IRINEU GREGNANIN PEDRON

**DETECÇÃO POR PCR DE *Porphyromonas gingivalis* E DOS
GENÓTIPOS *fimA* II, IV E *ragB*+ NO BIOFILME SUBGENGIVAL,
ANTES E 180 DIAS APÓS O TRATAMENTO PERIODONTAL
CONVENCIONAL E ASSOCIADO À TERAPIA ANTIMICROBIANA EM
PACIENTES FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA**

São Paulo
2008

Irineu Gregnanin Pedron

Detecção por PCR de *Porphyromonas gingivalis* e dos genótipos *fimA* II, IV e *ragB*+ no biofilme subgengival, antes e 180 dias após o tratamento periodontal convencional e associado à terapia antimicrobiana em pacientes fumantes com periodontite crônica

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Integrada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Pinto Alves Mayer

São Paulo
2008

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Pedron, Irineu Gregnanin

Detecção por PCR de *Porphyromonas gingivalis* e dos genótipos fimA II, IV e ragB+ no biofilme subgengival, antes e 180 dias após o tratamento periodontal convencional e associado à terapia antimicrobiana em pacientes fumantes com periodontite crônica / Irineu Gregnanin Pedron; orientador Márcia Pinto Alves Mayer. -- São Paulo, 2008.

102p.: tab., fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Integrada) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Periodontite crônica – Tabagismo – Terapêutica – Efeitos 2. Periodontia – Terapêutica – Resultado de tratamento

CDD 617.632
BLACK D64

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pedron IG. Detecção por PCR de *Porphyromonas gingivalis* e dos genótipos *fimA* II, IV e *ragB*+ no biofilme subgengival, antes e 180 dias após o tratamento periodontal convencional e associado à terapia antimicrobiana em pacientes fumantes com periodontite crônica [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, _____/_____/_____

Banca examinadora

1) Prof. (a) Dr. (a): _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof. (a) Dr. (a): _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof. (a) Dr. (a): _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pelo dom da vida, por tudo, pelas possibilidades que se transformaram em oportunidades.

Aos meus pais, Irineu e Mara, meus exemplos a quem devo gratidão, amor e respeito. Procuro honrá-los por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim...

Aos meus irmãos, Thiago e Bruno, pelo apoio e carinho fraternal.

Érica, obrigado pela força, apoio e amor, que tem me incentivado a me empenhar cada vez mais.

À Prof^a. Dr^a. Isabel Peixoto Tortamano, minha preceptora na Disciplina de Clínica Integrada, pelo acolhimento e encaminhamento para o projeto inicial.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Pinto Alves Mayer, por ter me acolhido, apoiado e incentivado sempre. O Laboratório de Microbiologia Oral incrementou minha visão como clínico.

Às Prof^a. Dr^a. Magda Feres e Luciene Figueiredo, pela possibilidade da parceria e doação das amostras dos pacientes tratados no Curso de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Guarulhos. Sem essa parceria, não seria possível este trabalho.

Aos Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha, Reinaldo Brito e Dias e João Gualberto Cerqueira Luz, pelos estimados auxílios nestes momentos mais difíceis...

Aos Professores da Disciplina de Clínica Integrada, Professores Associados Waldyr Antônio Jorge, Mário Sérgio Soares e Maria Aparecida Borsatti; aos Professores Doutores Carlos Alberto Adde, Flávio Eduardo Guillin Perez, José Leonardo Simone, Sibebe Sarti Penha e Inês Aparecida Buscariolo, meus agradecimentos pelas orientações durante o curso desses anos.

Aos colegas do curso de Pós-graduação, Alexandre do Valle Wuol, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, Carina Gisele Costa, Kazue Kanegane, Marcelo Munhós Romano, Marcelo Siviero, Mauricio José Tornelli, Mayara Aguiar Dias de Brito, Renata Martins da Silva Prado, Priscila Mara Olivieri Ximenes. A vida nos leva a caminhos indecifráveis e qual seria a razão de nos unir? Andréia Perrela, Estevam Rubens Utumi, Endrigo Sperto Rodrigues dos Santos e Leopoldo Penteado Nucci da Silva, obrigado pela força de sempre e por tornarem as coisas mais fáceis!

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Oral do ICB, Adriana da Costa Ribeiro, Alessandra de Paula e Carvalho, Amanda Tojeira Prestia Brunheira, Ana Carla Robatto Nunes, Cláudia Ota-Tsuzuki, Cláudia Peres Trindade, Dione Kawamoto, Ellen Sauyri Ando, Éricka Tavares Pinheiro, Fábio Luis Lembo, Flávia Matarazzo, Francisco César Barbosa, Josely Emiko Umeda Marcelo de Faveri, Maria Cristina Nissan, Priscila Larcher Longo, Silvia Regina Loureiro Teixeira, Tânia Opido Schalch; e ao técnico do laboratório João Paulo Ribeiro. Minha gratidão pela paciência e ensinamentos sobre a microbiologia.

Aos grandes amigos da vida, Prof. Dr. Élio Hitoshi Shinohara, Alessandra e Vanessa Reyes e Alexandre Manzano, pelo carinho, força e incentivo.

À CAPES por ceder a bolsa de estudos.

Às secretárias Vilma Aparecida Vieira, Vera Lúcia Cordeiro dos Santos, e em particular à Regina Santos, pelo carinho, apoio e respeito.

Às secretárias da Comissão de Pós-graduação Cátia Tiezzi dos Santos, Nair Tanaka Costa, Alessandra Moreira de Lima e Donata Cristina Moreira Lima pela atenção carinhosa, sempre.

Às bibliotecárias Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro e Glauce Elaine Damasio Fidelis, pelo suporte na revisão do trabalho.

À estaticista Rosana Prisco pela atenção dispensada na condução de informações e análise estatística instituída.

A todos que no decorrer desse percurso, me ajudaram, incentivaram e apoiaram sempre.

Pedron IG. Detecção por PCR de *Porphyromonas gingivalis* e dos genótipos *fimA* II, IV e *ragB*+ no biofilme subgengival, antes e 180 dias após o tratamento periodontal convencional e associado à terapia antimicrobiana em pacientes fumantes com periodontite crônica [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

As doenças periodontais são infecções locais que apresentam morbidade e têm sido relacionadas com outras doenças ou complicações sistêmicas. Pacientes tabagistas apresentam taxas elevadas e maior predisposição às doenças periodontais severas e avançadas. A administração sistêmica de antibióticos, particularmente metronidazol (M) e amoxicilina (A), associados ao tratamento periodontal mecânico (raspagem e alisamento radiculares - RAR) tem sido amplamente estudada frente às doenças periodontais crônicas. Porém, pouco tem sido esclarecido referente aos efeitos desses tratamentos sobre *Porphyromonas gingivalis* e seus genótipos. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar os efeitos clínicos (profundidade a sondagem - PS, nível de inserção clínica - NIC, índice de placa - IP, sangramento gengival - SG, sangramento à sondagem - SS, e supuração - SUP) e microbiológicos (referente à presença de *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* II, *fimA* IV e *ragB*) após 180 dias do tratamento periodontal mecânico (RAR) associado à administração sistêmica de antibióticos (RAR+M+A), comparados ao tratamento periodontal mecânico (RAR), utilizando-se o PCR convencional (primers específicos para 16S rRNA); e relacionar a presença de *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* II, *fimA* IV e *ragB* com a profundidade de sondagem (PS) em pacientes fumantes com periodontite crônica. Foram avaliadas 167 amostras oriundas de sítios de 20 sujeitos

