



DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
Área de Concentração em Periodontia

STELLA DE NORONHA CAMPOS MENDES

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA PERIODONTAL
ANTIMICROBIANA LOCAL E SISTÊMICA NA
COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DE DIFERENTES
NICHOS BUCAIS**

**Guarulhos
2012**

STELLA DE NORONHA CAMPOS MENDES

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA PERIODONTAL
ANTIMICROBIANA LOCAL E SISTÊMICA NA
COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DE DIFERENTES
NICHOS BUCAIS**

**Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos
para obtenção do título de Mestre em Odontologia
Área de concentração: Periodontia**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciene C. de Figueiredo
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Magda Feres**

**Guarulhos
2012**

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

M538i

Mendes, Stella de Noronha Campos
Influência da terapia periodontal antimicrobiana local sistêmica na
composição da microbiota de diferentes nichos bucais/ Stella de Noronha
Campos Mendes, 2012.
66 f.: il.; 31 cm

Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Pós – Graduação e
Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Luciene C. de Figueiredo

Bibliografia: f. 52-55

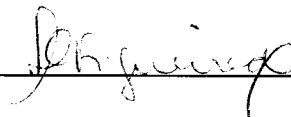
1. Doenças periodontais. 2. Microbiologia oral. 3. Terapia. 4.
Antibióticos. I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD – 617

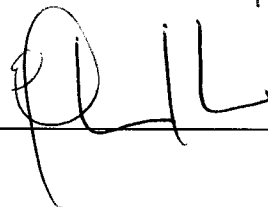
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "INFLUÊNCIA DA TERAPIA PERIODONTAL ANTIMICROBIANA SISTÊMICA NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL" em sessão pública realizada em 07 de Agosto de 2012 considerou a candidata Stella de Noronha Campos Mendes aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

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




2. Prof. Dr. Elton Gonçalves Zenóbio (PUCMinas)



3. Profa. Dra. Maria Mônica Studart Mendes Moreira (UFC)



4. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UnG)



5. Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte (UnG)



Dedicatória

Dedico este trabalho a meu pai e à Dinda que, ao longo da minha vida, estiveram ao meu lado em todos os momentos, me mostrando a direção, apoiando minhas decisões e ajudando em todos os sentidos. Agradeço pelo amor incondicional e por acreditarem em minha capacidade e desenvolvimento profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciene Figueiredo, pelo apoio, incentivo para realizar este trabalho. Minha profunda admiração e agradecimento por sua disponibilidade, pelo conhecimento transmitido e pela amizade demonstrada nos momentos difíceis.

À professora e co-orientadora. Dra. Magda Feres, exemplo de competência e dedicação profissional. Obrigada pela oportunidade!

À Izilvania Barreto que, ao me ajudar e compartilhar sua experiência na parte laboratorial deste estudo tornou-se uma amiga.

Ao professor Dr. Marcelo de Faveri, pela orientação e ajuda indispensável para a realização deste trabalho.

Aos amigos Adriana, Fábio, Ivan e Paulo, pelos conhecimentos compartilhados, pela ajuda recíproca e amizade verdadeira.

Aos professores do curso de Doutorado em Odontologia da UnG, Jamil Shibli e Poliana Mendes Duarte. Exemplo de professores e pesquisadores apaixonados pelo que fazem.

Aos pacientes que participaram desta pesquisa.

Aos demais colegas do curso de Doutorado em Odontologia e funcionários da UnG: cada um deixou um pouco de si durante esse período de intenso aprendizado.

Ao Raimundo Neiva, obrigada pelo incentivo e companhia em todos os momentos.

RESUMO

Embora o conhecimento sobre o biofilme supra e subgengival ter aumentado muito nos últimos anos, pouco se sabe a respeito da composição do biofilme formado em tecidos moles, os quais correspondem a 80% da cavidade bucal. O interesse sobre essa microbiota tem sido despertado devido ao fato de que tais microrganismos podem estar envolvidos com várias situações clínicas, tais como halitose, cárie e doença periodontal. Além disso, esses diferentes nichos bucais podem representar um importante reservatório para a reinfecção e recolonização do ambiente subgengival. Dessa forma, o objetivo do presente estudo piloto, cego, placebo controlado foi avaliar os efeitos microbiológicos da terapia de raspagem e alisamento radicular (RAR) associada ao metronidazol (MTZ) e à amoxicilina (AMX) sistêmicos, com o controle químico do biofilme supragengival através de bochecho com clorexidina (CLX) na composição da microbiota de diferentes nichos (biofilmes subgengival e supragengival, dorso da língua, saliva e mucosa), em indivíduos com doença periodontal crônica. Para tal finalidade, 60 indivíduos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos terapêuticos, sendo grupo controle (n=15): **RAR + MTZ placebo + AMX placebo** 3x dia, durante 14 dias + bochecho com CLX placebo 2x dia, durante 60 dias; Teste 1 (n=15): **RAR + bochecho com CLX 0,12% 2x dia, durante 60 dias + MTZ placebo e AMX placebo** 3x dia, durante 14 dias; Teste 2 (n=15): **RAR + MTZ (400mg) + AMX (500mg)** 3x dia, durante 14 dias + bochecho com CLX placebo 2x dia, durante 60 dias; Teste 3 (n=15): **RAR + MTZ (400mg) + AMX (500mg)** 3x dia, durante 14 dias + bochecho com **CLX 0,12% 2x dia, durante 60 dias**. Avaliações microbiológicas foram realizadas no momento inicial, aos 45, 90 e 180 dias pós-terapia. Sete amostras de biofilme foram coletadas de cada indivíduo em cada avaliação: dois sítios supragengivais, dois sítios subgengivais, dorso de língua, saliva e mucosa. As amostras de biofilme foram analisadas individualmente por meio do teste *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para 40 espécies bacterianas. As diferenças entre os grupos terapêuticos foram avaliadas em cada tempo pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Além disso, as diferenças entre os tempos em cada grupo terapêutico foram analisadas pelos testes Friedman e Dunn. Os níveis da maioria das espécies encontradas na saburra lingual, tecidos moles e biofilme supragengival não alteraram significativamente do tempo inicial para 180 dias pós-terapia. A terapia que associou o uso de antimicrobianos sistêmicos e clorexidina à RAR foi a única que levou a redução de espécies do complexo vermelho em amostras de biofilme subgengival e saliva. Os principais resultados foram observados quando os nichos foram analisados em conjunto. Aos 180 dias pós-terapia, foi possível observar a menor proporção de espécies do complexo vermelho no grupo MTZ+AMX+CLX em comparação aos demais grupos. Em conclusão, o uso concomitante do controle químico antimicrobiano (local e sistêmico) associado a terapia periodontal básica parece afetar mais profundamente a composição da microbiota oral.

Palavras-chaves: Doenças periodontais; Microbiologia oral; Terapia; Antibióticos.

ABSTRACT

Although knowledge about the supragingival and subgingival biofilm has increased greatly in recent years, little is known about the composition of the biofilm formed in soft tissues, which correspond to 80% of the oral cavity. The interest on this microbiota has been aroused due to the fact that such microorganisms may be involved in several clinical situations, such as halitosis, caries and periodontal disease. Moreover, these different oral niches may represent an important reservoir for reinfection and recolonization of the subgingival environment. Thus, the aim of this pilot study, single-blinded, placebo-controlled study was to evaluate the microbiological effects of the scaling and root planing (SRP) combined with systemic metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) associated to chlorhexidine (CHX) mouthrinse in the treatment of chronic periodontitis (ChP) on different sites in the oral cavity (tongue, soft tissue, saliva, supragingival and subgingival biofilms). For this purpose, 60 individuals were randomly assigned to four therapeutic groups: Control group (n=15): **SRP** + MTZ placebo + AMX placebo 3x a day, during 14 days + CHX placebo mouthrinse 2x a day during 60 days; Test 1 (n=15): **SRP** + **CHX 0.12%** mouthrinse 2x a day, during 60 days + MTZ placebo and AMX placebo 3x a day, during 14 days; Test 2 (n=15): **SRP** + **MTZ** (400mg) + **AMX** (500mg) 3x a day, during 14 days + CHX placebo mouthrinse 2x a day, during 60 days; Test 3 (n=15): **SRP** + **MTZ** (400mg) + **AMX** (500mg) 3x a day, during 14 days + **CHX 0.12%** mouthrinse 2x a day, during 60 days. Microbiological examinations were realized at baseline, 45, 90 and 180 days after treatment. Samples were collected at seven sites in each individual assessment: two supragingival sites, two subgingival sites, dorsum of the tongue, saliva and soft tissue. The biofilm samples were analyzed individually through the Checkerboard DNA-DNA hybridization for 40 bacterial species. Differences among therapeutic groups in each time point were evaluated by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Differences among time points in each therapeutic group were evaluated by Friedman and Dunn's tests. The counts of most of the species found in the tongue coating, soft tissue and supragingival biofilm did not change significantly from baseline to 180 days post-therapy. The only therapy that led to reduction in the red complex species in subgingival biofilm and saliva samples was the adjunctive use of antibiotics and CHX. The main results were showed for every intra-oral niches analyzed together. At 180 days, there was a significantly lower proportion of the red complex species in the MTZ+AMX+CHX group in comparison with the other groups. In conclusion, the concomitant use of antimicrobial chemical control (systemic and local) associated with basic periodontal therapy seems to affect more deeply the composition of the oral microbiota.

Key-words: Periodontal diseases; Oral microbiology; Therapy; Antibiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Delineamento experimental.....	29
Figura 2	Representação gráfica do <i>Minislot</i> (Immunetics, Cambridge, MA, USA) e resumo da preparação e deposição das amostras na membrana de nylon (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>).....	36
Figura 3	Representação gráfica do <i>Miniblotter</i> (Immunetics, Cambridge, MA, USA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>).....	36
Figura 4	Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras e as sondas de DNA (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>).....	38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Relação das cepas bacterianas empregadas para a 34
confeção das sondas de DNA. As espécies estão
agrupadas por complexos bacterianos.
- Tabela 2 Índice utilizado para a determinação dos níveis dos 38
microrganismos nas amostras de biofilme subgingival

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Etiologia da doença periodontal.....	10
1.2 Microbiota de outros nichos bucais.....	12
1.3 Terapia periodontal.....	14
1.3.1. Controle químico supragengival.....	15
1.3.2 Antibioticoterapia sistêmica.....	17
1.3.2.1 <i>Metronidazol associado à amoxicilina</i>	21
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVO.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Seleção dos indivíduos.....	28
4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	28
4.3 Delineamento experimental.....	29
4.4 Avaliação clínico-periodontal.....	30
4.5 Avaliação microbiológica.....	31
4.6 Procedimentos terapêuticos.....	40
4.7 Análise estatística.....	41
5 ARTIGO CIENTÍFICO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia da doença periodontal

A doença periodontal é comprovadamente uma patologia infecciosa que tem como fator etiológico microrganismos específicos presentes nos biofilmes supragengival e subgengival que, ao desencadarem diferentes formas de infecções periodontais, acarretam destruição das estruturas de proteção e sustentação dos dentes (LÖE et al. 1965; LOESCHE et al., 1985; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1994; SOCRANSKY et al., 1998).

Estudos que buscaram compreender a etiologia das infecções periodontais ocorridos na década de 60, observaram que mediante um grande acúmulo indeterminado de bactérias na superfície dental ocorriam os sinais clínicos da doença periodontal (LÖE et al., 1965; THEILADE et al., 1966; LÖE et al., 1967; RUSSEL, 1967). No estudo clássico da “gingivite experimental” em humanos realizado por Loe et al. (1965), observou-se que o acúmulo de biofilme bacteriano em superfícies dentais previamente limpas teve como efeito o desenvolvimento da inflamação nos tecidos gengivais e com o retorno da higiene oral ocorreu a reversão do estado inflamatório e, conseqüentemente, a saúde gengival. Sendo assim, foi proposta a “hipótese da placa não específica”, na qual um grande acúmulo bacteriano seria a etiologia das doenças periodontais, independente de sua composição.

Löe et al. (1978 e 1986), em seus estudos sobre a história natural da doença periodontal em humanos realizados por 15 anos com os plantadores de chá do Sri Lanka, observaram que entre os 480 indivíduos que foram avaliados neste estudo, 11% não apresentavam sinais clínicos da doença periodontal, apesar do grande acúmulo de biofilme dental presente. Estas observações, juntamente com os avanços nas técnicas de cultura microbiológica, promoveram a busca por estudos que avaliassem a composição microbiana do biofilme dental e a relação desta microbiota com os aspectos clínicos do periodonto (TANNER et al., 1979; LOESCHE et al., 1985), fundamentando a “hipótese da placa específica”, onde a alta prevalência de patógenos periodontais específicos no biofilme dental é responsável pela destruição periodontal (LOESCHE, 1976).

Mais de 500 espécies diferentes de bactérias podem ser identificadas no biofilme subgengival, porém, até o momento apenas 40 espécies são bem conhecidas e estão sabidamente organizadas em complexos bacterianos (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1994; HAFFAJEE e SOCRANSKY, 1994; SOCRANSKY et al., 1998), sendo que apenas as espécies do complexo laranja e vermelho são consideradas importantes patógenos envolvidos no processo de progressão da doença (SOCRANSKY et al., 1998).

Socransky et al. (1998) observaram a relação entre 40 espécies bacterianas presentes em 13.261 amostras de biofilme subgengival de 185 indivíduos (160 com doença periodontal crônica e 25 saudáveis) por meio do método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. A partir das análises, as espécies foram agrupadas em cinco complexos bacterianos principais: vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo. Entre estes, apenas as bactérias dos complexos vermelho e laranja são consideradas importantes patógenos envolvidos com a progressão da doença periodontal. O complexo vermelho, constituído pelas espécies *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. O complexo laranja, que parece preceder a colonização do complexo vermelho, foi dividido em 2 subgrupos: um central, constituído 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 gracilli* 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, composto por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a. O complexo amarelo é formado por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*. E, ainda, o complexo roxo, que 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* 1, *Actinomyces oris*) foram agrupadas em mais um complexo (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002). Também examinaram

as relações existentes entre certos complexos e aspectos clínicos da doença periodontal. Os parâmetros de profundidade à sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS) e nível de inserção clínica (NIC), por exemplo, mostraram relação direta com a presença das espécies do complexo vermelho e, em certa extensão, com as espécies do complexo laranja.

