J Periodontol.* 1982; 53:557-561.

Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombeli A. Amoxicilin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planning of chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009; 80:317-364.

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

Crout RJ, Lee HM, Schroeder K, Crout H, Ramamurthy NS, Wiener M, Golub LM. The "cyclic" regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol.* 1996; 67:506-514.

Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent JR RL, Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12- month results. *J Clin Periodontol.* 2000; 27:30-36.

D'Ávila GB, Carvalho LH, Feres-Filho EJ, Feres M, Leão A. Oral health impacts on daily living related to four different treatment protocols for chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2005; 76:1751-1757.

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; 20:153-156.

Dastoor SF, Travan S, Neiva RF, Rayburn LA, Giannobile WV, Wang HL. Effects of adjunctive systemic azithromycin with periodontal surgery in the treatment of chronic periodontitis in smokers: a pilot study. *J Periodontol.* 2007; 78:1887-1896.

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; 76:749-759.

Elter, JR, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Meta-analysis of the effect of systemic metronidazole as an adjunct to scaling and root planing for adult periodontitis. *J Periodontal Res.* 1997; 32:487-496.

Faveri M, Feres M, Shibli JA, Hayacibara RF, Hayacibara MM, Figueiredo LC. Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans. *J Periodontol.* 2006(a); 77:1539-1546.

- 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; 36:739-749.
- Faveri M, Gursky LC, Feres M, Shibli JA, Salvador SL, Figueiredo LC. Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2006(b); 33:819-828.
- Faveri M, Mayer MP, Feres M, De Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23:112-118.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochem.* 1983; 132:6-13.
- Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson JM, Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol.* 2002; 29:724-735.
- Feres M, Gursky LC, Faveri M, Tzusuki CO, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2009; 36:857-867.
- Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.* 2001; 28:597-609.
- Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard K, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 1999(a); 26:775-783.
- Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard K, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. *J Clin Periodontol.* 1999(b); 26:784-792.
- 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; Aug 16. doi: 10.1111/jcpe.12004.

Feres M. Antibiotics in the treatment of periodontal diseases: microbiological basis and clinical applications. *Ann R Australas Coll Dent Surg.* 2008; 19:37-44.

Feres M. Effect of systemically administered antibiotics on clinical parameters of periodontal disease, subgingival plaque composition and antibiotic resistance [tese de doutorado]. Boston: Harvard School of Dental Medicine; 1999.

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

Freeman E, Ellen RP, Thompson G, Weinberg SE, Song M, Lazarus RH. Gingival crevicular fluid concentration and side effects of minocycline: a comparison of two dose regimens. *J Periodontol.* 1992; 63:13-18.

Gomes SG, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2006; 77: 1483-1490

Gomi K, Yashima A, Iino F, Kanazashi M, Nagano T, Shibukawa N, Ohshima T, Maeda N, Arai T. Drug concentration in inflamed periodontal tissues after systemically administered azithromycin. *J Periodontol.* 2007(a); 78:918-923.

Gomi K, Yashima A, Nagano T, Kanazashi M, Maeda N, Arai T. Effects of full-mouth scaling and root planing in conjunction with systemically administered azithromycin. *J Periodontol.* 2007(b); 78:422-429.

Gonçalves C, Rodrigues RMJ, Feres-Filho EJ, Colombo APV. Clinical effects of systemic and topical tetracycline therapy on chronic periodontal disease. *Braz J of Oral Sciences.* 2004; 8: 384-389.

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

Goodson JM, Feres M. Antibiotics and control of plaque-related diseases. In: AUTORES. *Dental Plaque Revisited Oral, Oral Biofilms in health and Disease.* Londres: EDITORA; 1999.

Greenberg RN. Overview of patient compliance with medication dosing: a literature review. *Clin Ther.* 1984; 6:592-599.

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

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; 32:1096-1107.

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:996-1002.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky, SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:324-334.

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

Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodonto.* 2003; 81:115-181.

Haffajee AD, Torresyap G, Socransky SS. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *J Clin Periodontol.* 2007; 34:243-253.

Hellden LB, Listgarten MA, Lindhe J. The effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1979; 6:222-230.

Helovuo H, Hakkarainen k, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8:75-79.