tratados com RAR ($n=11$) e RAR + M + A ($n=9$), no exame inicial e 180 dias após a terapia. Parâmetros clínicos (PS, NIC, IP, SG, SS e SUP) e coletas microbiológicas foram mensuradas em ambos tempos. A detecção da frequência de *P. gingivalis* foi realizada por PCR convencional, bem como para os genótipos *fimA* II, *fimA* IV e *ragB*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento periodontal mecânico associado à administração sistêmica de antibióticos (RAR+M+A) e o tratamento periodontal mecânico (RAR), nos pacientes fumantes, em relação à detecção de *P. gingivalis*. O grupo RAR apresentou-se mais efetivo (estatisticamente significativo) na redução de prevalência do genótipo *ragB*, em comparação ao grupo RAR+M+A, após 180 dias do tratamento. Não foi observada relação estatisticamente significativa entre a prevalência de *P. gingivalis* e dos genótipos *fimA* II, *fimA* IV e *ragB* com a PS no exame inicial.

Palavras-Chave: periodontite; terapia; resultado de tratamento; tabaco; amoxicilina; metronidazol; *Porphyromonas gingivalis*.

Pedron IG. Detection by PCR of *Porphyromonas gingivalis* and genotypes *fimA* II, IV e *ragB* in the subgingival biofilm, before and 180 days after conventional periodontal treatment and associated with antibiotic therapy in smoking patients with chronic periodontitis [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Periodontal diseases are local infections that present morbidity and have been relation with others systemic diseases or complications. Smoking patients present high levels and bigger predisposition to the severe and advanced periodontal diseases. The systemic administration of antibiotics, mainly metronidazole (M) and amoxicillin (A), associated to the mechanical periodontal treatment (scaling and root planing - SRP) has been largely researched referring to the chronic periodontal diseases. However, not much has been cleared up referring to the effects of those treatments about *Porphyromonas gingivalis* and its genotypes. The purpose of this research was to evaluate the clinical effects (depth probing - DP, clinical attachment level - CAL, plaque index - PI, gingival bleeding - GB, bleeding on probing - BOP, and supuration - SUP) and microbiological (referring to the presence of *P. gingivalis* and its genotypes *fimA* II, *fimA* IV and *ragB*) after 180 days of the mechanical periodontal treatment (SRP) associated to the systemic administration of antibiotic (SRP+M+A), compared to the mechanical periodontal treatment (SRP) in smoking patients with chronic periodontitis, by using the conventional PCR (specific primers to the 16S rRNA); to associate the *P. gingivalis* presence and its genotypes *fimA* II, *fimA* IV and *ragB* with depth probing (DP) of the researched population. 167 samples from the sites of 20 subjects treated with SRP ($n=11$) and SRP+M+A ($n=9$) have

been evaluated, at the baseline and 180 days after the therapy. Clinical parameters (DP, CAL, PI, GB, BOP and SUP) and microbiological samples were evaluated in both moments. The detection of *P. gingivalis* frequency was made by using conventional PCR, and also to the genotypes *fimA* II, *fimA* IV and *ragB*. There was no statistically significant difference between the mechanical periodontal treatment associated to the systemic administration of antibiotics (SRP+M+A) and the mechanical periodontal treatment (SRP), in the smoking patients, related to the detection of the *P. gingivalis*. The SRP group showed more effective (statistically significant) on the reduction of the genotype *ragB* prevalence, comparing to the SRP+M+A group, after 180 days of therapy. No statistically significant relation between the prevalence of *P. gingivalis* and its genotypes *fimA* II, *fimA* IV e *ragB* with DP at the baseline have been observed.

Key-words: periodontitis; therapy; treatment outcome; tobacco; amoxicillin; metronidazole; *Porphyromonas gingivalis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Seqüências dos iniciadores utilizados para determinação de <i>P. gingivalis</i> , fimbrias do tipo <i>fimA</i> II, <i>fimA</i> IV e do gene <i>ragB</i> e seus respectivos tamanhos do produto esperado	65
Tabela 5.1 - Distribuição dos sítios subgengivais no exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a detecção de <i>P. gingivalis</i> por PCR	70
Tabela 5.2 - Distribuição dos sítios subgengivais no exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a detecção do genótipo <i>fimA</i> II de <i>P. gingivalis</i> por PCR	71
Tabela 5.3 - Distribuição dos sítios subgengivais no exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a detecção do genótipo <i>fimA</i> IV de <i>P. gingivalis</i> por PCR	72
Tabela 5.4 - Distribuição dos sítios subgengivais no exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a detecção do genótipo <i>ragB</i> + de <i>P. gingivalis</i> por PCR	74
Tabela 5.5 - Distribuição dos sítios subgengivais no exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a presença de IP	75
Tabela 5.6 - Distribuição dos sítios subgengivais no exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a presença de SG	76
Tabela 5.7 - Distribuição dos sítios subgengivais no exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a presença de SS	77
Tabela 5.8 - Distribuição dos sítios subgengivais no exame inicial e após 180 dias do tratamento nos RAR e RAR+M+A de acordo com a presença de SUP	79

Tabela 5.9 - Distribuição de *P. gingivalis* baseada na estratificação de acordo com a PS 80

Tabela 5.10 - Distribuição de *fimA* II baseada na estratificação de acordo com a PS 81

Tabela 5.11 - Distribuição de *fimA* IV baseada na estratificação de acordo com a PS 82

Tabela 5.12 - Distribuição de *ragB* baseada na estratificação de acordo com a PS 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	amoxicilina
<i>FimA</i> II	genótipo <i>fimA</i> II
<i>FimA</i> IV	genótipo <i>fimA</i> IV
IP	índice de placa visível
M	metronidazol
M+A	metronidazol associada à amoxicilina
NIC	nível de inserção clínica
ORF	<i>open reading frames</i> (quadro aberto de leitura)
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> , reação da polimerase em cadeia
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PS	profundidade de sondagem da bolsa periodontal
<i>RagB</i> +	genótipo <i>ragB</i> positivo
RAR	raspagem e alisamento radiculares
SG	sangramento gengival
SS	sangramento à sondagem
SUP	supuração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
3 PROPOSIÇÃO	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
5 RESULTADOS	69
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

Periodontite é uma doença infecciosa multifatorial que acomete os tecidos periodontais de suporte – cemento, ligamento gengival e osso alveolar – caracterizada clinicamente por perda de inserção e destruição óssea, podendo culminar na perda dentária (ARMITAGE, 1999; BURT, 2005; LAMONT; JENKINSON, 1998). Pode apresentar-se sob duas formas clínicas, a crônica, sendo mais comum, geralmente acometendo de 5 a 80% da população, e assumindo diversos graus de severidade, com sinais de perda de tecidos de suporte dentário, acúmulo de cálculos e placa dentária; e a agressiva, com menor incidência (2 a 5% - envolvendo a população jovem saudável), com sinais de perda tecidual avançada embora não apresentando, na maioria das vezes, acúmulo de cálculo e placa dentária (ARMITAGE, 1999; BURT, 2005).