1.2 Microbiota de outros nichos bucais

Apesar de evidências mostrarem que o nicho primário das bactérias patogênicas é a região subgingival, elas também são encontradas em outras superfícies da cavidade bucal, além dos sítios supragengivais, (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1994; SOCRANSKY e HAFFAJEE 2002; MAGER et al., 2003a; BEIKLER et al. 2006; FAVERI et al. 2006a; SACHDEO et al. 2008) e produzem biofilme de diferentes complexidades, os quais devem ser considerados na terapia periodontal (BEIKLER, 2006). Embora o conhecimento sobre o biofilme supra e subgingival ter aumentado muito nos últimos anos (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002), pouco se sabe a respeito do biofilme formado em tecidos moles, os quais correspondem a 80% da cavidade bucal e são protegidos por diferentes tipos de epitélio, sendo o epitélio queratinizado correspondente a 50% do total da superfície e o não queratinizado, 30% (COLLINS e DAWES, 1987).

As superfícies dentárias não sofrem descamação e oferecem habitat diferente para as bactérias quando comparadas aos tecidos moles, nos quais há uma contínua descamação das células epiteliais (GIBBONS, 2009). Uma vez que as bactérias precisam aderir à superfície a fim de crescerem e desenvolverem o biofilme, os complexos bacterianos têm menos tempo para se desenvolver nos tecidos moles e, dessa forma, os mecanismos de adesão das bactérias nesses sítios devem ser diferenciados, o que pode determinar o desenvolvimento de biofilmes diferentes nas diversas superfícies da cavidade bucal (GIBBONS, 1989; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005). Assim, a seletividade da adesão bacteriana pode justificar as diferentes suscetibilidades dos vários tecidos à colonização e infecção bacteriana (GIBBONS, 1989).

O interesse sobre a microbiota de diferentes nichos da cavidade bucal tem sido despertado devido ao fato de que estes microrganismos podem estar

envolvidos com várias situações clínicas, tais como halitose e doença periodontal (BOSY et al. 1994; DE BOEVER e LOESCHE, 1995; VAN WINKELHOFF et al. 1986), além de representarem um importante reservatório para a reinfecção e recolonização dos nichos subgengivais (DANSER et al., 1996; QUIRYNEN et al., 2001; MAGER et al., 2003a). Van Winkelhoff et al., em 1986, demonstraram a colonização da superfície lingual por espiroquetas (microrganismos dotados de motilidade) e bactérias pigmentadas de negro, como a *P. intermedia*. Além disso, observaram uma associação entre o colapso periodontal e a presença desses microrganismos na língua, sugerindo que a mesma poderia servir de habitat para patógenos periodontais.

Mager et al. (2003a) coletaram amostras microbiológicas de oito superfícies (sítios subgengival e supragengival, língua, mucosa labial, gengiva inserida, assoalho da boca, mucosa jugal, palato duro) e da saliva de 225 indivíduos periodontalmente saudáveis e analisaram por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Embora todas as superfícies tenham apresentado a presença de patógenos periodontais, inclusive os microrganismos do complexo vermelho, os autores observaram diferentes perfis de colonização. Por exemplo, encontraram altas proporções de *Actinomyces* nas amostras de biofilmes supra e subgengival, já na saliva e na superfície lateral e dorso da língua, altas proporções de *V. parvula* e *Prevotella melaninogenica* foram constatadas. Dessa forma, definiram três grupos de superfícies nos quais reconheceram >75% de similaridade na colonização bacteriana, sendo: grupo A (sítios supragengival e subgengival), grupo B (dorso da língua, saliva e lateral da língua) e grupo C (palato duro, gengiva inserida, mucosa bucal, mucosa labial vestibular, assoalho da boca). Além disso, consideraram que os grupos B e C apresentaram mais semelhanças entre si do que os grupos C e A.

Danser et al. (1996) estudaram as alterações ocorridas após a raspagem e alisamento radicular (RAR) e cirurgia periodontal nos níveis de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* nos tecidos moles bucais. Embora a RAR tenha atingido resultados clínicos positivos e diminuído a prevalência destes patógenos no ambiente subgengival, não foram observadas alterações significativas na prevalência dessas espécies nos tecidos moles. Os autores sugeriram que os tecidos moles bucais podem servir como reservatório para uma recolonização destes patógenos no ambiente subgengival.

Além dos tecidos moles, todas as superfícies da cavidade bucal (exceto os sítios subgingivais) são banhadas pela saliva que fornece nutrientes, remove resíduos e atua como veículo para o transporte de bactérias entre os diversos sítios, sendo essencial para a manutenção de quase todos os biofilmes intra bucais ao viabilizar um ambiente propício para o seu desenvolvimento (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005; TELLES et al, 2012). Esta é uma possível explicação para a grande quantidade de bactérias encontradas na saliva, uma vez que nela obtém suporte para sua multiplicação. Por outro lado, a saliva pode remover ou limitar bactérias em tecidos duros e moles, e talvez influenciar a composição da microbiota bucal (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005). Em estudo recente, Kinney et al. (2011) sugeriram que marcadores salivares oferecem potencial para a previsão da progressão ou da estabilização da doença periodontal em grandes populações de pacientes.

Desta forma, os tecidos moles e a saliva são fatores importantes a serem investigados na doença periodontal, bem como durante o tratamento, visto que este deve ser baseado na alteração da microbiota patogênica para uma microbiota compatível com a saúde. Assim, amostras microbiológicas apenas da região subgingival podem não refletir a colonização intrabucal e, portanto, subestimar a detecção e a frequência de um patógeno específico (BEIKLER, 2006).

1.3 Terapia periodontal

O procedimento de RAR é referenciado como o “padrão ouro” na terapia periodontal, por desorganizar e remover grande quantidade de bactérias, ainda que de forma inespecífica. Entretanto, a resposta em longo prazo alcançada com o tratamento de RAR (HAFFAJEE et al. 1997; CUGINI et al. 2000; DARBY et al. 2001; TELLES, HAFFAJEE e SOCRANSKI, 2006) não é suficiente para controlar a progressão da doença periodontal e modificar profundamente o perfil bacteriano patogênico para um perfil relacionado à saúde, principalmente em casos de doenças mais severas (HAFFAJEE et al. 1997; CUGINI et al. 2000; CARVALHO et al. 2005; MATARAZZO et al. 2008). Apesar de remover depósitos duros e moles da superfície do dente (supra e subgingival) apresenta limitações, como na presença de furcas e bolsas profundas. Estudos têm demonstrado que o tratamento com RAR reduz a quantidade de espécies subgingivais nos sítios, mas não promove a estabilidade

em longo prazo dos benefícios clínicos adquiridos inicialmente (DARBY et al. 2001; TELES et al. 2006, XIMENEZ-FYVIE et al. 2000a, CUGINI et al. 2000, CARVALHO 2005). Além disso, a RAR sozinha tem efeito limitado em algumas espécies patogênicas (HAFFAJEE et al. 1997; CUGINI et al. 2000; COLOMBO et al. 2005, FAVERI et al. 2006a).

Portanto, outras terapias coadjuvantes à RAR, como o controle sistemático profissional do biofilme supragengival, o controle químico com antimicrobianos locais e o uso de antibióticos sistêmicos têm sido propostos com o objetivo de potencializar os resultados clínicos e microbiológicos desta forma de terapia (FERES et al., 1999a e 2001; XIMENEZ-FYVIE et al. 2000b, CARVALHO et al. 2004 e 2005, FAVERI, 2005; MESTNIK et al., 2010; SILVA et al., 2011).

O efeito do controle do biofilme supragengival na composição do biofilme subgengival foi avaliada por Ximénez-Fyvie et al. (2000c) por meio de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. O controle do biofilme supragengival profissional foi realizado semanalmente em 18 pacientes com doença periodontal durante 1 ano. Os autores observaram diminuição na contagem média de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, tanto no biofilme supragengival quanto no subgengival, resultando em perfil microbiano semelhante ao da saúde periodontal. Os melhores efeitos ocorreram nos primeiros 3 meses, mantidos até 9 meses após o término da terapia.

1.3.1 Controle químico do biofilme supragengival

O controle mecânico do biofilme com a higiene oral realizada pelo paciente pode ser potencializado com o uso de substâncias incorporadas aos enxaguatórios bucais, atuando como um controle químico local. O digluconato de clorexidina (CLX) é o composto mais utilizado em estudos clínicos e experimentais por suas propriedades químicas e antimicrobianas. É um anti-séptico com efeito antimicrobiano tanto em bactérias gram-negativas quanto em gram-positivas, fungos e alguns vírus. A combinação de enxaguatório com digluconato de clorexidina (0,12%) e RAR obtém resultados benéficos, podendo ajudar na redução do número de patógenos em diferentes sítios intra bucais (língua, amídalas, mucosa, palato duro e mole) e saliva (EATON et al., 1997; FAVERI et al., 2006b; SEKINO et al., 2003).

Eaton et al. (1997) observaram os efeitos do uso de bochechos com clorexidina a 0,12% no controle do biofilme dental e da inflamação gengival em 98 indivíduos com gengivite. Os indivíduos que fizeram os bochechos com clorexidina durante 12 semanas tiveram uma redução significativa nos índices de placa e gengivite, quando comparados aos indivíduos que fizeram bochechos com placebo.

Sekino et al. (2003) observaram o efeito de diferentes terapias com bochecho com clorexidina 0,2% e higienização da língua com clorexidina em gel 0,1% na quantidade de bactérias da saliva e na formação do biofilme em indivíduos com gengivite e concluíram que o uso diário de clorexidina como coadjuvante ao controle mecânico reduziu acentuadamente o número de microrganismos detectáveis na saliva. Sugeriram que o número de bactérias na saliva pode ter influenciado a formação do biofilme na fase inicial do tratamento.

Faveri et al. (2006b) avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos da RAR somente ou em combinação com profilaxia profissional e/ou bochecho com digluconato de clorexidina 0,12% em 57 indivíduos portadores de doença periodontal crônica. Observaram que a associação do controle de biofilme supragengival à RAR promoveu benefícios clínicos em relação à RAR somente, sendo esse efeito mais evidente nas bolsas intermediárias e profundas de indivíduos que utilizaram clorexidina,. Ressaltaram que o bochecho com clorexidina promoveu benefícios microbiológicos adicionais e atribuíram tais resultados à manutenção do baixo nível de patógenos no biofilme supragengival, além de outras superfícies como amígdalas, língua, saliva e mucosa jugal.

Feres et al. (2009) compararam os efeitos clínicos e microbiológicos da RAR em associação ao controle profissional mecânico e ao controle químico por meio de bochecho com CLX no tratamento da periodontite crônica. Sessenta indivíduos foram acompanhados durante 6 meses pós-terapia. Os autores concluíram que o controle de biofilme realizado durante e após a RAR influenciou de maneira positiva os resultados clínicos, porém os melhores benefícios microbiológicos e clínicos foram alcançados com a associação da CLX.

O uso de anti-sépticos durante a RAR e na fase de manutenção pode resultar em grande aumento na proporção de espécies *Actinomyces* compatíveis com a saúde, aos 3 meses após a terapia e redução de patógenos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticolla*) (TELES et al., 2006; FERES et al., 2009; MESTNIK et al. 2010). Dentro deste contexto, Faveri et al. (2005 e 2006b)

sugerem que o controle do biofilme supragengival como forma efetiva de terapia periodontal durante e logo após a RAR pode beneficiar clínica e microbiologicamente sítios subgengivais com bolsas rasas e intermediárias, bem como sítios profundos.

1.3.2 Antibioticoterapia sistêmica

O objetivo principal do tratamento periodontal é evitar a progressão da doença e devolver a saúde através da modificação do meio ambiente supra e subgengival, promovendo uma alteração da microbiota ao reduzir ou eliminar bactérias patogênicas, favorecendo a recolonização dos sítios tratados por complexos bacterianos compatíveis com a saúde periodontal e, conseqüentemente, melhorando os aspectos clínicos. O tratamento não cirúrgico apenas com RAR é inespecífico, reduz a quantidade de bactérias, mas nem sempre consegue promover uma mudança tão grande a ponto de manter a estabilidade em longo prazo dos resultados obtidos logo após a remoção mecânica do biofilme (HAFFAJEE et al., 1997; CUGINI et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; MATARAZZO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009). Em alguns pacientes, a RAR não alcança resultados positivos por vários motivos (HERRERA et al., 2002). Entre as limitações da RAR, estão as regiões apicais de bolsas profundas, regiões de furca em molares, túbulos dentinários, sítios em tecidos moles e ainda, a inespecificidade do tratamento.

As limitações da RAR, a eventual invasão tecidual de certos patógenos periodontais e a capacidade dos antibióticos sistêmicos de terem mecanismo de ação sobre todas as superfícies e fluidos da cavidade bucal levaram a utilização de terapias coadjuvantes (como a associação com agentes antimicrobianos) à terapia mecânica, no tratamento das diferentes formas da doença periodontal, a fim de potencializar os resultados clínicos e microbiológicos do tratamento (van WINKELHOFF et al., 1997; FERES et al., 1999a, 1999b, 1999c; CUGINI et al., 2000; GONÇALVES, 2000; XIMENEZ-FYVIE et al. 2000b; HAFFAJEE et al. 2003; SLOTS et al., 2004; CARVALHO et al. 2004 e 2005; FAVERI et al. 2006b; MOEINTAGHAVI et al., 2007; SILVA et al., 2011; FERES et al., 2012)

O primeiro antibiótico foi identificado casualmente em 1928, por Alexander Fleming, médico microbiologista, quando trabalhava com variantes de estafilococos no laboratório do St Mary's Hospital em Londres. Observou que um fungo ao

contaminar uma de suas placas de cultura, promovia uma inibição no crescimento bacteriano. Fleming isolou o fungo em cultura pura e demonstrou que ele produzia uma substância antibacteriana, e foi denominada penicilina, já que esse fungo pertencia ao gênero *Penicillium*. Florey e Chain et al. na década de 40 deram continuidade aos estudos sobre a penicilina com fins terapêuticos e seus efeitos antibacterianos foram analisados, iniciando assim a “era dos antibióticos” (FLOREY, 1945; CHAIN et al., 1948). Somente nos anos 70, Hare e pesquisadores demonstraram que a penicilina possuía poderosas propriedades quimioterápicas em camundongos infectados e que era atóxica (HARE, 1970).

Os estudos clínicos para avaliar a ação dos antimicrobianos nas doenças periodontais iniciaram-se na década de 70, quando Slots et al. (1979) observaram a ação benéfica da tetraciclina hidrocloreídrica no tratamento de periodontite agressiva em indivíduos jovens, uma vez que obtiveram resposta positiva deste medicamento na microbiota subgengival e na inflamação gengival, além de reparo do osso alveolar em várias bolsas infraósseas. A partir de então, outros estudos também relataram benefícios clínicos e microbiológicos com a utilização das tetraciclinas no tratamento das periodontites (LINDHE, 1981; LINDHE, 1984; NOVAK et al., 1988; 1991).