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

Herrera D, Alonso B, León R, Roldán S, Sanz M. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol.* 2008; 35:45-66.

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planning in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2002; 3:136-159.

Joyston-Bechal S, Smales FC, Duckworth R. A Follow-up study 3 years after metronidazole therapy for chronic periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1986; 13:944-949.

Kaner D, Bernimoulin JP, Hopfenmüller W, Kleber BM, Friedmann A. Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2007; 34:880-891.

Kulik EM, Lenkeit K, Chenux S, Meyer J. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61:1087-1091.

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

Levy RM, Giannobile WV, Feres M, Haffajee AD, Smith C, Socransky SS. The effect of apically repositioned flap surgery on clinical parameters and the composition of the subgingival microbiota: 12-month data. *Int J Period Rest Dent.* 2002; 22:209-219.

Lindhe J, Liljenberg B, Adielson B, Borjesson I. Use of metronidazole as a probe in the study of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1983(a); 10:100-112.

Lindhe J, Liljenberg B, Adielson B. Effect of long-term tetracycline therapy on human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1983(b); 10:590-601.

Listgarten MA, Hellden L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol.* 1978; 5:115-132.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man: rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986; 13:431-445.

Löe H, Anerud A, Boysen, H, Smith M. The natural history periodontal disease in man: the rate of periodontal destruction before 40 years of age. *J Periodontol.* 1978; 49:607-620.

Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarcz J, Smith BA. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol.* 1992; 19:103-112.

Loesche WJ, Giordano JR, Soehren S, Hutchinson R, Rau CF, Walsh L, Schork MA. Nonsurgical treatment of patients with periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 81:533-543.

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

Loesche WJ, Giordano JR, Soehren S, Kaciroti N. The nonsurgical treatment of patients with periodontal disease: results after five years. *J Am Dent Assoc.* 2002; 133:311-320.

Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Caffesse R, Stoll J. Metronidazole therapy for periodontitis. *J Periodontal Res.* 1987; 22:224-226.

Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Morrison EC, Caffesse R, Hujoel PP. Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. *J Periodontol.* 1991; 62:247-257.

Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Kerry GA, Higgins T, Stoll J. Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *J Periodontol.* 1984; 55:325-335.

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

López NJ, Gamonal JA, Martinez B. Repeated metronidazole and amoxicillin treatment of periodontitis. A follow-up study. *J Periodontol.* 2000; 71:79-89.

López NJ, Gamonal JA. Effects of metronidazole plus amoxicillin in progressive untreated adult periodontitis: Results of a single 1-week course after 2 and 4 months. *J Periodontol.* 1998; 69:1291-1298.

López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2006; 33:648-660.

Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Hill R, Soehren S, Fenno JC *et al.* Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. *J Periodontol.* 2005; 76:426-436.

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; 35: 885-896.

Máximo MB, De Mendonça AC, Renata Santos V, Figueiredo LC, Feres M, Duarte PM. Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:99-108.

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

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EAG, Favari 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; 37:353-365.

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Soares G, Teles RP, Fermiano D, Duarte PM, Favari M. The effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical Trial. *J Clin Periodontol.* 2012 Jul 3 doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01932.x.

Moeintaghavi A, Talebi-ardakani MR, Haerian-ardakani A, Zandi H, Taghipour S, Fallahzadeh H, Pakzad A, Fahami N. Adjunctive effects of systemic amoxicillin and metronidazole with scaling and root planing: a randomized, placebo controlled clinical trial. *J Contemp Dent Pract.* 2007; 8:51-59.

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; 32:225-230.

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

Müller HP, Lange DE, Muller RF. A 2-year study of adjunctive minocycline-HCl in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Periodontol.* 1993; 64:509-519.

Müller HP, Lange DE, Muller RF. Concentrations of *A. actinomycetemcomitans* in subgingival plaque following short-term minocycline therapy. German. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift.* 1990; 45:462-465.

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. *Stomatologia.* 2006; 4:116-121.

Palmer RM, Matthews JP, Wilson RF. Adjunctive systemic and locally delivered metronidazole in the treatment of periodontitis: a controlled clinical study. *Br Dent J*. 1998; 184:548-552.

Palmer RM, Matthews JP, Wilson RF. Non-surgical periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol*. 1999; 26:158-163.