A etiologia bacteriana das doenças periodontais é complexa, com ampla variedade de microorganismos associados com o início e a progressão da doença, associados aos fatores do hospedeiro. Dentre as bactérias relacionadas à periodontite crônica, particular atenção é dada às anaeróbias Gram negativas, constituintes do Complexo Vermelho, proposto por Socransky et al. (1998), *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*, destacando-se esta última (BURT, 2005).

Os periodontopatógenos podem colonizar o biofilme subgengival em pacientes com periodonto saudável, co-existindo em harmonia comensal com o hospedeiro. Nesta perspectiva, a fase ativa da doença pode ocorrer pela desarmonia do balanço ecológico entre microorganismos e os fatores do hospedeiro.

Componentes teciduais, salivares e do fluido gengival interagem com os microorganismos e podem alterar o meio, predispondo à determinada microbiota (BURT, 2005; LAMONT; JENKINSON, 1998; SANZ et al., 2004; SLOTS, 1996).

Outros fatores inerentes aos hospedeiros como a idade, gênero, condições sistêmicas prévias (resposta imune e predisposição genética) e hábitos determinam a progressão e severidade da periodontite. O tabagismo é fator de risco à periodontite, e fumantes apresentam de 2,5 a 6 vezes mais possibilidade de desenvolvimento da doença (BURT, 2005). Adicionalmente, foram observadas alterações na prevalência de determinadas espécies bacterianas em pacientes fumantes, particularmente as dos Complexos Vermelho e Laranja (BORRELL; PAPAPANOU, 2005; BURT, 2005; COLOMBO et al., 2002; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2001; VAN WINKELHOFF et al., 2001). Nesta perspectiva, o controle da infecção periodontal insuficiente em fumantes também pode ser causada pela persistência de bactérias periodontopatogênicas (VAN WINKELHOFF et al., 2001). O fumo também afeta a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção, diminuindo a resposta imune local e sistêmica pela redução da função dos leucócitos polimorfonucleares, e subsequentemente reduzindo a quimiotaxia e fagocitose, além da ação sobre os fibroblastos, inibindo o processo de reparação normal dos tecidos periodontais (BORRELL; PAPAPANOU, 2005; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2001).

Adicionalmente, a severidade da doença poderia ser influenciada por características de virulência dos microorganismos. Tem sido sugerido que a diversidade fenotípica e genotípica de *P. gingivalis* resultaria em diferenças na capacidade de indução à destruição periodontal.

Fímbrias são componentes filamentosos da superfície celular de *P. gingivalis*, considerados potentes fatores de virulência, por atuarem na modulação da resposta

imune do hospedeiro e, principalmente, na adesão da bactéria aos tecidos periodontais (AMANO et al., 1999; AMANO et al., 2000; AMANO et al., 2001; AMANO et al., 2004; MISSAILIDIS et al., 2004).

A diversidade fenotípica das fímbrias de *P. gingivalis* ocorre pelas diferenças nas seqüências de nucleotídeos do gene que codifica a subunidade da fímbria principal, *fimA*, classificada em 6 variantes alélicas (I a V e Ib) (AMANO et al., 2000; AMANO et al., 2001; NAKAGAWA et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2002). O genótipo *fimA* Ib foi considerado uma variante clonal do genótipo *fimA* I, haja vista a elevada homologia entre bases de suas seqüências de nucleotídeos e imunorreatividade (NAKAGAWA et al., 2002).

O genótipo *fimA* II é o mais comumente encontrado em pacientes com periodontite crônica, tanto em populações homogêneas em países como o Japão (AMANO et al., 1999; AMANO et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2002) ou China (ZHAO et al., 2007), em caucasianos na Europa (BEIKLER et al., 2003; VAN DER PLOEG et al., 2004), bem como na população multi-racial no Brasil (MISSAILIDIS et al., 2004). No entanto, existem divergências quanto à prevalência dos demais genótipos em diferentes localizações geográficas. O genótipo Ib foi o segundo mais prevalente entre pacientes com periodontite no Brasil (MISSAILIDIS et al., 2004), enquanto que outros estudos relataram que os genótipo IV (AMANO et al., 1999; AMANO et al., 2000), ou I (BEIKLER et al., 2003) foram os segundos mais prevalentes. Os genótipos *fimA* I e V foram relacionados com pacientes com periodonto saudável (AMANO et al., 2000; AMANO et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2002; ZHAO et al., 2007), diferindo dos resultados encontrados no Brasil (MISSAILIDIS et al., 2004). Essa divergência entre estudos realizados em diferentes

populações poderia refletir diferenças no padrão de colonização em indivíduos de diversas etnias.

Adicionalmente, Nakano et al. (2008) sugeriram o possível papel dos genótipos *fimA* IV e II na iniciação e progressão de doenças cardiovasculares, ao observarem a presença de *P. gingivalis* em amostras oriundas de válvulas cardíacas, placas ateromatosas e placa dentária. Os genótipos *fimA* IV e II foram encontrados com frequência considerável nas amostras cardiovasculares (45 e 30%, respectivamente).

Em comparação com outros genótipos, o *fimA* II apresentou maior capacidade de adesão e invasão por cepas (AMANO, 2007). Além disso, o genótipo *fimA* II também demonstrou capacidade de degradar moléculas sinalizadoras relacionadas à integrina, paxilina e quinase de adesão focal (FAK), prejudicando a migração e proliferação celulares (AMANO, 2007; AMANO et al., 2004). No entanto, estes dados não foram confirmados em estudo realizado no Brasil, onde não houve associação entre o genótipo *fimA* e a capacidade de adesão ou de invasão da cepa de *P. gingivalis* (UMEDA et al., 2006).

O genótipo *fimA* IV, por sua vez, apresentou elevada capacidade de hemaglutinação, sendo considerada também como fator de virulência, haja vista a correlação entre o processo de adesão da bactéria às células do hospedeiro e a aquisição de ferro (CUTLER; KALMAR; GENCO, 1995; EICK et al., 2002). *P. gingivalis* produz, no mínimo, cinco moléculas com características de hemaglutininas, que auxiliam na colonização, mediante ligação aos receptores (oligossacarídeos) das células humanas, quando expressas na superfície celular bacteriana (LAMONT; JENKINSON, 1998).

A diversidade genotípica de *P. gingivalis* pode ser demonstrada também pela detecção do operon *ragAB*. Este codifica duas proteínas imunogênicas da membrana mais externa da parede celular, relacionadas ao reconhecimento e à aquisição de nutrientes (carboidratos e glicoproteínas específicas), e está inserido em uma região com características de ilha de patogenicidade (CURTIS; HANLEY; ADUSE-OPOKU, 1999; HANLEY; ADUSE-OPOKU; CURTIS, 1999). O gene *ragA* codifica uma proteína imunogênica de 115 kDa, homóloga aos receptores associados ao sistema de transporte *TonB* de bactérias Gram negativas. *RagA* é co-transcrito com *ragB* (CURTIS; HANLEY; ADUSE-OPOKU, 1999), que codifica uma proteína (55 kDa) cuja expressão foi detectada na membrana mais externa em 9 dentre 15 cepas de *P. gingivalis* (MILLAR et al., 1993). A expressão do *ragAB* é regulada pela elevação da temperatura de 37°C para 41°C, comparável àquela encontrada durante a inflamação tecidual (BONASS et al., 2000; MURAKAMI et al., 2004).