Diversos tipos de antibióticos sistêmicos tem sido testados na terapia periodontal como coadjuvantes da remoção mecânica do biofilme (LEKOVIC et al., 1982; LOESCHE et al., 1984; FERES et al., 1999a,b,c; SLOTS, 2002; FAVERI, 2005). Ao invés do uso de somente um antibiótico, com espectro restrito, a terapia com associação com antibióticos sistêmicos tem sido sugerida por vários autores, uma vez que a microbiota subgengival na doença periodontal avançada é complexa e geralmente contem espécies com diferentes suscetibilidades antimicrobianas (van WINKELHOLFF et al., 1989; van WIKENLHOLFF et al., 1996; BERGLUNDH et al., 1998, CARVALHO et al., 2004 e 2005).

Atualmente a associação de amoxicilina (AMX) e metronidazol (MTZ) pode ser considerada a combinação de antibióticos mais usada no tratamento das periodontites. A AMX é uma penicilina. Todas as penicilinas possuem o mesmo mecanismo básico de ação, isto é, inibem as enzimas responsáveis pela ligação cruzada dos polímeros de peptidoglicano durante o último estágio da síntese da parede celular, resultando na inibição da formação de uma parede celular intacta e completa, e produzindo uma célula bacteriana instável na osmolaridade dos líquidos

orgânicos. As penicilinas constituem-se na primeira opção como coadjuvantes no tratamento das infecções odontológicas leves e moderadas. A AMX tem um largo espectro de atividade contra espécies anaeróbias estritas e facultativas subgingivais (WALKER et al., 1985; KULIK et al., 2008). Atua sobre microrganismos cocos e bacilos Gram-negativos devido à capacidade de penetrar nas barreiras lipídicas e na parede celular mais complexa destes microrganismos, agindo sobre as enzimas situadas na parte externa da membrana celular bacteriana lipoprotéica (MONTGOMERY, 2000).

O MTZ é uma droga sintética, derivada do nitroimidazol, com atividade bactericida e protozoaricida. O MTZ penetra nas células bacterianas por difusão passiva e gera metabólitos altamente tóxicos que interagem com o DNA e outras macromoléculas causando a morte celular. Apesar de penetrar em todas as células bacterianas somente porção nitro da droga é enzimaticamente reduzida, gerando a forma ativa da droga nas bactérias anaeróbias estritas. O MTZ é geralmente bem tolerado, mas alguns efeitos adversos podem ocorrer, como náusea, dor abdominal, estomatite, língua saburrosa negra e gosto metálico na boca (MONTGOMERY et al., 2000).

O MTZ foi utilizado na odontologia inicialmente por Shinn (1962), após observar um alívio casual nos sintomas da gengivite ulcerativa necrosante (GUN) em uma mulher que utilizou o MTZ para o tratamento de tricomoníase vaginal. A partir de então esse medicamento começou a ser mais utilizado para o tratamento da GUN (LOESCHE et al., 1982).

O espectro de ação do MTZ é especialmente direcionado aos anaeróbios estritos, como os três patógenos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*), sendo uma vantagem no tratamento da doença periodontal crônica. Por isso, os resultados clínicos e microbiológicos de muitos estudos que associaram esse antibiótico à RAR mostraram melhores respostas do que os obtidos somente com a terapia mecânica (LOESCHE et al., 1981; LOESCHE et al., 1984; WINKEL et al., 1997; FERES et al., 2001; HAFFAJEE et al., 2003 e 2007 ; CARVALHO et al., 2004, 2005). Loesche e colaboradores, entre 1979 a 2005, realizaram uma sequência de estudos para avaliar a redução na necessidade de se realizar procedimento cirúrgico no tratamento de periodontites quando os indivíduos eram tratados com MTZ sistêmico. Observaram que o uso do MTZ sistêmico com dosagem de 750mg a 1 g por dia durante 14 dias, associado à terapia mecânica,

diminuiu em até 93% o número de dentes com necessidade de tratamento cirúrgico, e até 81% o número de dentes com indicação de extração por doença periodontal (LOESCHE et al., 1979, 1987, 1991, 1992, 1996, 2002 e 2005). Estudos sugerem que o MTZ é mais efetivo em sítios profundos do que em sítios rasos (LOESCHE et al., 1981; LOESCHE et al., LOESCHE et al., 1983; LOESCHE et al., 1984; CARVALHO et al., 2004; HAFFAJEE et al., 2007).

Alguns estudos também avaliaram as alterações na composição da microbiota subgengival após a utilização do MTZ em indivíduos com periodontite crônica (FERES et al., 2001; CARVALHO et al., 2005). Feres et al. (2001) examinaram as alterações ocorridas nos parâmetros clínicos e microbiológicos após o tratamento de indivíduos com periodontite crônica que receberam RAR associada ao MTZ (250mg 3 x dia) ou à AMX (500mg 3 x dia), ambos por 14 dias. Observaram 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*. Observaram também a redução na proporção dos *Actinomyces*, que são espécies relacionadas à saúde periodontal.

Pahkla et al. (2005) avaliaram a concentração do MTZ sistêmico (500mg, 2 ou 3 x dia, por pelo menos 2 dias) no plasma, saliva e fluido gengival, em indivíduos com periodontite crônica generalizada avançada e encontraram boa penetração de MTZ no fluido gengival e na saliva. As concentrações observadas no fluido eram similares às observadas no plasma, sugerindo uma farmacocinética favorável desse medicamento para sua utilização no tratamento da doença periodontal. Haffajee et al. (2007 e 2008) também observaram melhoras clínicas e microbiológicas em indivíduos com periodontite crônica que receberam MTZ ou azitromicina sistêmicos, superiores às observadas com RAR somente. Os benefícios dos antibióticos também foram maiores em sítios profundos.

1.3.2.1 Metronidazol associado à amoxicilina

As características benéficas individuais da AMX e do MTZ e a possível ação farmacológica complementar para a cura da doença periodontal tem levado pesquisadores a associar ambas as medicações como uma terapia adjunta a terapia mecânica, com o objetivo de suprimir ou eliminar os patógenos envolvidos com a doença e obter melhores resultados em longo prazo.

A associação do MTZ e da AMX à terapia mecânica foi sugerida pela primeira vez por van Winkelhoff et al. (1989 e 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 tratados. Após esses estudos iniciais, diversos autores avaliaram o efeito dessa combinação de terapias no tratamento da periodontite crônica (FLEMMIG et al., 1998; BERGLUNDH et al., 1998; WINKEL et al., 2001; ROONEY et al., 2002; HERRERA et al., 2002; MOMBELLI et al., 2005). Estudos clínicos controlados mais recentes sugerem que esse protocolo terapêutico também possui efeitos benéficos clínicos e na composição da microbiota subgengival em pacientes fumantes (PAHKLA et al., 2006; MATARAZZO et al., 2008). Matarazzo et al (2008) analisaram indivíduos fumantes portadores de periodontite crônica e observaram que aqueles que receberam RAR associada ao MTZ (400mg, 3 x dia por 14 dias) e à AMX (500mg, 3 x dia por 14 dias) mostraram a maior redução em contagem e proporção 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.

A terapia de MTZ e AMX também foi utilizada isoladamente na ausência de tratamento mecânico numa série de estudos realizados por López e colaboradores. Em 1998, López et al. avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos da AMX (500mg, 3x/dia, 7 dias) e do MTZ (250mg, 3x/dia, 7 dias) sistêmicos como uma única terapia, durante uma semana, em indivíduos portadores de doença periodontal crônica moderada e avançada. Os indivíduos do grupo controle receberam medicação placebo. Foram realizadas avaliações clínicas e microbiológicas, por meio de identificação do DNA bacteriano, inicial, 2 e 4 meses após terapia. O grupo teste mostrou significativa redução de sítios com *P. gingivalis*

e *P. intermedia* em relação ao grupo controle, mostrando que terapia antibiótica proposta, usada isoladamente, altera a proporção de alguns microrganismos subgengivais e promove benefícios clínicos nas condições periodontais. Com isso os autores mostraram que a terapia antibiótica, mesmo sem a terapia mecânica, altera os níveis de algumas espécies bacterianas subgengivais levando às melhoras clínicas observadas.

López et al. (2000), seguindo a mesma linha de pesquisa, realizaram estudo semelhante, porém com algumas diferenças em relação à publicação anterior: o regime antibiótico foi repetido após 4 e 8 meses e realizaram apenas avaliações clínicas. Os indivíduos foram aleatorizados em dois grupos: teste (MTZ-250mg, 3x/dia, 7 dias - e AMX - 500mg, 3x/dia, 7 dias) sistêmicos como terapia única, e o grupo controle (medicação placebo). Os resultados demonstraram que após 2 meses e nas avaliações posteriores, o grupo teste mostrou melhoras clínicas significantes, enquanto o grupo controle demonstrou uma piora progressiva dos parâmetros periodontais. Após um ano, os indivíduos do grupo teste mostraram significativo ganho de inserção de 0,43mm ($p=0,005$), diminuição de sítios ativos ($p<0,03$), aumento de sítios que ganharam inserção clínica ($p<0,01$), redução de profundidade de sondagem ($p<0,00006$) e diminuição da porcentagem de sangramento à sondagem ($p<0,0005$). Os sítios com perda de inserção ≥ 2 mm em avaliações sucessivas e abcesso periodontal foram observados somente no grupo controle. Em 2006, os mesmos autores também avaliaram as alterações clínicas e microbiológicas com a utilização de MTZ (250mg, 3 x dia por 7 dias) e AMX (500mg, 3 x dia por 7 dias) sem RAR (grupo teste) no tratamento da periodontite crônica, comparados ao grupo controle (apenas RAR). Utilizaram a técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para avaliar os níveis e proporções de 40 espécies bacterianas na composição da microbiota subgengival, realizados no início, 3, 6, 9 e 12 meses. Desta vez, observaram que as duas terapias promoveram melhoras, e que as alterações nos parâmetros clínicos e microbiológicos foram semelhantes entre os grupos teste e controle (LÓPEZ et al., 2006).

Recentemente, Mestnik et al. (2010) avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos da associação entre RAR, MTZ e AMX no tratamento da periodontite agressiva no perfil microbiológico supra e subgengival durante 3 meses. A combinação de RAR com MTZ e AMX sistêmicos resultou em benefícios clínicos significantes em relação à RAR sozinha e observaram uma significativa alteração

microbiológica com a associação antibiótica, especialmente nas espécies do complexo vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis* and *T. denticola*), drasticamente reduzidas em número. Ainda, houve um aumento na proporção de *Actinomyces* (complexo azul) e espécies benéficas dos complexos roxo e amarelo.

Em recente estudo, Silva et al. (2011) compararam os efeitos do MTZ e da associação com MTZ e AMX como terapia adjunta no tratamento da doença periodontal crônica em 57 indivíduos, divididos em 3 grupos: apenas RAR; RAR e MTZ (400mg – 14 dias); e RAR, MTZ (400mg) e AMX (500mg) durante 14 dias. Realizaram avaliações clínicas e microbiológicas (*checkerboard DNA-DNA hybridization*) no início do tratamento e após 3 meses e observaram que o grupo tratado com associação antibiótica (MTZ e AMX) mostrou melhores resultados clínicos em sítios intermediários e profundos aos 3 meses. O tratamento com RAR, AMX e MTZ foi o único capaz de reduzir os níveis e proporções de todos os patógenos do complexo vermelho, evidenciando uma alteração altamente benéfica do perfil microbiológico em comparação aos resultados obtidos apenas com RAR e consideraram que a associação apenas com o MTZ proporcionou melhoras em relação ao tratamento com RAR, porém menos evidentes.

Goodson et al. (2012) compararam os efeitos da RAR como terapia única ou associada à antibioticoterapia local com fibra de tetraciclina, ao MTZ + AMX, ou ao tratamento cirúrgico. 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 ≥ 5 mm, 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 ≥ 5 mm e SS. Os autores observaram que aos 2 anos pós-terapia os melhores resultados clínicos foram obtidos quando a RAR estava associada a outras terapias. Aparentemente a associação de mais de duas terapias não levou a benefícios sinérgicos e os melhores benefícios foram observados quando a RAR foi associada à antibioticoterapia sistêmica, associada ou não a tetraciclina local ou ao tratamento cirúrgico.

Ainda em 2012, FERES et al. selecionaram 118 indivíduos com periodontite crônica generalizada que receberam RAR somente ou com MTZ (400 mg /3x ao dia) ou MTZ+AMX (500 mg / 3x ao dia) durante 14 dias. Realizaram avaliações clínicas aos 3, 6 e 12 meses pós-terapia. Os dois grupos que receberam

antibióticos apresentaram menor número de sítios com PS \geq 5 mm pós-terapia. A análise de regressão logística mostrou que os antibióticos foram os únicos preditores significativos de indivíduos com \leq 4 sítios com PS \geq 5 mm em 1 ano. Outro dado importante é que a frequência de eventos adversos não diferiu entre os dois tratamentos com antibióticos. Concluíram que o tratamento de periodontite crônica é significativamente melhorado pela associação do MTZ+AMX ou MTZ.

Apesar da obtenção de resultados benéficos quando o MTZ e a AMX são utilizados na ausência de terapia mecânica, ressalta-se que o principal objetivo da utilização dos antibióticos sistêmicos no tratamento periodontal é potencializar os efeitos da RAR e não substituir essa terapia. Sendo assim, a maior parte dos estudos clínicos controlados utiliza a associação das terapias mecânicas e químicas.

A dosagem e a duração adequadas para o MTZ somente ou em combinação com a AMX no tratamento das doenças periodontais ainda não foram determinadas. No entanto, a maioria dos estudos propõem uma dosagem entre 200 e 400mg, 3 x dia , por 7 a 14 dias (LOESCHE et al., 1984; 1992; 2002; 2005; PALMER et al., 1998; 1999; FERES et al., 2001; CARVALHO et al., 2004; 2005; HAFFAJEE et al., 2007; 2008; GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIU et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

O biofilme supragengival e de outros sítios bucais (saliva, língua, mucosa, amídalas) tem um papel possivelmente importante na formação e desenvolvimento do biofilme subgengival, pois podem atuar como fonte para re-infecção e recolonização bacteriana após o tratamento periodontal (DE BOEVER e LOESCHE 1995; COLOMBO et al. 1998; QUIRYNEN et al. 2001; MAGER et al. 2003a, BEIKLER et al. 2006; BOSY et al. 1994; FAVERI et al. 2006; SACHDEO et al. 2008; GIBBONS, 2009; TELES et al. 2012). A maior compreensão sobre a composição da microbiota das superfícies orais poderá contribuir para que outros estudos sejam realizados no sentido de encontrarem terapias periodontais que alcancem não apenas a redução dos microrganismos periodontopatogênicos do biofilme subgengival, mas também de outros nichos que podem abrigar esta microbiota e contribuir para a recolonização subgengival.