Pavicic MJAMP, van Winkelhoff AJ, Douqué NH, Steures RWR, Graaff J. Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *J Clin Periodontol*. 1994; 21:107-112.

Poulet PP, Duffaut D, Barthet P, Brumpt I. Concentrations and *in vivo* antibacterial activity of spiramycin and metronidazole in patients with periodontitis treated with high-dose metronidazole and the spiramycin/metronidazole combination. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55:347-351.

Ribeiro EP, Bittencourt S, Zanin IC, Bovi Ambrosano GM, Sallum EA, Nociti FH, Gonçalves RB, Casati MZ. Full-mouth ultrasonic debridement associated with amoxicillin and metronidazole in the treatment of severe chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009; 80: 1254-64.

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

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

Scopp IW, Froum SJ, Sullivan M, Kaz&jian G, Wank D, Fine A. Tetracycline: a clinical study to determine its effectiveness as long-term adjuvant. *J Periodontol*. 1980; 51:328-330.

Sgolastra F., Gatto R., Petrucci A., Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2012; 83(10):1257- 69.

Sgolastra F., Gatto R., Petrucci A., Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the

treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2012; 83(6):731- 43.

Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19:975-982.

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

Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol.* 1979; 50:495-509.

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

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C., Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25:134-144.

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

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

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19:352-362.

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

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

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005; 38: 35-87.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994; 17:788-792.

Söder B, Nedlich U, Jim LJ. Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. *J Periodontol.* 1999; 70:761-771.

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

van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goené RJ, Abbas F, Winkel EG, De Graaff J. Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1989; 16:128-131.

van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, Graaff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-Associated Periodontitis. *J Periodontol.* 1992; 63:52-57.

van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Vandenbroucke-Grauls CM. On the dosage of antibiotics in clinical trials. *J Clin Periodontol.* 1999; 26:764-6.

Varela VM, Heller D, Silva-Senem MX, Torres MC, Colombo AP, Feres-Filho EJ. Systemic antimicrobials adjunctive to a repeated mechanical and antiseptic therapy for aggressive periodontitis: a 6-month randomized controlled trial. *J Periodontol.* 2011; 82:1121-30.

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

Watanabe K, Frommel TO. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. *J Dent Res.* 1993; 72:1040-1104.

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

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

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; 33:254-264.

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

Zandbergen D, Slot DE, Cobb CM, Van der Weijden FA. The Clinical Effect of Scaling and Root Planing and The Concomitant Administration of Systemic Amoxicillin and Metronidazole: a Systematic Review. *J Periodontol.* 2012; Maio 21.

## ANEXO

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



Guarulhos, 02 de dezembro de 2009.

Exma. Sra.  
Magda Feres

Referência: **Aprovação de Projeto**  
**SISNEP/513** - "Influência clínica e microbiológica da dosagem e da duração da terapia com antibióticos sistêmicos no tratamento da periodontite crônica"

#### **PARECER Nº 237/2009**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Influência clínica e microbiológica da dosagem e da duração da terapia com antibióticos sistêmicos no tratamento da periodontite crônica" - SISNEP/513, na reunião de 01.12.2009, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o projeto acima **aprovado**.

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

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclarecemos a necessidade da apresentação de relatório final até **15.12.12**.



Juhara Silvia Van De Velde Vieira  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Coordenadora

## Anexo B - Questionário de efeitos adversos

Grupos de tratamento	01	02	03	04	05
Marque o número de indivíduos que relataram cada um dos efeitos abaixo:					
1) Você conseguiu tomar os medicamentos como lhe foi orientado?					
2) Você sentiu algum mal-estar devido ao medicamento que tomou?					
3) Sentiu náuseas ou vômito?					
4) Teve diarreia neste período?					
5) Sentiu algum gosto metálico na boca?					
6) Sentiu dor de cabeça ou tontura?					
7) Caso tenha sentido algum dos problemas das perguntas anteriores, isso atrapalhou o seu dia-a-dia?					
8) Os medicamentos provocaram mau humor ou irritação?					
9) Sentiu fraqueza ou falta de ânimo para o trabalho?					
10) Teve sono excessivo devido aos medicamentos?					
11) Os horários dos medicamentos prejudicaram o seu dia-a-dia?					
12) Você tomaria os medicamentos novamente caso fosse necessário?					