As cepas *ragB* positivas foram encontradas em cerca de 20% dos isolados de *P. gingivalis*, sendo frequentemente detectadas em bolsas periodontais mais profundas do que em bolsas rasas, indicando uma associação do genótipo *ragB* com virulência (ANZAI, 2004; CURTIS; HANLEY; ADUSE-OPOKU, 1999). Entretanto, genes homólogos a *ragB* podem também ser encontrados em outras espécies do ambiente subgengival, já que 20% de sítios positivos para *ragB* apresentaram-se negativos para *P. gingivalis* por PCR (CURTIS; HANLEY; ADUSE-OPOKU, 1999). Foi demonstrado também que cepa *P. gingivalis* W50, que apresenta o operon *ragAB*, apresenta a capacidade de induzir abscessos difusos em animais experimentais, em comparação com outras amostras menos virulentas que causam abscessos circunscritos (EBERSOLE et al., 1995). No entanto, deve ser ressaltado

que não existe relação entre a capacidade de indução de abscessos e de perda óssea periodontal em modelos animais por cepas de *P. gingivalis* (KATZ; WARD; MICHALEK, 1996), possivelmente limitando a relação entre estas amostras *rag*⁺ e o estabelecimento ou progressão da periodontite no homem.

O locus *ragAB* de *P. gingivalis* exibiu características de ser originado por transferência lateral (CURTIS; HANLEY; ADUSE-OPOKU, 1999; HANLEY; ADUSE-OPOKU; CURTIS, 1999). A comparação entre o genoma da cepa virulenta *P. gingivalis* W83 e o da cepa não virulenta ATCC 33277 por *microarray*, revelou que as diferenças principais foram nos genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de polissacarídeos capsulares, bem como em seqüências de inserção, *ragB* e outras ORFs (*open reading frames*) obtidas por transferência genética lateral (CHEN et al., 2004),

A terapêutica para a periodontite crônica usualmente é mecânica, por meio de raspagem e alisamento radiculares e meticulosa orientação de higiene bucal, cujo efeito imediato é o rompimento e desorganização do biofilme dentário subgingival, resultando em melhora das características clínicas, particularmente do nível de inserção clínico e profundidade de bolsas (BROCHUT et al., 2005; CUGINI et al., 2000; DOUNGUDOMDACHA et al., 2001; HAFFAJEE; TELES; SOCRANSKY, 2006; MOMBELLI et al., 2000; PAWLOWSKI et al., 2005; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006; XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000), bem como nos parâmetros microbiológicos (COLOMBO et al., 2005; CUGINI et al., 2000; HAFFAJEE et al., 1997; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006; XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000).

Contudo, em alguns casos, como em pacientes fumantes, os resultados alcançados pela terapêutica mecânica no tratamento da periodontite crônica podem ser comprometidos, evidenciada por perda de inserção e persistência de patógenos mesmo após o tratamento (BORRELL; PAPAPANOU, 2005; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2001; PALMER; MATTHEWS; WILSON, 1999; VAN WINKELHOFF et al., 2001). A maior colonização por periodontopatógenos pode limitar a terapia periodontal, já que a eliminação ou controle destas espécies pode ser mais difícil (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2001). Desta forma, a terapêutica antibiótica pode ser empregada coadjuvante ao tratamento clínico, apresentando resultados clínicos e microbiológicos ainda melhores em comparação ao tratamento mecânico convencional (PALMER; MATTHEWS; WILSON, 1999; WINKEL et al., 2001).

Diversos agentes antimicrobianos têm sido testados na administração sistêmica para o tratamento das doenças periodontais. Contudo, como a microbiota subgingival inclui diversas espécies com diferentes suscetibilidades aos antimicrobianos, foram propostas diversas associações entre fármacos, sendo o metronidazol e a amoxiciclina a principal delas, demonstrando resultados positivos, reduzindo os níveis de várias espécies periodontopatogênicas, bem como melhorando parâmetros clínicos, como profundidade de bolsa, nível de inserção clínico, supuração e sangramento à sondagem (LÓPEZ, 2000; LÓPEZ; GAMONAL, 1998; LÓPEZ et al., 2006; SLOTS, 2004; SLOTS; TING, 2002; WINKEL et al., 2001).

O conhecimento da influência dos genótipos de *P. gingivalis* sobre parâmetros clínicos periodontais e sua relação com o sucesso da terapia periodontal mecânica ou associada à antibioticoterapia pode ser considerado importante no planejamento do tratamento periodontal, particularmente entre pacientes fumantes, haja vista as maiores taxas de insucesso após a terapia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença periodontal e *P. gingivalis*

As doenças periodontais compreendem um grupo de doenças de caráter inflamatório e infeccioso que envolve os tecidos de proteção e sustentação dos dentes. Inicia-se pela inflamação da gengiva, caracterizando a gengivite e, pode evoluir à periodontite, com a perda de inserção óssea e de tecidos moles, com subsequente perda dentária. Em 2005, a *American Academy of Periodontology* apresentou o estado atual da epidemiologia da doença periodontal. Foi estimado que 5 a 20% de qualquer população são portadores de periodontite crônica generalizada avançada, enquanto que a maioria da população sofre de periodontite moderada. Entretanto, esta taxa pode sofrer alterações de acordo com os índices utilizados, particularmente, referindo-se ao nível de inserção clínico e profundidade de bolsa periodontal.

A etiologia é multifatorial, sendo a carga bacteriana bastante complexa com ampla variedade de microorganismos responsáveis pela iniciação e progressão da doença. A microbiota periodontal é composta por diversas espécies bacterianas. No entanto, nem todas são capazes de induzir a doença periodontal. Há comensalismo entre estas espécies bacterianas colonizando o hospedeiro. O surto de doença pode iniciar-se graças ao rompimento do equilíbrio ecológico entre microorganismos e fatores inerentes ao hospedeiro (BURT, 2005; LAMONT; JENKINSON, 1998; SANZ et al., 2004; SLOTS, 1996).

A partir de 1998, com o advento do conhecimento postulado por Socransky et al., em que as bactérias do biofilme subgengival co-existem ou co-habitam em complexos originando ecossistemas, foi possível o delineamento da microbiota e sua relação com a evolução da doença. O Primeiro ou Complexo Vermelho (composto por *P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*) foi fortemente relacionado aos sinais de periodontite crônica avançada, particularmente a profundidade de bolsa e sangramento à sondagem, bem como à produção de enzimas proteolíticas. *T. denticola* foi detectada em camadas superficiais, enquanto que *P. gingivalis* foi detectada em camadas mais profundas. Adicionalmente ao Complexo Vermelho, foi atribuído potencial periodontopatogênico ao *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (BORRELL; PAPAPANOU, 2005; SANZ et al., 2004).

P. gingivalis vêm sendo fortemente associada à patogênese da periodontite. Esta espécie foi encontrada em maior prevalência, proporção e números absolutos em bolsas periodontais profundas em comparação com bolsas rasas e moderadas, havendo relação entre a quantidade de *P.gingivalis* e a profundidade da bolsa periodontal (AMANO et al., 1999; DOUNGUDOMDACHA et al., 2001; SANZ et al., 2004). *P. gingivalis* está presente, em altos níveis, em sítios com sangramento à sondagem e supuração (AMANO et al., 1999; AMANO et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2002).