Nesse contexto, conhecendo a especificidade do biofilme supra e subgengival, o controle da doença periodontal deve ser sustentado na supressão ou diminuição dos microrganismos patogênicos e, ao mesmo tempo, no favorecimento da proliferação de microrganismos compatíveis com a saúde periodontal (SLOTS et al., 1979; LOESCHE et al., 1984; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002; TELLES, HAFFAJEE, SOCRANSKY, 2006). Esse conceito tem gerado novos estudos que buscam o desenvolvimento de formas terapêuticas mais específicas para o tratamento das doenças periodontais.

Diversos autores mostram benefícios clínicos e microbiológicos adicionais do tratamento com antibióticos em pacientes periodontais, principalmente com a associação de MTZ e AMX (HERRERA, 2002; MATARAZZO et al., 2008; SILVA et al., 2011; MESTNIK et al., 2012; FERES et al., 2012). Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos da RAR associada aos antibióticos sistêmicos e ao enxaguatório bucal na alteração da microbiota do biofilme subgengival, supragengival e em diferentes nichos da cavidade bucal, como língua, saliva e mucosa jugal, bem como sua influência na recolonização bacteriana após a terapia periodontal.

Considerando que pouco ainda se sabe sobre as alterações microbiológicas ocorridas em outras superfícies da cavidade bucal após o término da terapia periodontal básica, novos estudos são necessários para que possíveis

mudanças na microbiota bucal possam ser notadas após a associação da RAR ao controle químico dos biofilmes supra e subgingivais.

3 OBJETIVO

Avaliar as alterações microbiológicas promovidas pela terapia de RAR associada à antibioticoterapia sistêmica (MTZ + AMX), com ou sem o controle químico do biofilme supragengival por meio de bochecho com CLX na composição dos biofilmes subgengival, supragengival, no dorso da língua, na saliva e na mucosa, em indivíduos com periodontite crônica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos indivíduos

A seleção de indivíduos foi realizada por dois mestrandos em Odontologia, da área de concentração em periodontia, sob supervisão dos professores da disciplina, após a apreciação e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos (UnG). Compareceram à Clínica Odontológica da UnG aproximadamente 400 indivíduos e, após a realização da triagem, 60 indivíduos portadores de periodontite crônica foram incluídos nesse estudo. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e terapias a serem utilizadas. A participação na pesquisa foi voluntária e os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo com a Resolução nº 196/96 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

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

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

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos.
- Gestantes ou lactantes;

- Histórico de tratamento periodontal nos últimos seis meses;
- Histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- Uso prolongado de medicação antiinflamatória;
- Histórico de uso de antissépticos orais nos últimos seis meses;
- Doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro (diabetes, alterações sanguíneas, doenças auto-imunes etc) ou exigisse medicação profilática ao tratamento (prótese de válvulas cardíacas);
- Relato de alergia ao MTZ e/ou à penicilina e/ou à CLX;
- Reabilitações estéticas extensas.

4.3 Delineamento experimental

No início deste estudo piloto, cego, aleatorizado, placebo controlado, todos os indivíduos (n=60) foram submetidos à anamnese e exame clínico periodontal. Em seguida, um pesquisador, não envolvido diretamente no estudo, fez a distribuição aleatória dos indivíduos por meio de uma tabela de números equiprováveis nos seguintes grupos terapêuticos (n=15):

- **Grupo controle (C): RAR + MTZ placebo + AMX placebo, 3 vezes ao dia durante 14 dias + bochecho com CLX placebo 2 vezes ao dia, durante 60 dias;**

- **Grupo teste 1 (T₁): RAR + bochecho com CLX 0,12% 2 vezes ao dia, durante 60 dias + MTZ placebo e AMX placebo, 3 vezes ao dia, durante 14 dias;**

- **Grupo teste 2 (T₂): RAR + MTZ (400mg) e AMX (500mg), 3 vezes ao dia, durante 14 dias + bochecho com CLX placebo 2 vezes ao dia, durante 60 dias;**

- **Grupo teste 3 (T₃): RAR + MTZ (400mg) e AMX (500mg), 3 vezes ao dia, durante 14 dias + bochecho com CLX 0,12% 2 vezes ao dia, durante 60 dias.**

A terapia com antibióticos sistêmicos (MTZ, AMX e placebos) e o controle químico local (CLX e placebo) foram iniciados no mesmo dia de início da terapia básica de RAR, realizada em seis sessões e finalizada em 14 dias. A medicação sistêmica foi administrada por 14 dias e o controle químico utilizado por 45 dias após o término dos procedimentos de RAR. As avaliações microbiológicas foram repetidas aos 45, 90 e 180 dias. O protocolo experimental está apresentado na Figura 1.

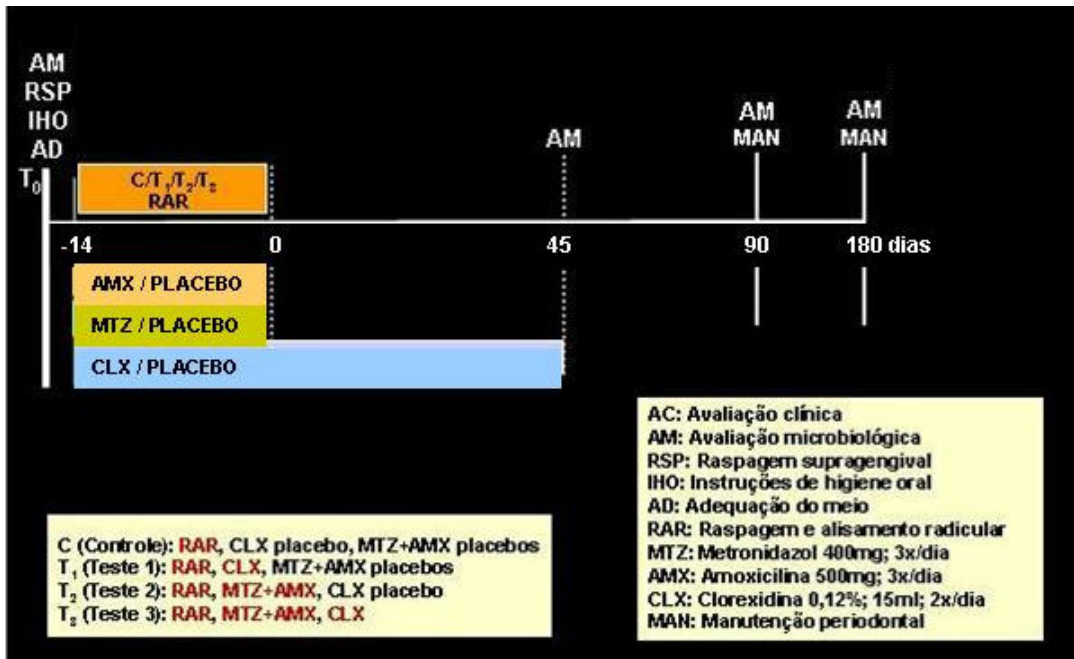


Figura 1. Delineamento experimental.

4.4 Avaliação clínico-periodontal

O exame clínico-periodontal foi efetuado no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo. Dois examinadores participaram de um exercício de calibração com o objetivo de conseguir a máxima reprodutibilidade nas medições realizadas por cada um deles e entre eles, e o erro médio padrão para os parâmetros clínicos PS e NIC foi calculado. O erro padrão da medida (e.p.m) e o erro médio percentual (e.m.p) variaram entre 0,09mm-0,31mm e 2,0%-3,79%, respectivamente. Para as variáveis categóricas a média do nível de concordância para cada examinador e entre eles foi superior a 92% (Teste Kappa). Em cada indivíduo participante, um examinador realizava todas as avaliações clínicas e, o outro examinador realizava todo o tratamento. A coleta das amostras microbiológicas foi realizada por um terceiro examinador.

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

- Índice de Placa Visível (IPV) (AINAMO & BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa supragengival visível;
- Índice de Sangramento Gengival (ISG) (AINAMO & BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento da gengiva marginal, após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival;
- Profundidade de Sondagem (PS): distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;
- Nível de Inserção Clínica (NIC): distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;
- Sangramento à Sondagem (SS): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento, após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada;
- Supuração (SUP): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de SUP espontânea ou após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada.

4.5 Avaliação microbiológica

4.5.1 Seleção dos sítios para análise

As amostras de biofilme subgengivais, supragengivais, saliva, mucosa jugal e língua foram coletadas no início do estudo, 45, 90 e 180 dias pós-terapia. Foram selecionados dois sítios em cada voluntário, sendo um superior e outro inferior, contralaterais, com PS entre 5-7mm e NIC entre 5-10mm. Quando o indivíduo apresentava vários sítios com tais características foi realizado um sorteio para definir o sítio. As amostras de biofilme supragengival foram coletadas dos mesmos dois sítios previamente selecionados para a coleta subgengival.

Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados.

4.5.2 Coleta das amostras

As amostras de saliva, mucosa jugal, saburra lingual e biofilme supra- e subgingival foram coletadas dos sítios previamente selecionados em cada um dos indivíduos, e colocadas separadamente em tubos de Eppendorf contendo 0,15 ml 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). Esta ordem de coleta foi respeitada a fim de não comprometer a composição da microbiota do nicho bucal subsequente.

- Saliva: as amostras de saliva não estimulada foram coletadas em tubos de ensaio contendo pérolas de vidro estéreis, durante 1 minuto. A seguir as amostras foram homogeneizadas e uma alíquota de 50ul foi depositada no tubo contendo tampão TE.
- Mucosa Jugal: as amostras da mucosa jugal foram coletadas por meio de “microbrushes” que foram friccionados na mucosa jugal (previamente seca e isolada relativamente) durante aproximadamente 30 segundos a fim de buscar a aderência dos microrganismos às cerdas da micro-escova. O cabo de cada micro-escova foi cortado e a parte das cerdas foi depositada no tubo contendo tampão TE.
- Saburra Lingual: as amostras de saburra lingual foram coletadas por meio de curetas de Gracey 11-12 estéreis. As curetas foram posicionadas na porção posterior do dorso lingual e tracionadas para a região anterior numa superfície de 10mm. As amostras foram depositada nos tubos contendo tampão TE.
- Biofilme Supragengival: Após o isolamento da área com rolos de algodão, as amostras de biofilme supragengival foram coletadas, separadamente, por meio de curetas de Gracey estéreis, e depositadas nos tubos contendo tampão TE.
- Biofilme Subgingival: Após a remoção de cálculo e biofilme supragengivais, as amostras de biofilme subgingival foram coletadas nos mesmos sítios testes 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 nos tubos contendo tampão TE.

A cada tubo plástico individual contendo amostra e solução tampão TE foram acrescentados 100µL de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Esses tubos plásticos foram previamente identificados com o código do indivíduo, data e sítio. Em seguida, foram armazenados sob refrigeração a -20°C até as amostras fossem analisadas por meio da técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 cepas bacterianas no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da UnG.

4.5.3 Cepas bacterianas e condições de crescimento

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

4.5.4 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. Em seguida, as cepas gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias gram-positivas foram lisadas em 150 μ L de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0).

O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 μ g do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg e Vogelstein (1983). As espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1994; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005).

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 e HAFFAJEE, 2002).

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

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

4.5.5 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 contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA – Figura 2) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente (SOCRANSKY et al., 1994; HAFFAJEE et al., 1997). A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) (1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0, 25mM de fosfato de sódio (Na_2HPO_4 , Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA – Figura 3) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 ng/mL, em 130 μL de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de Na_2HPO_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°C.

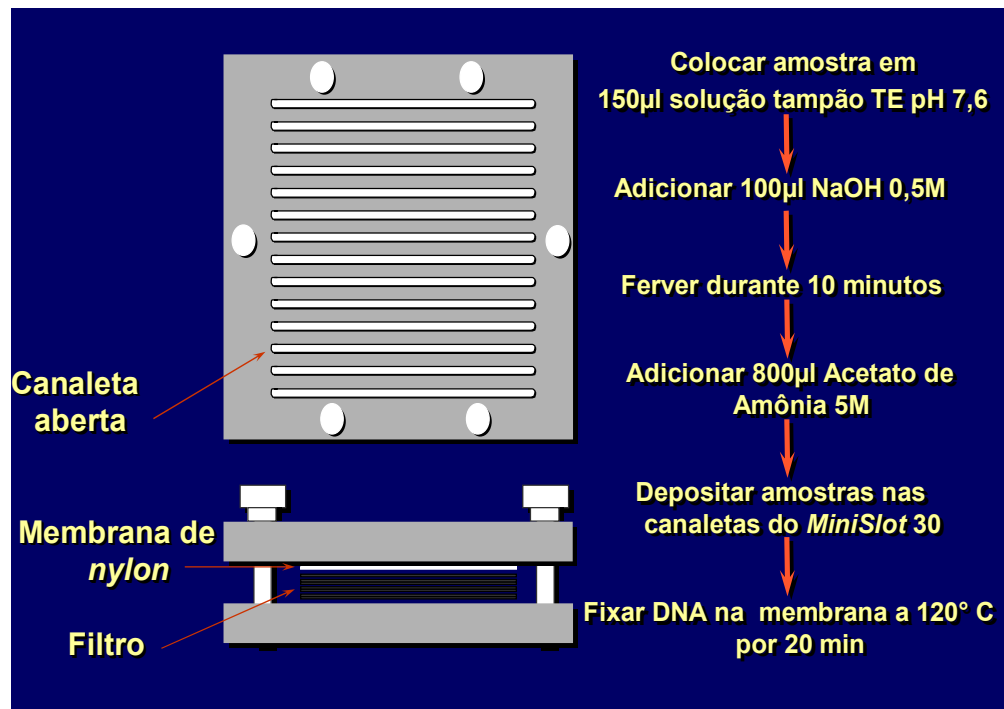


Figura 2. Representação gráfica do Minislot 30 (Immuntetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras na membrana de nylon (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

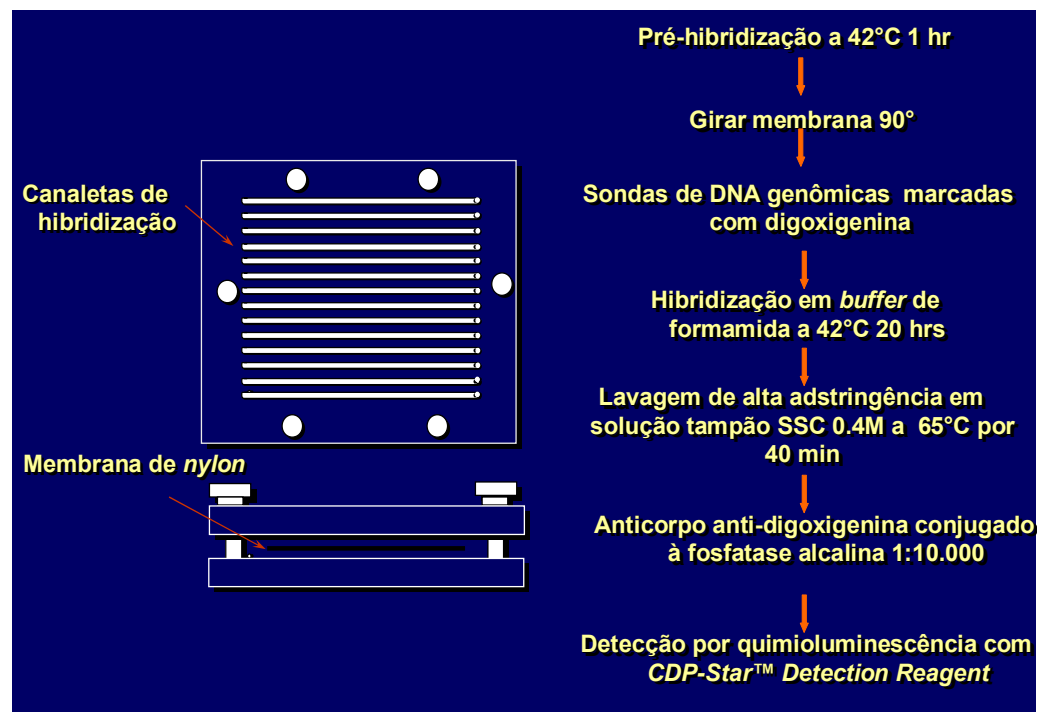


Figura 3. Representação gráfica do *Miniblotter* 45 (Immuntetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e deteção das espécies bacterianas presentes nas amostras (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

4.5.6 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 Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C₄H₄O₄, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

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

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10⁵ e 10⁶ 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 10⁵ células; 2 equivaliu a 10⁵ células; 3 entre 10⁵ e 10⁶ células; 4 a aproximadamente 10⁶ células e 5 mais de 10⁶ células (Tabela 2). Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas.