P. gingivalis é um cocobacilo, pigmentado de negro, Gram negativo, assacarolítico e anaeróbio estrito, dependente de substratos nitrogenados para a obtenção de energia (BEIKLER et al., 2003; LAMONT; JENKINSON, 1998; NAKAGAWA et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2002). Produz múltiplas proteases que podem degradar um grande número de substratos potencialmente importantes no fluido gengival, como colágeno, fibronectina, fibrinogênio, laminina e queratina.

Requer hemina, como fonte de ferro, para o seu crescimento. Por meio de processos proteolíticos, *P. gingivalis* extrai o ferro da hemoglobina, haptoglobina, mioglobina, hemopexina, metemoglobina, oxihemoglobina, albumina, lactoperoxidase, catalase e citocromo C. Sangramento gengival, decorrente da inflamação gengival pode elevar a concentração de hemina subgengival, sendo um fator predisponente ao acúmulo de *P. gingivalis* nos sítios. *P. gingivalis* foi considerado como colonizador tardio ou secundário na cavidade bucal, requerendo que microorganismos antecedentes criassem condições ambientais necessárias ao seu desenvolvimento. Estes pré-requisitos incluíram provisão de sítios de agregação para aderência específica, suprimento de substratos de crescimento, e redução da tensão de oxigênio para baixos níveis, necessários ao crescimento e sobrevivência desta espécie anaeróbia estrita. *P. gingivalis* pode se aderir a várias espécies do biofilme, como estreptococos (*Streptococcus gordonii*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. crista*), *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *T. denticola* e *T. forsythia*, por meios bioquímicos. Estas interações podem ocorrer ainda por inter-relações nutricionais e mecanismos de sinalização intercelulares (LAMONT; JENKINSON, 1998; NAKAGAWA et al., 2002).

Para a detecção de *P. gingivalis* podem ser empregados métodos dependentes ou independentes de cultura. Os exames dependentes de cultura ainda são o *gold standard*, embora estejam em desuso pela baixa sensibilidade e dificuldade de isolamento e pelo tempo despendido (ANZAI, 2004; MISSAILIDIS et al., 2004; SANZ et al., 2004; SLOTS, 2004).

Atualmente, são empregadas sondas de DNA ou PCR para estudos semiquantitativos (CARVALHO et al., 2005; SANZ et al., 2004). PCR é uma técnica rápida, acurada, sensível e específica para a detecção de seqüências de DNA

bacteriano. A sensibilidade do PCR permite a detecção de patógenos periodontais abaixo dos níveis normais de detecção por métodos de cultura, imunofluorescência, ou testes baseados por enzima e sondas de DNA (AMANO et al., 1999; DARBY et al., 2005; SANZ et al., 2004; SLOTS, 2004).

2.1.1 Estudos epidemiológicos de *P. gingivalis*

Alguns estudos têm apresentados dados epidemiológicos da ocorrência de *P. gingivalis*, sendo variável de acordo com a população avaliada, os parâmetros clínicos usados na seleção dos pacientes e o método laboratorial de diagnóstico. Outras diferenças na composição da microbiota subgengival incluíram suscetibilidade genética, mecanismos de defesa específicos e não específicos do hospedeiro, dieta, tabagismo, diferenças culturais, estado sócio-econômico, práticas e cuidados de saúde, hábitos de higiene bucal, tratamento dental e periodontal prévio e acesso aos cuidados odontológicos (HAFFAJEE et al., 2004; LÓPEZ et al., 2004; SANZ et al., 2004).

Ximénez-Fyvie, Haffajee e Socransky (2000), utilizando o método checkerboard de hibridização DNA-DNA, observaram frequência de *P. gingivalis* em 2,8%, sendo duas vezes maior nas amostras de placa subgengival em comparação a supragengival.

Van Winkelhoff et al. (2002) encontraram, utilizando método de cultura bacteriana, *P. gingivalis* em 59,5% dos pacientes com periodontite, comparados aos 10,6% dos pacientes do grupo controle (saudáveis e com gengivite), sendo

fortemente associada à destruição periodontal, bem como a presença de *T. forsythia*. Com exceção de *Campylobacter rectus*, foram ainda encontrados significativamente no grupo de pacientes com periodontite, *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros*.

Haffajee et al. (2004), baseados em índices clínicos e utilizando o método de checkerboard, avaliaram a microbiota de 56.036 amostras de 300 pacientes com periodontite crônica oriundas de 4 países (Suécia n=101; EUA n=115; Brasil n=58; Chile n=26). *P. gingivalis* foi uma das 13 espécies que diferiram significativamente nos países, com a proporção média de 7,5% no Brasil, 11,9% no Chile, 1,6% na Suécia e 6,6% nos EUA. A profundidade de bolsa poderia ser um fator sobre a colonização das espécies bacterianas.

López et al. (2004), comparando a microbiota subgengival de 26 pacientes chilenos e 115 americanos, portadores de periodontite crônica, observaram que a população americana apresentou menores índices de placa, profundidade de bolsa, dentes ausentes e número de fumantes, em comparação à chilena. *P. gingivalis* foi a segunda bactéria mais prevalente, sendo somente menos detectada que *P. melaninogenica*. Espécies do Complexo Vermelho colonizaram mais de 75% de todos os sítios, sendo mais prevalentes na população chilena, enquanto que espécies do gênero *Actinomyces* foram mais prevalentes em americanos. *P. gingivalis* foi relacionada à profundidade de bolsa. Chilenos albergaram 20% a mais de espécies do Complexo Vermelho em comparação aos americanos, apresentando baixo status sócio-econômico e consequentemente menor acesso aos serviços de saúde bucal, refletindo condições geográficas e sócio-culturais.

Estudos epidemiológicos no Brasil demonstraram que a prevalência de *P. gingivalis* é relativamente elevada nos pacientes portadores de periodontite crônica, sendo similar em outras populações latino-americanas (LÓPEZ et al., 2004), em comparação com outras localidades geográficas (Suíça e Estados Unidos) (HAFFAJEE et al., 2004). Cortelli et al. (2005) encontraram *P. gingivalis* em 68% dos pacientes com periodontite crônica (121 de 178 pacientes).

2.1.2 Fatores de virulência de *P. gingivalis*

Não somente a presença ou quantidade de microrganismo resultaria em maior severidade de doença. Outros fatores característicos da virulência do microorganismo poderiam induzir à doença. Há evidências de que a diversidade fenotípica e genotípica de *P. gingivalis* tem reflexo no potencial de virulência da bactéria e conseqüentemente na capacidade de destruição periodontal (AMANO et al., 2001). Fímbrias são componentes filamentosos distribuídos sobre a superfície celular de *P. gingivalis*, considerados potentes fatores de virulência, por participarem da modulação da resposta imune do hospedeiro e particularmente na adesão da bactéria aos tecidos periodontais e subsequente colonização (AMANO et al., 1999).

Entre os métodos empregados para genotipagem da bactéria destacam-se a tipagem baseada na seqüência de nucleotídeos do gene *fimA* (AMANO et al., 1999; AMANO et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2002), e a detecção de cepas apresentando o operon *ragAB* (ANZAI, 2004; CURTIS; HANLEY; ADUSE-OPOKU, 1999).

A fímbria principal é codificada pelo gene *fimA*. São conhecidos seis subtipos (tipos I, II, III, IV, V e Ib). Alguns estudos identificaram o genótipo *fimA* II como o mais prevalente entre isolados de pacientes com periodontite crônica: Amano et al. (1999) encontraram em 68,4% dos pacientes; Amano et al. (2000) em 66,1% dos pacientes; Beikler et al. (2003) em 38,2%; Missailidis et al. (2004) em 47%; Zhao et al. (2007) em 43,6%. No Brasil, Missailidis et al. (2004) identificaram o genótipo Ib como o segundo mais prevalente entre pacientes com periodontite (19,6%), enquanto que no Japão, Amano et al. (2000) encontraram o genótipo IV (16,5%) em prevalência inferior apenas ao tipo II. No Japão, o genótipo *fimA* I foi relacionado com pacientes saudáveis (AMANO et al., 2004), diferindo dos resultados encontrados no Brasil (MISSAILIDIS et al., 2004). Essa diferença entre estudos no Japão e Brasil poderia refletir diferente padrão de colonização em indivíduos de diferentes etnias.

Amano et al. (1999) encontraram maior prevalência de *fimA* II (58,9%), seguidos de *fimA* IV (12,3%), *fimA* III (6,8%) e *fimA* I (5,4%). Os genes *fimA* I e II foram encontrados juntos em 6,8% das bolsas, e os genes *fimA* II e IV em 2,7%. A incidência total de genótipo *fimA* II foi de 68,4% (58,9% + 6,8% + 2,7%), indicando que mais de 2/3 dos pacientes apresentaram *P. gingivalis* com genótipo *fimA* tipo II, utilizando-se primers 16S rRNA no PCR, suportando sua especificidade. Foi observada relação significativa entre a presença de *fimA* II e profundidade de bolsa (maiores ou iguais que 8 mm).

Amano et al. (2000) encontraram significantes relações entre as presenças dos genótipos *fimA* I (50,7%) e V (12,3%) em pacientes saudáveis e, *fimA* II (49,6%) e IV (16,5%) em pacientes com periodontite (profundidade de bolsa maior que 5 mm).

Nakagawa et al. (2000) detectaram o genótipo *fimA* V em 16,4% (12 de 73) pacientes *P. gingivalis* positivos, utilizando primers específicos para PCR, sugerindo sua relação com a doença periodontal.

Nakagawa et al. (2002) detectaram a presença de *P. gingivalis* em 192 de 210 pacientes japoneses (91,4%) com periodontite, saudáveis ou portadores de deficiências mentais (Síndrome de Down ou retardo mental), sendo que destes, 47,4% apresentaram o genótipo *fimA* II, 13,5% o genótipo *fimA* Ib e 11,9% a coexistência dos genótipos *fimA* II, Ib e IV. Os genótipos *fimA* II, IV e Ib foram encontrados em número significativo em pacientes com periodontite, enquanto que os genótipos *fimA* I e V em pacientes saudáveis. O genótipo *fimA* Ib foi considerado uma variante clonal do genótipo *fimA* I, haja vista a elevada homologia inerente as bases de suas seqüências de nucleotídeos e imunorreatividade, fortemente associado à periodontite, sendo um fator que predispõe ao desenvolvimento da doença.

Em contrapartida, avaliando a população caucasiana, Beikler et al. (2003) detectaram *P. gingivalis* em 50,25% dos pacientes portadores de periodontite, dos quais 38,2% apresentaram o genótipo *fimA* II e 25,5% o genótipo *fimA* I. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o genótipo *fimA* e profundidade de bolsa (4 a 6 mm ou maiores que 7 mm), sangramento a sondagem ou número de dentes.

Em estudo no Brasil, os sítios periodontais apresentando *P. gingivalis* genótipo *fimA* II apresentavam profundidade de bolsa periodontal de 7.27mm $\pm$ 1.83 enquanto os sítios apresentando outros genótipos de *P. gingivalis* apresentavam profundidade de 6.62mm $\pm$ 1.18 (ANZAI, 2004). No entanto, a diferença nos valores médios de profundidade de bolsa entre os dois grupos não foi significativa. Os resultados estão de acordo com estudo prévio realizado na Finlândia, em que não foi

detectada relação significativa entre severidade da periodontite e o genótipo *fimA* (BEIKLER et al., 2003).

Missailidis et al. (2004) observaram a ocorrência de genótipos *fimA* em 146 de 302 amostras subgengivais obtidas de 102 pacientes com diferentes condições periodontais, utilizando primers específicos 16S rRNA para PCR. Dos 57 pacientes portadores de periodontite, *P. gingivalis* foi detectada em 51 (89,4%). O genótipo *fimA* II foi o mais prevalente em pacientes com periodontite (37,3%), seguido pelo genótipo *fimA* Ib (19,6%). O genótipo *fimA* IV foi comumente encontrado dentre os pacientes com gengivite, e o *fimA* V não foi detectado na população estudada. Genótipos múltiplos foram detectados em 6,1% dos sítios, enquanto que nenhum genótipo foi identificado em 17,8%.

Baseados na premissa de que a adesão às células epiteliais é passo chave no processo de colonização e a propriedade de invasão poderia habilitar a bactéria a escapar das defesas do hospedeiro, Umeda et al. (2006) avaliaram as habilidades de adesão e invasão dos genótipos de fímbrias de *P. gingivalis* em células KB. Apesar do genótipo *fimA* II ter apresentado elevada eficiência de adesão, não houve correlação entre a habilidade de invasão e os genótipos *fimA*, indicando que outros fatores relacionados à elevada habilidade de colonização ou evasão das resposta do hospedeiro poderiam explicar a elevada prevalência e proporção de genótipos *fimA* II nos sítios periodontais.

Zhao et al. (2007) detectaram *P. gingivalis* em 22,1% em pacientes com periodonto saudável e em 81,7% dos pacientes com periodontite crônica. O genótipo *fimA* I (66,7%) foi encontrado como mais prevalente em pacientes com periodonto saudável, enquanto que os genótipos *fimA* II e IV foram os mais prevalentes no grupo de pacientes com periodontite crônica (43,6 e 30,9%, respectivamente). Foi

observada a co-existência de *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia* em sítios *fimA* II positivos.

Recentemente, Nakano et al. (2008) demonstraram a presença de *P. gingivalis* em 10,4% de amostras cardiovasculares (válvulas cardíacas e placas ateromatosas) e em 50% de amostras de placa dentária. O genótipo *fimA* II foi detectado em 35,7%, seguido pelos genótipos *fimA* I (28,6%) e IV (21,4%) nas amostras de placa dentária. Os genótipos *fimA* IV e II foram encontrados com frequência considerável nas amostras cardiovasculares (45 e 30%, respectivamente), sugerindo o possível papel destes genótipos na iniciação e progressão de doenças cardiovasculares.

O operon *ragAB* de *P. gingivalis* codifica proteínas de membrana externa imunogênicas e relacionadas à aquisição de nutrientes. Está inserido em uma região com características de ilha de patogenicidade (CURTIS; HANLEY; ADUSE-OPOKU, 1999), e as cepas *rag B+* são encontradas em cerca de 20% dos isolados de *P. gingivalis*, sendo a sua presença associada com a maior perda periodontal (ANZAI, 2004; CURTIS; HANLEY; ADUSE-OPOKU, 1999). Em estudo no Brasil, foi demonstrado que os sítios periodontais albergando cepas de *P. gingivalis ragB+* apresentavam média de profundidade de bolsa de 7.9 ± 0.6 mm enquanto os sítios albergando cepas da bactéria *ragB-* apresentavam em média 6.8 ± 1.7 mm de profundidade de bolsa, e estas diferenças foram estatisticamente significantes. Além disso, as amostras *ragB+* somente foram detectadas em pacientes com periodontite (ANZAI, 2004), ao contrário das amostras do genótipo *fimA* II que também foram detectadas em pacientes com gengivite, embora em baixa prevalência (MISSAILIDIS et al., 2004). Não foi detectada relação entre genótipo *fimA* e a presença do gene

ragB , sendo que em amostras de *P. gingivalis* isoladas no Japão e Brasil, o genótipo *ragB*⁺ foi distribuído em diferentes genótipos *fimA* (ANZAI, 2004).