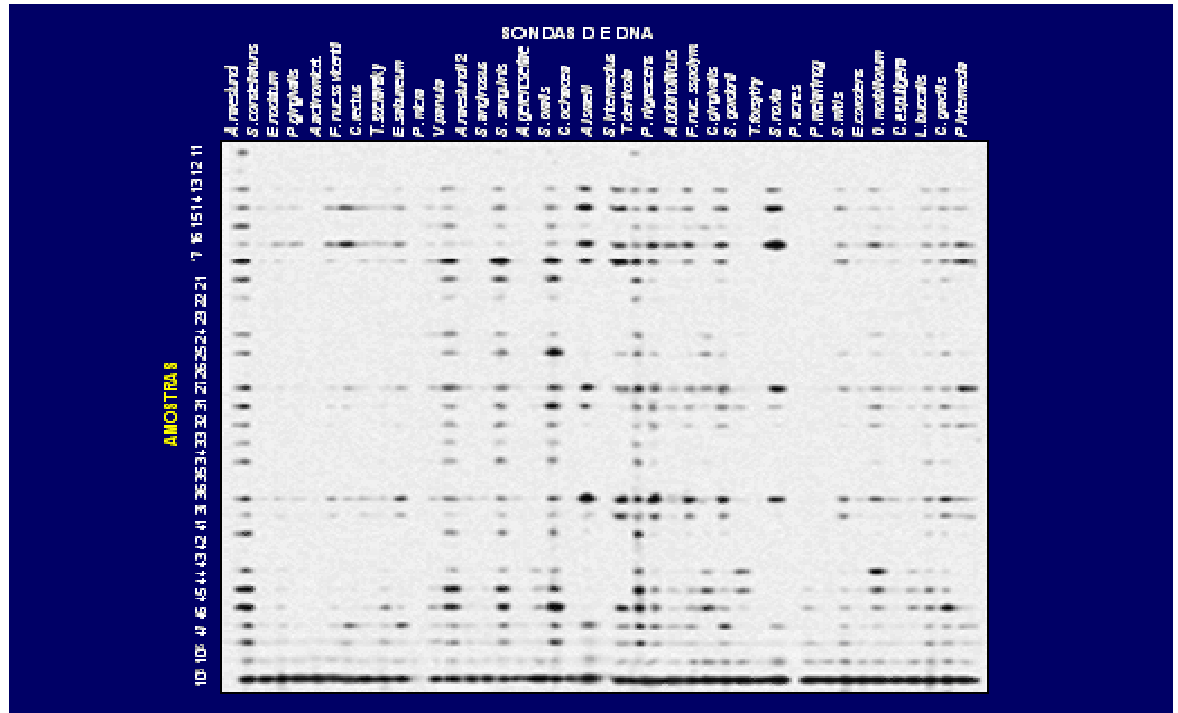


Figura 4. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras e as sondas de DNA (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

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

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

4.6 Procedimentos terapêuticos

4.6.1 Terapia periodontal básica

Após o registro das medidas clínicas, todos os indivíduos foram submetidos a sessões de adequação do meio bucal, incluindo instrução de higiene bucal (IHB), raspagem supragengival de todos os dentes (RSP) com instrumentos manuais, remoção de excesso de restaurações, selamento provisório das lesões cariosas cavitadas, curativos endodônticos e exodontias. As necessidades adicionais de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da clínica odontológica da própria universidade.

Durante as sessões de IHB, os indivíduos foram orientados a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental Colgate Total® (Anacol Ind. E Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Em seguida, os indivíduos receberam seis sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy) sob anestesia local. Estas sessões de RAR foram realizadas por dois alunos de pós-graduação treinados, com duração de aproximadamente 1 hora e finalizadas em 14 dias, sendo que os sítios mais comprometidos foram tratados nos primeiros dias.

Os dois examinadores realizaram os exames clínicos e também a terapia de RAR, porém o examinador responsável pela execução da RAR não realizou os exames no mesmo indivíduo.

4.6.2 Administração de MTZ e AMX sistêmicos e placebos

Indivíduos dos grupos teste 2 e teste 3 receberam RAR e administração de 1,2 g/dia de MTZ (400mg de 8/8 horas) combinado com 1,5 g/dia de AMX (500mg de 8/8 horas) via oral por 14 dias, tendo início juntamente com a terapia periodontal básica. Os indivíduos dos grupos controle e teste 1 receberam comprimidos de placebo das duas drogas, e foram orientados a seguirem o mesmo regime dos demais que receberam as substâncias ativas. O antibiótico e o placebo foram manipulados especialmente para este estudo na Farmácia de Manipulação Pharmédica (São Paulo, SP, Brasil). Todas as cápsulas (medicação ou placebo) apresentando 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 de Odontologia-UnG, trazendo o frasco vazio para depois receber outro frasco contendo a mesma medicação. Além disso, também foram monitorados de 4 em 4 dias, pessoalmente ou via telefone, por um aluno de iniciação científica. Após o término do período de administração da droga e/ou placebo, os indivíduos responderam a um questionário sobre possíveis reações adversas da medicação (Anexo A).

4.6.3 Administração de bochecho com CLX e placebo

Os bochechos (solução de digluconato de clorexidina 0,12% ou solução placebo) foram realizados 2 vezes ao dia com 15 ml da solução, durante 40 minutos após a escovação. O início do uso da CLX ou placebo ocorreu juntamente com o início da RAR e prosseguiu por 60 dias. As soluções de CLX e placebo foram manipuladas especialmente para o estudo na farmácia de manipulação Pharmédica (São Paulo, SP, Brasil) e acondicionadas em frascos de 210ml idênticos e codificados. A solução placebo possuía a mesma apresentação, cor e sabor da substância ativa - solução de digluconato de CLX a 0,12%. Os indivíduos receberam 1 frasco por semana contendo a solução de CLX ou o placebo. Após o término do produto, os pacientes foram orientados a trazerem à clínica de odontologia da UnG o frasco vazio para a retirada de um novo frasco, para controle da cooperação.

Ao final do período de bochecho com CLX ou placebo os indivíduos responderam a um questionário sobre possíveis reações adversas (Anexo B).

4.7 Análise estatística

Avaliação clínico-periodontal

A média dos parâmetros clínicos de boca toda avaliados foi computada para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. Os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para examinar diferenças entre os grupos no início do estudo. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$).

Avaliação microbiológica

Os dados microbiológicos resultaram da análise das 40 espécies bacterianas nas amostras de saliva, mucosa jugal, dorso de língua, biofilme supragengival e subgengival por indivíduo. Foram expressos de duas maneiras: contagens (níveis) e percentual de contagem das sondas de DNA (proporção). Os níveis médios ($\times 10^5$) e a proporção de cada espécie foram computadas para cada sítio, depois em cada indivíduo e, em seguida, em um mesmo grupo terapêutico em cada tempo experimental. Os dados iniciais (níveis e proporções) foram analisados pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para detectar possíveis diferenças significantes entre os grupos terapêuticos em cada tempo. Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microrganismos dentro de cada grupo, entre os tempos, foram avaliadas pelos testes Friedman e Dunn (comparações múltiplas). A significância estatística foi estabelecida em 5%.

As análises individuais foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, como proposto por Socransky et al. (1991). Foi aplicada a fórmula $0,05 = 1 - (1-k)^{40}$, onde k é o valor equivalente ao $p < 0,05$, quando ajustado para comparação de 40 bactérias. Desta forma, as diferenças detectadas foram consideradas significativas quando $p < 0,00125$ ($p < 0,05$).

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Effects of antimicrobials (systemic and local) associated with the periodontal therapy on the oral microbiota – a pilot study.

Obs.: De acordo com as normas do periódico Brazilian Oral Research.

ORIGINAL RESEARCH – PERIODONTOLOGY

Title: Effects of antimicrobials (systemic and local) associated with the periodontal therapy on the oral microbiota – a pilot study.

Stella de Noronha Campos Mendes¹ (stellancm@yahoo.com.br), 55-11-2464.1684

Marcelo de Faveri¹ (mfaveri@prof.ung.br), 55-11-2464.1684

Magda Feres¹ (mferes@ung.br), 55-11-2464.1684

Camila Machado Esteves¹ (estevescamia@msn.com), 55-11-2464.1684

Luciene Cristina de Figueiredo¹ (lfigueiredo@ung.br), 55-11-2464.1684

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

Correspondence author:

Luciene Cristina de Figueiredo

Address: Universidade Guarulhos - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa-CEPPE

Praça Tereza Cristina, 229 Centro

07023-070 Guarulhos, SP, Brazil

Email: lfigueiredo@ung.br

Fone: 55-11-2464.1684

Abstract

The aim of this study was to evaluate the microbiological effects of scaling and root planing (SRP) combined with systemic metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) associated to chlorhexidine (CHX) mouthrinse in the treatment of chronic periodontitis (ChP) on different sites in the oral cavity (tongue, soft tissue, saliva, supragingival and subgingival biofilms). In this pilot, single-blinded, placebo controlled study; 60 subjects with ChP were randomly assigned to receive SRP only or combined with MTZ (400mg t.i.d.) + AMX (500mg t.i.d.) for 14 days, with or without CHX (0.12%, b.i.d., 60 days). Microbiological samples were individually evaluated for their content of 40 bacterial species using checkerboard DNA-DNA hybridization. The counts of most of the species found in the tongue coating, soft tissue and supragingival biofilm did not change significantly from baseline to 180 days post-therapy. The only therapy that led to reduction in the red complex species in subgingival biofilm and saliva samples was the adjunctive use of antibiotics and CHX. The main results were showed for every intra-oral niches analyzed together. At 180 days, there was a significantly lower proportion of the red complex species in the MTZ+AMX+CHX group in comparison with the other groups. In conclusion, the concomitant use of antimicrobial chemical control (systemic and local) associated with basic periodontal therapy seems to affect more deeply the composition of the oral microbiota.

Descriptors: Periodontal diseases; Biofilms; Saliva; Tongue; Anti-bacterial agents.

Introduction

Scaling and root planing (SRP) has been the most commonly used periodontal therapy and its clinical and microbiological effects are well documented, but the ideal form of the therapy has not yet been determined (Haffajee et al., 1997, Cugini et al. 2000, Herrera 2002; Carvalho et al. 2004, Faveri, et al. 2006b). SRP is considered the “gold standard” of periodontal treatment; however, it has limitations to control the progression of the disease in all subjects (Cugini et al. 2000). Normally, this procedure improves clinical parameters and is effective on reducing pocket deep (PD) and attachment levels especially at deeper sites (Hafajee et al. 1997, Carvalho e al. 2004), but it does not provide long-term stability of the clinical benefits achieved initially (Darby et al. 2001, Teles et al. 2006, Cugini et al. 2000, Carvalho 2004).

The association of SRP with chemical control of dental biofilm has been suggested as adjunct treatment of chronic periodontitis (ChP). Metronidazole (MTZ) alone or combined with amoxicillin (AMX) seems to be the most favorable (Herrera et al. 2002, Haffajee, 2003, Matarazzo, 2008, Cionca et al. 2009, 2010, Mestnik et al. 2010, Silva et al. 2011) systemic antibiotics used in the treatment of ChP. About local antimicrobial agents, one of the most commonly used compounds is chlorhexidine (CHX) digluconate 0.12%. The combination of CHX mouthrinse with SRP leads to clinical benefits and can improve the reducing of pathogens on different intraoral surfaces (tongue, tonsils, cheek, hard and soft palate) and saliva (Eaton et al., 1997, Faveri et al. 2006a, Sekino et al. 2004).

The success of periodontal treatment are achieved when the levels, proportions and percentage of sites colonized by different periodontal pathogens are effectively reduced after therapy and a new microbial community with higher proportions of host-compatible microorganisms is established in the subgingival biofilm (Socransky & Haffajee 2005, Teles et al. 2006, Matarazzo et al. 2008, Sachdeo et al. 2008). It has been demonstrated that periodontal pathogens can also be detected in other intraoral habitats that also harbor distinct microbiota and produce biofilm with different complexities and may deserve therapeutic consideration. Tonsils, tongue, saliva and oral mucous membranes are also colonized by periodontal pathogens. It have been suggested that these areas might interfere on recolonization of the recent scaled pockets once serving as reservoirs for infection and recolonization of the periodontium (Dahlen et al. 1992; De Boeber & Loesche 1995, Quirynen et al. 2002, Mager et al. 2003a, Mager et al. 2003b, Beikler et al. 2006, Faveri et al. 2006a, Sachdeo et al. 2008, Gibbons, 2009, Teles et al., 2012).