Segundo Curtis, Hanley e Aduse-Opoku (1999), a presença do locus *rag* em isolados clínicos apresenta distribuição muito restrita. *P. gingivalis* foi detectada em 5 de 67 amostras oriundas de 4 em 33 pacientes com periodonto saudável, não sendo detectada a presença do locus *rag*. Em contrapartida, *P. gingivalis* foi detectada em 7 de 30 amostras de sítios com até 4 mm de profundidade e, em 55 de 72 amostras de sítios com profundidade superior a 5 mm. O locus *rag* foi detectado em 30% dos sítios mais profundos, sendo ausente nos sítios menos profundos. A detecção da frequência do locus *rag* foi associada à destruição periodontal, podendo representar potencial virulência da *P. gingivalis*.

Anzai (2004) detectou a presença de *P. gingivalis* em 63 amostras de 27 (25,7%) entre 105 pacientes brasileiros portadores de periodontite. *P. gingivalis* foi detectada ainda em 13 amostras de 5 (12,5%) entre 40 pacientes analisados que apresentaram gengivite, e não foi detectada em 20 sujeitos com periodonto saudável. Foram usadas 64 amostras positivas de *P. gingivalis*, sendo 50 provenientes do Brasil, dos quais 37 amostras de 23 pacientes com periodontite e 13 amostras de 5 pacientes com gengivite e, 8 amostras de pacientes com periodontite crônica e 4 amostras, provenientes da Suécia e Japão, respectivamente, além das cepas W83 e ATCC33277. O locus *ragB* foi identificado em 7 (19%) das 37 amostras e isolado em 4 (17,4%) dos 23 pacientes brasileiros com periodontite. Dentre as 7 amostras positivas para *ragB*, foi realizado PCR para identificação de *fimA*, sendo detectadas *fimA* II (2 amostras), *fimA* I (uma amostra), *fimA* V (uma amostra) e 3 não tipáveis. Duas amostras da Suécia e três do Japão apresentaram *ragB*, além da cepa padrão W83. *RagB* não foi detectado em pacientes com gengivite.

2.2 Tabagismo e doença periodontal

O tabagismo é um fator de risco estabelecido à periodontite e tem sido associado com maior perda óssea e dentária, profundidade de bolsas periodontais e perda de inserção clínica (BORRELL; PAPAPANOU, 2005; BURT, 2005; DARBY et al., 2005; NATTO et al., 2005; VAN WINKELHOFF et al., 2001; ZAMBON et al., 1996). O fumo afeta ainda a habilidade do hospedeiro em controlar a infecção e diminuir a resposta imune sistêmica e local, também especulado pela redução do fluxo sanguíneo gengival, apresentando clinicamente menor sangramento gengival (BORRELL; PAPAPANOU, 2005; DARBY et al., 2005; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2001; VAN WINKELHOFF et al., 2001; ZAMBON et al., 1996).

Tem sido constatada a maior predileção de determinadas espécies subgengivais, como *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, e particularmente de *P. gingivalis* em pacientes fumantes, em comparação aos não fumantes ou ex-fumantes (BORRELL; PAPAPANOU, 2005; COLOMBO et al., 2002; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2001; VAN WINKELHOFF et al., 2001).

Entretanto, Renvert, Dahlén e Wikström (1998), observaram que a resposta microbiológica, bem como a resposta clínica, foi pouco influenciada pelos hábitos de tabagismo, após 6 meses da terapia periodontal, em pacientes fumantes e não fumantes. Fumantes apresentaram maior sangramento (36,5%) em comparação aos não fumantes (22,7%), bem como menor redução estatisticamente significativa da profundidade de bolsa (1,9 e 2,5 mm, respectivamente). Os níveis de *P. gingivalis*,

P. intermedia e *Prevotella nigrescens* foram reduzidos em ambos os grupos, quando comparados ao *baseline*. Contudo, *A. actinomycetemcomitans* demonstrou leve aumento na média aos 6 meses, especialmente notado em fumantes, sendo considerado mais difícil de erradicar.

Haffajee; Socransky (2001) examinaram a prevalência, proporções e níveis de espécies subgengivais em 272 pacientes adultos fumantes ($n=50$), não fumantes ($n=124$) e ex-fumantes ($n=98$). Parâmetros clínicos (acúmulo de placa, gengivite, sangramento à sondagem, supuração, profundidade de bolsa e nível clínico de inserção) foram mensurados, bem como colhidas amostras de placa subgengivais, sendo analisadas 29 espécies subgengivais utilizando-se o método *checkerboard* de hibridização DNA-DNA. Espécies dos Complexos Laranja (*E. nodatum*, *F. nucleatum* ss *vincentii*, *P. intermedia*, *P. micros*, *P. nigrescens*) e Vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*) foram significativamente mais prevalentes nos fumantes do que nos não fumantes ou ex-fumantes, havendo maior colonização nos sítios com profundidade de bolsa menor que 4 mm, sendo um fato inesperado.

Van Winkelhoff et al. (2001), investigando pacientes fumantes e não fumantes, tratados ou não (periodontais), observaram que os fumantes não tratados apresentaram maior do índice de placa (significante) em comparação aos não fumantes não tratados. Bolsas mais profundas e maiores perdas de inserção foram observadas nos fumantes tratados, em comparação aos não fumantes tratados. Relações significantes foram encontradas entre fumo e detecção de *T. forsythia*, *P. micros* e *C. rectus*, na ausência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. Estas observações sugeriram que o controle da infecção periodontal insuficiente em fumantes pode ser causada pela persistência de bactérias periodontais comensais.

Colombo et al. (2002) avaliaram, pelo método de checkerboard de hibridização DNA-DNA, a microbiota de 25 pacientes brasileiros portadores de periodontite crônica, dos quais 20% eram fumantes, com profundidade de bolsas maiores que 4 mm e perda de inserção clínica de 3 mm. Como grupo controle, foi analisada a microbiota de 14 pacientes saudáveis, dos quais 15% eram fumantes. Os pacientes com periodontite apresentaram médias mais elevadas significativas em profundidade de bolsa, nível clínico de inserção e sangramento nos sítios interproximais. Houve maior detecção de *P. gingivalis* (67%) em sítios de pacientes com periodontite em relação aos sítios de pacientes saudáveis, apresentando forte correlação, assim como a identificação de *T. forsythia*, entre profundidade de bolsa, nível clínico de inserção, sangramento, acúmulo de placa e supuração.