Despite the strong evidence of the adjunct benefits of MTZ alone or combined with AMX and CXH in the treatment of periodontal diseases, the ideal form of therapy has not yet been established (Teles et al. 2006). The comparison of microbiological profile of different oral sites besides supra and subgingival biofilms after periodontal treatment may help to understand the patterns of subgingival recolonization and the clinical and microbiological effects of the periodontal therapy. To date, any study has evaluated the changes in the microbial profile of soft tissues, as well as saliva after

periodontal treatment with adjunctive use of antibiotic in subjects with ChP. Thus, the aim of this study was to evaluate the microbiological effects of SRP combined with systemic MTZ and AMX associated to CHX mouthrinse in the treatment of ChP on different sites in the oral cavity (tongue, soft tissue, saliva, supragingival and subgingival biofilms).

Material and Methods

60 subjects with ChP (≥ 30 years) based on the current International Classification of the American Academy of Periodontology (Armitage 1999) were selected for this study from the population referred to the Periodontal Clinic of Guarulhos University (Guarulhos, SP, Brazil). This study protocol was previously approved by Guarulhos University Ethics Committee in clinical research.

The inclusion criteria for the study were subjects who have not received previously periodontal therapy for at least 6 months; at least 15 teeth (excluding third molars) and a minimum of six teeth with at least one site with probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) between 5 - 10mm. The exclusion criteria were smoking, pregnancy, systemic diseases that could affect the progression of periodontal disease, long-term administration medication, antibiotic therapy for the last 6 months, mouthrinse therapy in the previously 6 months and allergy to CHX, MTZ and/or penicillin.

Experimental Design

In this pilot, double-blinded, placebo controlled study; subjects were randomly assigned to one of the following treatment groups:

Control (C, n=15): **SRP** + AMX Placebo + MTZ Placebo + CHX Placebo;

Test 1(T1, n=15): **SRP** + AMX Placebo + MTZ Placebo + **CHX** 0.12%;

Test 2 (T2, n=15): **SRP** + **AMX** (500mg) + **MTZ** (400mg) + CHX Placebo;

Test 3 (T3, n=15): **SRP** + **AMX** (500mg) + **MTZ** (400mg) + **CHX** 0.12%.

All subjects received full-mouth supragingival scaling and were instructed about proper home-care techniques. The same dentifrice was given to all subjects to use during the study (Colgate Total[®], Anacol Ind. Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate

Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brazil). Subjects received full-mouth SRP performed under local anaesthesia in a maximum of six appointments of 1 hour each. Treatment of entire oral cavity was completed in a maximum period of 14 days. SRP was manually performed by two trained periodontists. All subjects received maintenance therapy at 3 months.

Immediately after the first session of mechanical instrumentation, both systemic antibiotic (AMX and MTZ) and placebos were administered 3 x per day for 14 days. The supragingival biofilm control also started immediately after the SRP and was achieved by rinsing with a 15ml of 0.12% CHX solution twice a day for 60 days during 1 minute. The antibiotics and placebo were prepared by Pharmédica pharmacy (São Paulo, SP, Brazil). According to the therapy assigned, each subject received two opaque plastic packs with 21 capsules (MTZ 400mg and AMX 500mg) previously identified and coded. The placebo packs and capsules were identical to the antibiotics and the subjects were asked to bring the packs containing the medication once a week. During the visits all patients answered a questionnaire about any self-perceived side effects of the medication/placebo and were also responsible for calling the subjects every 2 days to monitor compliance.

Microbiological monitoring

All subjects received microbiological monitoring at baseline, 45, 90 and 180 days post-therapy. The non stimulated saliva samples were collected during 1 minute in sterile tubes with glass pearls. The soft tissue samples were collected by gently stroking the buccal mucosa with swab microbrush during approximately 30 seconds, searching the adherence of microorganisms to the bristles. The coating was taken with only one movement from an area of 10 mm in length (measured with a periodontal probe - North Carolina periodontal probe, Hu-Friedy, Chicago, IL) and 5 mm in width (corresponding to the tip of the 11-12 Gracey curette) of the dorsum of the tongue from a region posterior to the sulcus terminalis (Faveri et al. 2006a). Supragingival and subgingival biofilm samples were collected from two sites (one superior and one inferior) per subject with individual sterile mini-Gracey curettes (#11-12). The sample sites randomly selected had intermediate to deep PS between 5-7mm and CAL between 5-10mm.

All samples from different sites (a sample of 0.3ml saliva, tongue coating, one microbrush from soft tissue, supragingival and subgingival biofilm) were immediately placed in separate eppendorf tubes containing 0.15ml of TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.6). One hundred microlitres of 0.5M NaOH was added to each tube and the samples were dispersed using a vortex mixer. The eppendorf tubes were stored under the temperature of -20°C until being analyzed by checkerboard DNA-DNA hybridization technique for 40 bacterial species. This procedure was previously described in Mestnik et al. 2010.

Statistical analysis

The mean counts ($\times 10^5$) of individual bacterial species were averaged within each subject and then across subjects in both groups. The percentage of the total DNA probe counts was determined initially in each site, then per subject and averaged across subjects in the four groups. Adjustments for multiple comparisons (Socransky et al., 1991) were performed when the 40 bacterial species were evaluated simultaneously. The significance of differences among the four therapeutic groups was sought using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. The Friedman and Dunn's multiple comparison tests were used to test differences among time-points. The level of significance was set at 5%.

Results

There were no drop-outs during the course of the experimental period. All subjects who finished the study reported full adherence to the prescribed course of the antibiotic or placebo and the CHX rinses. Four subjects, one from the control group, one from the T2 group and two from the T3 group, reported some adverse events (diarrhea). No statistically significant differences were observed between groups for the number of subjects reporting adverse events. All subjects reported that they would start the treatment again if necessary.

No significant differences were observed in the mean counts and proportions of the 40 bacterial species at baseline for all samples ($p > 0.05$). The four groups were microbiologically homogeneous at the beginning of the study.

Figures 1 to 5 present the mean counts ($\times 10^5$) of the 40 species evaluated over the course of the study for all selected niches. The species were grouped according to the microbial complexes described by Socransky et al. (1998). In general, the counts of most of the species found in the tongue coating, soft tissue and supragingival biofilm did not change significantly from baseline to 180 days post-therapy (Figs. 1 - 3). Figure 4 shows many microbiological changes for the saliva samples in the T3 group, especially the increase in beneficial microorganisms and reduction of red complex species. The main results were showed for the subgingival biofilm (Fig. 5) where the adjunctive use of antibiotics and CHX (T3 group; MTZ+AMX+CHX) led to reduction of the three red complex species and six orange complex species.

Figure 6 shows the changes in the proportions of the microbial complexes for every intra-oral niches (saliva, tongue coating, soft tissue, supragingival and subgingival biofilms) analyzed together in the four groups during the experimental period. The microbial profiles were well affected by treatments, and the most beneficial changes were observed in T3 group (MTZ+AMX+CHX). These subjects showed a significant reduction in the proportion of red and orange complexes from baseline to 180 days post-therapy as well as an increase in the proportion of *Actinomyces sp.* At 180 days, there was a significantly lower proportion of the red complex species in the T3 group in comparison with the other groups.

Discussion

It has been shown that oral bacteria demonstrate specific tropisms toward the different biological surfaces in the oral cavity such as the teeth, mucosa and the other bacteria (Gibbons, 1989; Mager et al., 2003a). While most studies observe the teeth microbiota, which comprises about 20% of the total area of the oral cavity, the composition of the soft tissue microbiota has not received the same attention in the role of periodontal diseases and their treatments (Mager et al. 2003a; Mager et al. 2003b).

The results of this investigation are in agreement with other studies on the microbial composition of different environments mouth. For example, Dahlen et al. (1992) examined the tongue coating of periodontally diseased and nondiseased young adult Kenyan subjects for the presence of seven putative periodontal pathogens. All test

species including *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* could be detected in samples from both groups of subjects. Mager et al. (2003a) that evaluated microbiological samples of 8 oral soft tissue surfaces and saliva of the oral cavity of 225 periodontal healthy subjects using *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* technique and observed that all locations had different colonization profiles, and that periodontal pathogens had been detected in all sites, especially red complex species.

About periodontal therapies, our results agree with those of Danser et al. (1996), although different microbiological techniques were used in the two studies. Danser et al (1996) studied the effect of SRP and periodontal surgery on the levels of *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* and *P.intermedia* on the oral mucous membranes using indirect immunofluorescence. No reduction in the prevalence of the test bacteria were observed after treatment. Quirynen et al. (1998) examined the effect of a 1-stage full-mouth disinfection on microbiological colonization of the tongue in periodontitis patients. The authors observed a reduction in the CFU/ml of pigmented species but the total count was unchanged. Gebara et al. (2006) evaluated if the oral cavity of chronic periodontitis patients can harbor *Helicobacter pylori* after triple systemic antibiotic therapy (lansoprazole, amoxicillin and clarithromycin). Eradication of *H.pylori* after therapy was more effective for the stomach than for the mouth.

The results of the Gebara et al. (2006) and also other studies such as Quirynen et al. 2001 suggest that soft tissues may serve as reservoir pathogens for infection or reinfection of the periodontium.

Conclusion

The concomitant use of antimicrobial chemical control (systemic and local) associated with basic periodontal therapy seems to affect more deeply the composition of the subgingival sites and saliva microbiota.

REFERENCES

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

Beikler T, Shnitzer S, Abdeen G, Ehmke B, Eisenacher M, Flemmig, TF. Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. *J Periodontol.* 2006 Aug;77(8):1323-32.

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

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

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

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

Darby IB, Mooney J, Kinane DF. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2001 Aug;28(8):796-805.

Dahlen G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol.* 1992 Jan;19(1):35-42.

Danser MM, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, van der Velden, U. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J Periodontol.* 1996 May; 67(5):478-85.

De Boever E, Loesche WJ. Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor. *J Am Dent Assoc.* 1995 Oct;126(10):1384-93.

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

Faveri M, Feres M, Shibli JA, Hayacibara RF, Hayacibara MM, Figueiredo LC. Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque: an experimental study in humans. *J Periodontol.* 2006a Set 77(9):1539-46.

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.* 2006b Nov;33(11):819-28.

Gebara ECE, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MPA, Lima LAPA. Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. *J Clin Periodontol.* 2006 May;33(5):329-33.

Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res.* 2009 May;68(5):750-60.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol.* 1997 Oct;24(10):767-76.

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

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2002;29 Suppl 3:136-59; discussion 170-2.

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

Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol.* 2003a Jul;30(7):644-54.

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

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

Quyrienen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontal pathogens jeopardizes the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 2001 Jun;28(6):499-507.

Quyrienen M, Mongardini C, van Steenberghe D. The effect of a 1-stage full-mouth disinfection on oral malodor and microbial colonization of the tongue in periodontitis patients. A pilot study. *J Periodontol.* 1998 Mar;69(3):374-82.

Quyrienen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol 2000.* 2002 Jan;28(1):72-90.

Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the edentulous oral cavity. *Journal Prosthodont.* 2008 Jul;17(5):348-56.

Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. The effect of a chlorhexidine regimen on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2004 Aug;31(8):609-14.

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

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

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005 Jun;38(1):135-87.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of peridontal therapy. *Periodontol 2000.* 2006 Oct;42(1):180-218.

Teles FR, Teles RP, Uzel NG, Song XQ, Torresyap G, Socransky SS, Haffajee AD. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodontal Res.* 2012 Feb; 47:(1):95-104.

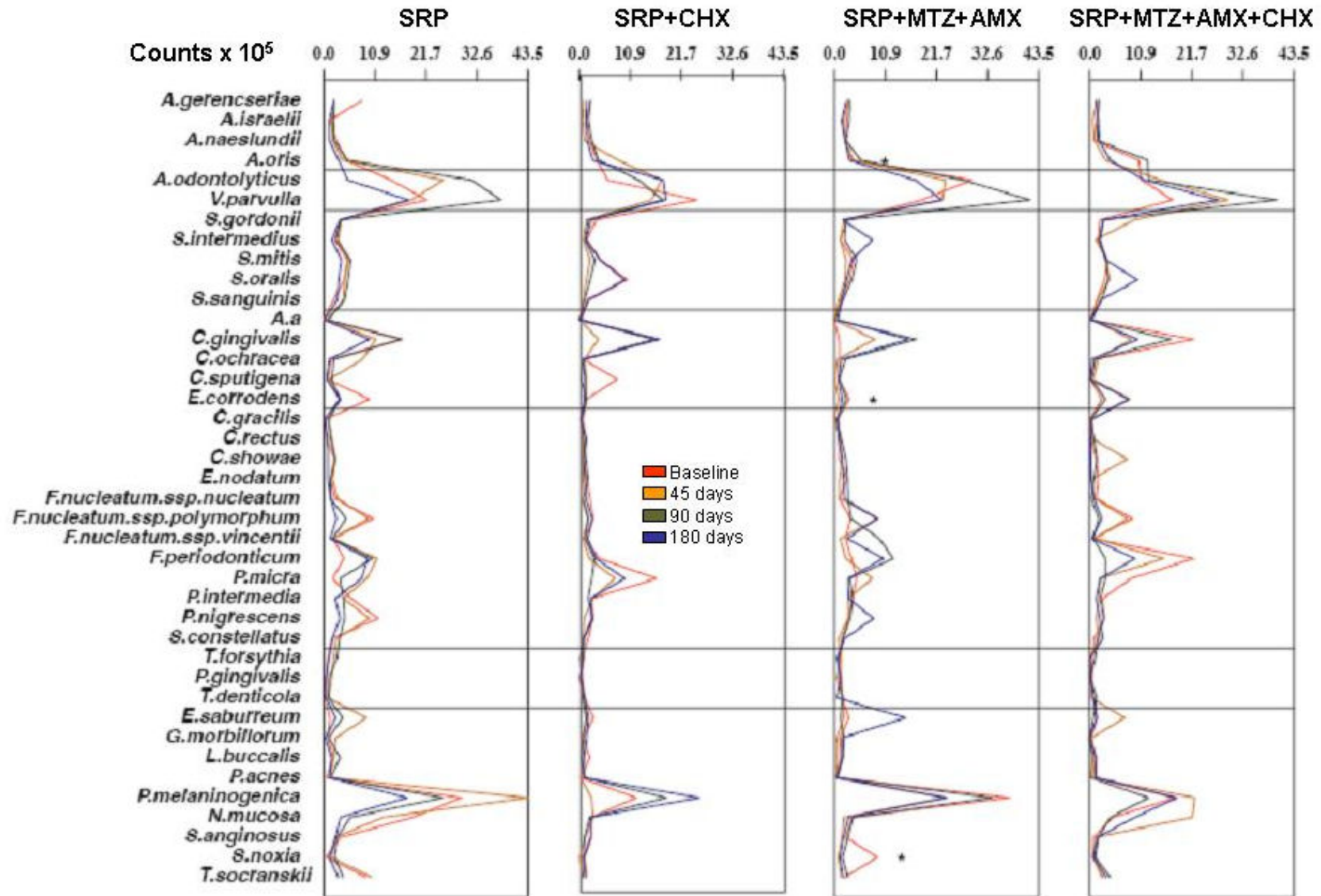


Figure 1. Tongue coating.

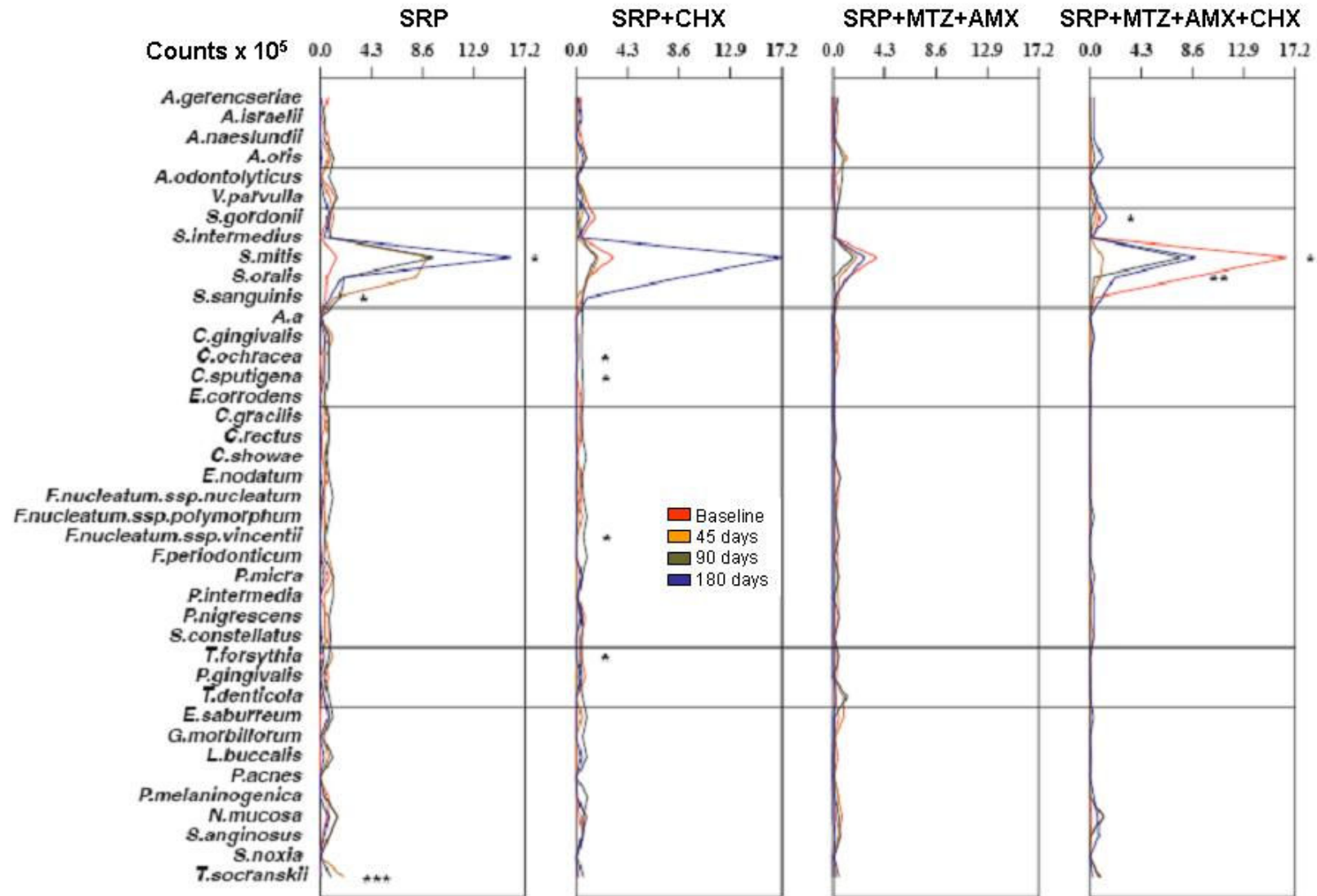


Figure 2. Soft tissue.

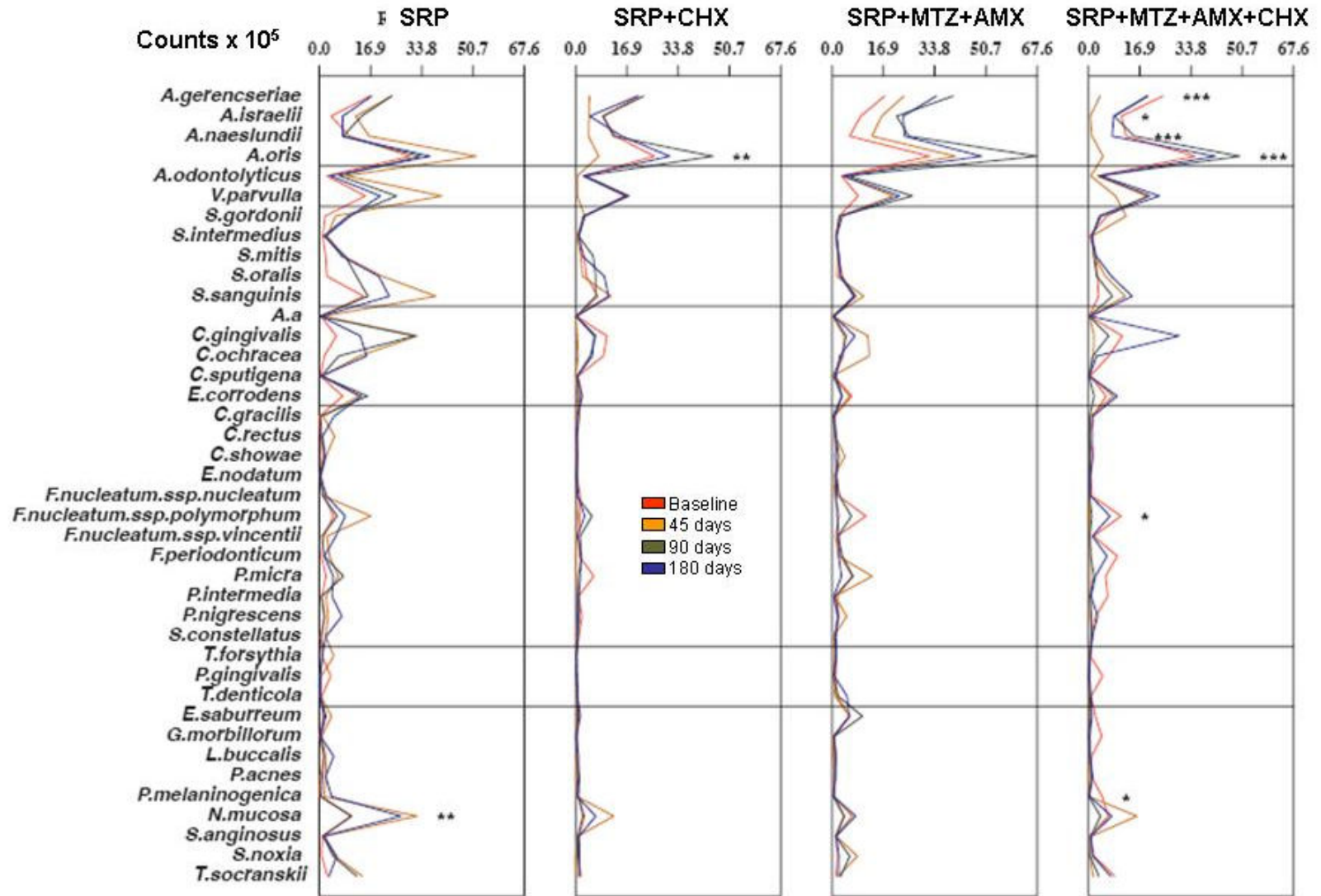


Figure 3. Supragingival biofilm.

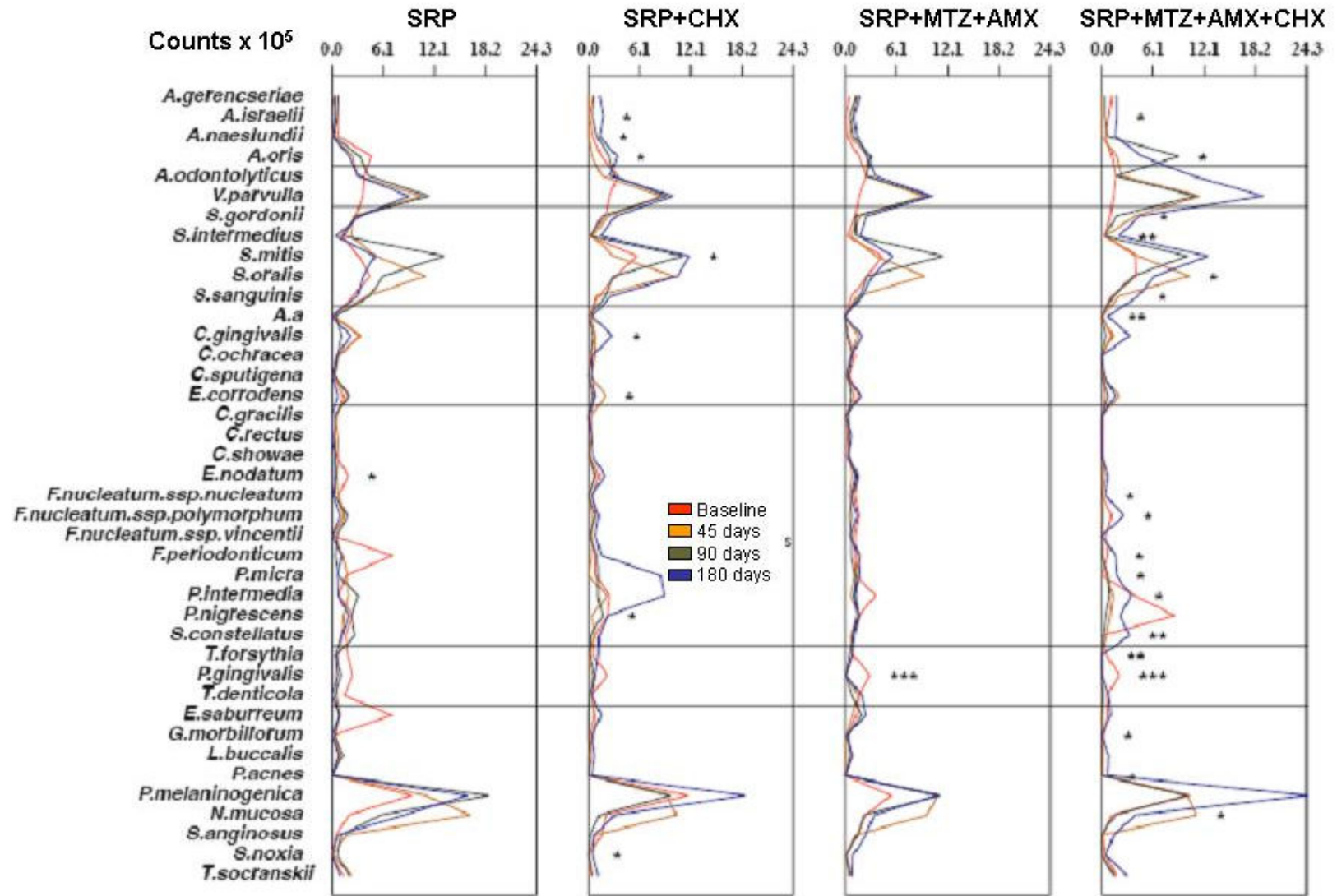


Figure 4. Saliva.

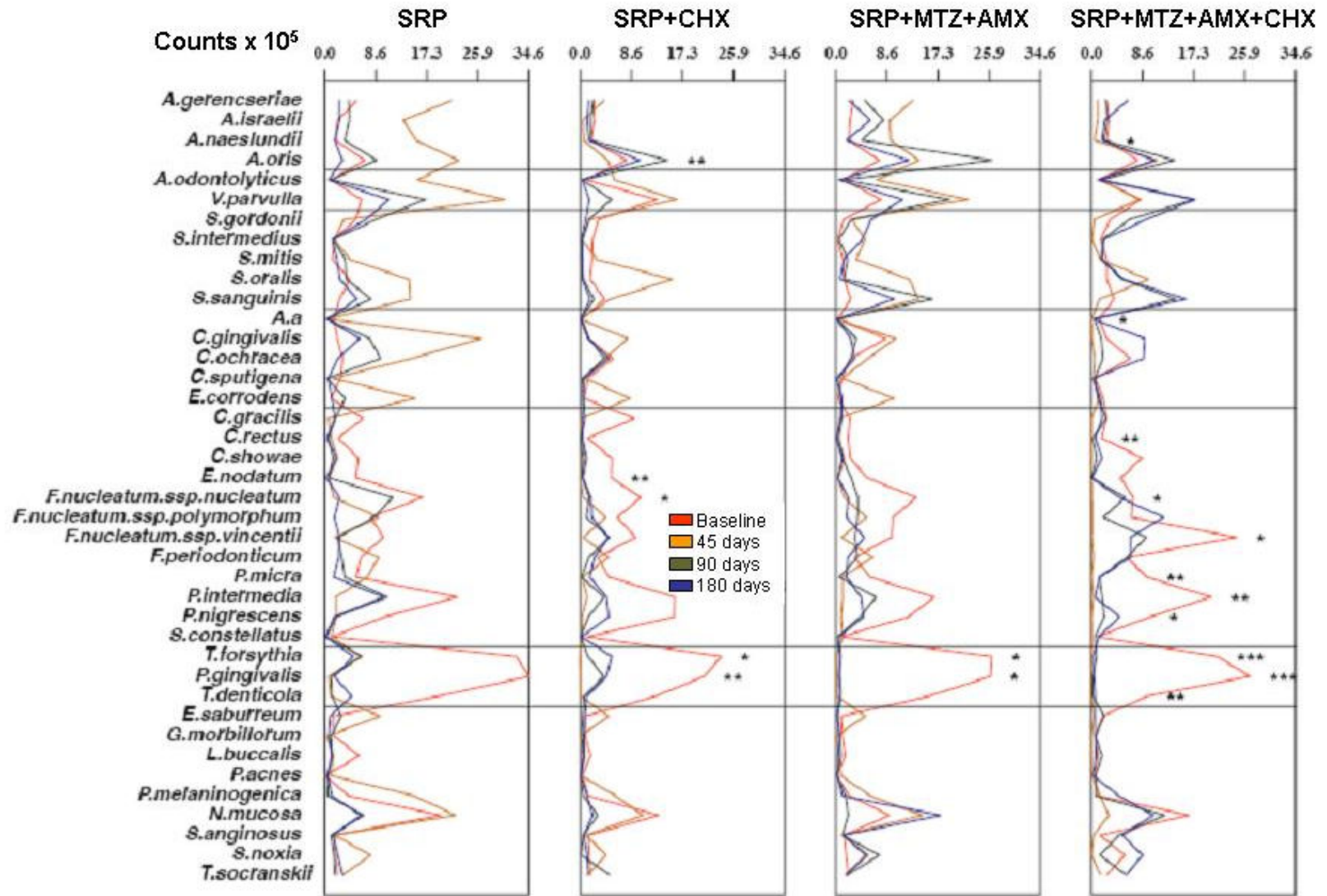


Figure 5. Subgingival biofilm.

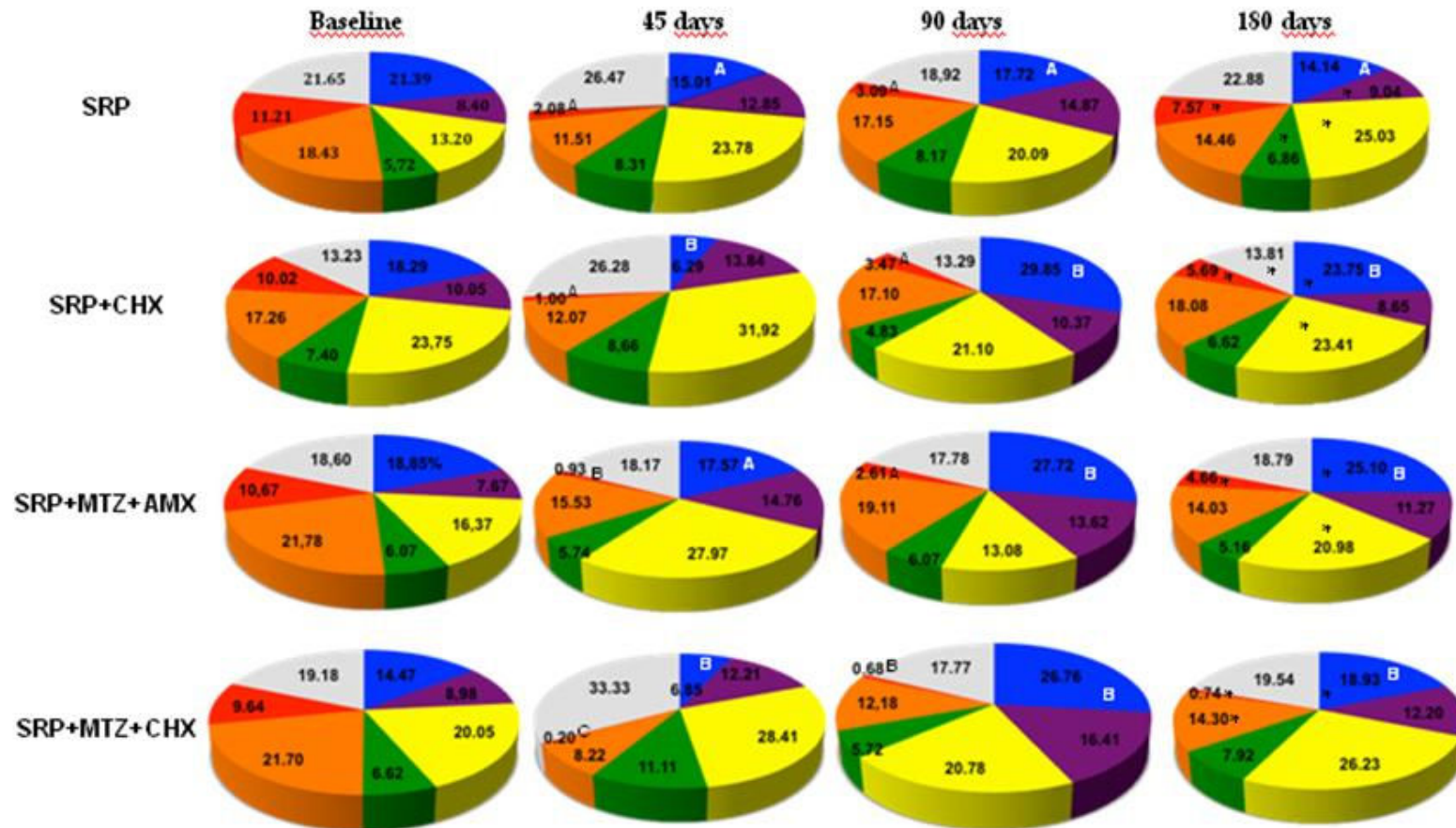


Figure 6. Five intra-oral niches (dorsum of the tongue, soft tissue, saliva, supragingival and subgingival biofilms).

Figure legends

Figure 1. Mean counts ($\times 10^5$) of the 40 test species in samples from tongue coating during experimental period in the four treatment groups. SRP, scaling and root planing; CHX, chlorhexidine; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin.

* $p < 0.01$, Friedman test: significance of differences within each group among the time points.

Figure 2. Mean counts ($\times 10^5$) of the 40 test species in samples from soft tissue during experimental period in the four treatment groups. SRP, scaling and root planing; CHX, chlorhexidine; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin.

* $p < 0.01$, Friedman test: significance of differences within each group among the time points.

Figure 3. Mean counts ($\times 10^5$) of the 40 test species in samples from supragingival biofilm during experimental period in the four treatment groups. SRP, scaling and root planing; CHX, chlorhexidine; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin.

* $p < 0.01$, Friedman test: significance of differences within each group among the time points.

Figure 4. Mean counts ($\times 10^5$) of the 40 test species in samples from saliva during experimental period in the four treatment groups. SRP, scaling and root planing; CHX, chlorhexidine; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin.

* $p < 0.01$, Friedman test: significance of differences within each group among the time points.

Figure 5. Mean counts ($\times 10^5$) of the 40 test species in samples from subgingival biofilm during experimental period in the four treatment groups. SRP, scaling and root planing; CHX, chlorhexidine; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin.

* $p < 0.01$, Friedman test: significance of differences within each group among the time points.

Figure 6. Pie charts of the mean proportion of each microbial complex in samples from the five intra-oral niches (dorsum of the tongue, soft tissue, saliva, supragingival and subgingival biofilms) analyzed together during experimental period in the four treatment groups. SRP, scaling and root planing; CHX, chlorhexidine; MTZ, metronidazole; AMX, amoxicillin.

* $p < 0.01$, Dunn's multiple comparison test: significance of differences within each group between baseline and 180 days post-therapy.

Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test (different letters indicate statistically significant differences): significance of differences among groups at each time point.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, é possível concluir que o uso concomitante do controle químico antimicrobiano (local e sistêmico) associado a terapia periodontal básica parece afetar mais profundamente a composição da microbiota subgengival e da saliva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Araujo MBW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of Probing depth measurements using a constant-force electronic probe: Analysis of inter-and intraexaminer variability. *J Periodontol*. 2003 Dec;74(12):84.

Beikler T, Shnitzer S, Abdeen G, Ehmke B, Eisenacher M, Flemmig, TF. Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. *J Periodontol*. 2006 Aug;77(8):1323-32.

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

Bosy A, Kulkarni GV, Rosenberg M, McCulloch CA. Relationship of oral malodor to periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations. *J Periodontol*. 1994 Jan;65(1):37-46.

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

Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Gonçalves C, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II--microbiological results. *J Clin Periodontol*. 2005 Apr;32(4):406-11.

Chain E. Chemical properties and structure of the penicillins. *Endeavour*. 1948 Jul;7(27):83; passim.

Colombo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, Paster BJ, Smith CM, Cugini MA, Socransky SS. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):169-80.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Rosalém W, Mendes MC, Souto RM. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol*. 2005 May;76(5):778-84.

Collins LM, Dawes C. The surface area of adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res*. 1987 Aug;66(8):1300-2.

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

Danser MM, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J Periodontol.* 1996 May;67(5):478-85.

Darby IB, Mooney J, Kinane DF. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2001 Aug;28(8):796-805.

De Boever E, Loesche WJ. Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor. *J Amer Dent Assoc.* 1995 Oct;126(10):1384-93.

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

Faveri M. Controle mecânico e químico da placa dentária supragengival associado à raspagem e alisamento radicular - estudo clínico e microbiológico [dissertação]. Guarulhos, SP: Universidade Guarulhos; 2005.

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.* 2006a Set;77(9):1539-46.

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.* 2006b Nov;33(11):819-28.

Feinberg AP. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1993 Jul 1;132(1):6-13.

Feres M, Gursky LC, Faveri M, Tsuzuki 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 Aug;36(10):857-67.

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 Aug; 29(8):724-35

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.* 2001 Jul;28(7):597-609.

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

Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard K, Som S, Smith C et al. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 1999b Dec;26(12):775-83

Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard KA, 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*. 1999c Dec;26(12):784-92.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol*. 2001 Jul;28(7):597-609.

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

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

Florey HW. Use of micro-organisms for therapeutic Purposes. *Br Med J*. 1945 Nov 10;2(4427):635-42.

Hare R. New light on the discovery of penicillin. *Med Leg J*. 1970 ;38(2) :31-41.

Gebara EC, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MP, Lima LA. Persistence of *Helicobacter Pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. *J Clin Periodontol*. 2006 May;33(5):329-33.

Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res*. 1989 May;68(5):750-60.

Gonçalves C. Efeitos clínicos e microbiológicos do emprego de tetraciclina local ou sistêmica associada à terapia periodontal básica [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.

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 Jun;39(6):526-36.

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 Oct; 32(10):1096-107.

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

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol*. 1997b Oct;24(10):767-76.

Haffajee AD, Patel M, Socransky S. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiology Immunology*. 2008 Apr; 23(2):148-57.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994 Jun;5(1):78-111.

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

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 Mar; 34(3):243-53.

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

Kinney JS, Morelli T, Herr AE, Sugai JV, Shelburnes EC, Rayburn LA, Singh AK, Giannobile WV. Saliva/Pathogen Biomarker Signatures and Periodontal Disease Progression. *J Dent Res*. 2011 Jun;90(6): 752-8.

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

Lekovic V, Kenney EB, Carranza Jr FA, Endres G. The effect of metronidazole on human periodontal disease: a clinical and bacteriological study. *J Periodontol*. 1982 Aug; 54(5):476-80.

Lindhe J. Treatment of localized periodontitis. In: Genco RJ, Mergenhagen SE, ed. Host-parasite interactions in periodontal diseases. *Am. Soc. Microbiol*. 1981;381-394.

Lindhe J, Liljenberg B. Treatment of localized juvenile periodontitis. Results after 5 years. *J Clin Periodontol*. 1984 Jul;11(6):399-410.

Löe H, Anerud A, Baysen H, Morisson E. Natural history of periodontal disease in man: rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan labores 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*. 1986 May;13(5):431-45.

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

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

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

Loesche, WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *Journal of Dental Research*. 1979 Dec;58(12):2404-12.

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

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

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

Loesche WJ, Grossman N, Giordano J. Metronidazole in periodontitis (IV). The effect of patient compliance on treatment parameters. *J Clin Periodontol*. 1993 Feb;20(2):96-104.

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

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

Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*. 1982 Apr; 53(4):223-230.

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

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

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

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 Nov;69(11):1291-8.

López NJ, Gamonal JA, Martinez B. Repeated metronidazole and amoxicillin treatment of periodontitis. A follow-up study. *J Periodontol.* 2000 Jan;71(1):79-89.

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 Sep;33(9):648-60.

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

Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol.* 2003a Jul;30(7):644-54.

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

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

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

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Soares G, Teles RP, Fermiano D, Duarte PM, Faveri 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 Oct;39(10):955-61.

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

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.

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

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

Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intraoral translocation of periodontopathogens jeopardizes the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 2001 Jun;28:499-507.

Ribeiro EP, Bittencourt S, Zanin IC, Bovi Ambrosano GM, Sallum EA, Notici FH, Gonçalves RB, Casati MZ. Full-mouth ultrasonic debridement associated with amoxicillin and metronidazole in the treatment of severe chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009 Aug;80(8):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 Apr;29(4):342-50.

Russel AL. Epidemiology of periodontal disease: a review of the literature. *Int Dent J.* 1967 Jun;17(2):282-96.

Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the edentulous oral cavity. *Journal of Prosthodontics.* 2008 Jul;17(5):348-56.

Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky SS, Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and de novo plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2003 Oct;30(10):919-25.

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

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

Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontal Res.* 2002 Oct;37(5):389-98. Review

Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol.* 1979 Oct;50(10):495-509.

Slots J, Slots H. Bacterial and viral pathogens in saliva: disease relationship and infectious risk. *Periodontology* 2000. 2011 Feb;55(1):48-69

Slots S; Research, Science and Therapy Committee American Academy of Periodontology. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol*. 2004 Nov; 75(11):1553-65.

Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*. 1989 Mar;4(1):47-51.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000. 1994 Jun;5(1):7-25.

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

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002 Jan;28(1):12-55.

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

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

Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socranski SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*. 1979 Oct;6(5):278-07

Teles FR, Teles RP, Uzel NG, Song XQ, Torresyap G, Socransky SS, Haffajee AD. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodont Res*. 2012 Feb; 47(1):95-104.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2006 Oct;42(1):180-218.

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

van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000. 1996 Feb;10:45-78

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

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

Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, Winkel EG, de Graaff J. Black-pigmented *Bacteroides* and motile organisms on oral mucosal surfaces in individuals with and without periodontal breakdown. *J Periodontal Res.* 1986 Jul;21(4):434-9.

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

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

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

Winkel EG, van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Vangsted T, van der Velden. Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J Clin.Periodontol.* 1997 Aug;24(8):573-579.

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

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000b; 27(9):648-57.

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

ANEXOS**ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE EFEITOS ADVERSOS (CÁPSULAS)**

Nome: _____ Data: ____/____/____

Marque um X na resposta para cada uma das perguntas abaixo:	SIM	NÃO	NÃO SEI
1) Você conseguiu tomar os medicamentos como lhe foi orientado ?			
2) Você sentiu algum mal-estar devido ao medicamento que tomou?			
3) 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 do medicamento prejudicaram o seu dia-a-dia?			
12) Você tomaria os medicamentos novamente caso fosse necessário?			

ANEXO B – QUESTIONÁRIO DE EFEITOS ADVERSOS (BOCHEHOS)

Nome: _____ Data: ____/____/____

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