Natto et al. (2005) não relacionaram o tabagismo com o aumento na detecção de espécies da microbiota subgengival, avaliando 198 pacientes com diversos hábitos (arguile, cigarro, ambos associados, e comparados com não fumantes). Não foram constatadas diferenças entre os tipos de tabagismo com relação à ocorrência de patógenos periodontais, sugerindo que esta microflora é independente do uso do tabaco. Foi observada maior relação entre a presença de periodontopatógenos e bolsas periodontais mais profundas em fumantes em comparação aos não fumantes. Dos pacientes com bolsas profundas, 84% eram fumantes. Foi observada elevada prevalência de *P. micros*, seguida de *T. denticola*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *Streptococcus intermedius* e baixos níveis de detecção de *T. forsythia* e *P. gingivalis*.

Com base nessas observações, pode-se especular que o fumo, dentre outros fatores, pode ser importante na decisão de tratar pacientes portadores de periodontite severa com antibióticos sistêmicos.

2.3.1 Tratamento periodontal convencional (RAR) e controle da microbiota

A microbiota supragengival pode hospedar putativos patógenos periodontais, sugerindo um possível papel deste meio como reservatório de todas as espécies subgengivais para a difusão, propagação ou re-infecção de sítios periodontais. Particularmente o Complexo Vermelho, constituído por *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, necessita de outros complexos ecológicos microbianos para o seu desenvolvimento (SOCRANSKY et al., 1998; XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000). Segundo Ximénez-Fyvie, Haffajee e Socransky (2000), patógenos periodontais podem ser detectados na placa supragengival de sítios onde amostras subgengivais foram negativas para as mesmas espécies.

Em concorde a Haffajee, Teles e Socransky (2006), a modificação do habitat pode ser alcançada pelo tratamento periodontal (RAR) ou outros procedimentos mecânicos, como cirurgias ou terapia periodontal de suporte (manutenção periodontal, através da profilaxia profissional supragengival), podendo reduzir a recolonização dos patógenos na placa supragengival antes da extensão microbiana às áreas subgengivais. Segundo Teles, Haffajee e Socransky (2006), o controle de placa supragengival poderia reduzir o grau de inflamação gengival e o fluxo de fluido gengival, reduzindo assim a fonte de nutrientes às espécies subgengivais. Por meio do controle de placa supragengival, foi citada a redução do número total de microorganismos subgengivais, da frequência de detecção de diversas espécies, incluindo as do Complexo Vermelho e particularmente *P. gingivalis*, e aumento dos

microorganismos Gram positivos. Estes efeitos benéficos foram observados em bolsas mais profundas, apresentando menor impacto em bolsas rasas ou moderadas. Esta modalidade terapêutica foi insuficiente para evitar a progressão da doença.

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos do tratamento periodontal não cirúrgico, através da avaliação e monitoramento de critérios clínicos e microbiológicos. O tratamento baseado no meticuloso controle do biofilme supragengival, promovido pela raspagem e alisamento radiculares foi capaz de melhorar parâmetros clínicos, como a profundidade de bolsa, nível de inserção clínica, e os índices de placa, sangramento e supuração, além de induzir a redução do número de microrganismos subgengivais, inclusive *P. gingivalis* (BROCHUT et al., 2005; CUGINI et al., 2000; DOUNGUDOMDACHA et al., 2001; HAFFAJEE; TELES; SOCRANSKY, 2006; MOMBELLI et al., 2000; PAWLOWSKI et al., 2005; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006; XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000). Também foi demonstrada a importância da manutenção da adequada higiene bucal após o tratamento periodontal, evitando a recorrência da infecção periodontal (BROCHUT et al., 2005; CARVALHO et al., 2004; CUGINI et al., 2000; DOUNGUDOMDACHA et al., 2001; EHMKE et al., 2005; HAFFAJEE et al., 1997; SOCRANSKY et al., 1998; XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000).

Estudos de preservação microbiológica também indicaram a importância do controle de placa como fator de sucesso ao tratamento periodontal. Foi possível detectar a diminuição na prevalência e nível de alguns patógenos entre eles *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *C. rectus* e *A. actinomycetemcomitans*, e aumento na prevalência de espécies consideradas benéficas como do gênero

Actinomyces e *Veillonella parvula*, após 9 e 12 meses do tratamento periodontal (raspagem e alisamento radicular) (COLOMBO et al., 2005; CUGINI et al., 2000; HAFFAJEE et al., 1997; XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000). Porém a microbiota associada à doença não é alcançada na grande maioria das bolsas periodontais profundas apenas com o tratamento periodontal conservador (SLOTS; TING, 2002; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006).

Haffajee et al. (1997) observaram significativo decréscimo na porcentagem de sítios exibindo vermelhão gengival (68 para 57%), no sangramento à sondagem (58 a 52%), e na média na profundidade de bolsa (particularmente nas bolsas maiores que 4 mm), bem como ganho na média do nível de inserção clínica aos 3 meses pós-tratamento (RAR) na fase de manutenção (profilaxia e raspagem supragengivais). Não fumantes ou ex-fumantes apresentaram melhores respostas clínicas significativas em comparação aos fumantes. A média da prevalência dos níveis de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* foram significativamente reduzidos após a RAR, especialmente em não fumantes ou ex-fumantes, enquanto que houve aumento da prevalência em fumantes.

Takamatsu et al. (1999), observaram a redução significativa da frequência de *P. gingivalis*, de 65,4% no exame inicial para 22,1% após 1 mês do tratamento periodontal (RAR e OHB), em sítios de pacientes com periodontite. Foram observadas ainda reduções estatisticamente significantes em profundidade de bolsa, nível clínico de inserção e sangramento à sondagem.

Cugini et al. (2000) observaram a redução na prevalência de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *Selenomonas noxia*, por meio do método *checkerboard* de hibridização DNA-DNA, em 32 pacientes pelo período de 12 meses. Os pacientes

receberam RAR e profilaxia supragengival aos 3, 6, 9 e 12 meses após a terapia. Houve redução da média de profundidade de bolsa (de $3,2 \pm 0,3$ mm) no exame inicial para $2,9 \pm 0,3$ mm aos 12 meses. A média do nível clínico de inserção apresentou significativa redução aos 6 meses, mas não diminuiu adicionalmente. Sangramento à sondagem e índice de placa foram significativamente reduzidos aos 12 meses. Os resultados sugeriram que a fase de manutenção da terapia pode ser essencial na consolidação da melhora clínica e microbiológica alcançada como resultado da terapia inicial.

Avaliando o efeito da remoção de placa profissional supragengival administrada semanalmente após a terapia periodontal (RAR), Ximénez-Fyvie et al. (2000), observaram redução significativa da média da proporção dos sítios exibindo acúmulo de placa, vermelhão gengival e sangramento à sondagem e redução significativa de *P. gingivalis* e outras espécies periodontopatogênicas. Reduções nas contagens destas espécies também foram observadas nas amostras de placa supragengivais, criando um perfil comparável ao observado na saúde periodontal. Este perfil foi mantido na consulta de monitoramento final, após 9 meses da conclusão da terapêutica periodontal.

Doungudomdacha et al. (2001) observaram redução do número de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* (de 86 a 99%) após 3 a 6 meses do tratamento (RAR) e manutenção periodontais (raspagem e profilaxia supragengivais), por meio da técnica de PCR quantitativo, de 541 sítios em 50 pacientes portadores de periodontite crônica. Relacionado à manutenção periodontal, houve melhora na profundidade de bolsa em sítios profundos (76%) e melhora do nível clínico de inserção (60%), embora não ocorrendo em outros

parâmetros clínicos. A contagem de *P. gingivalis* no exame inicial foi associada com profundidade de bolsa e perda de inserção.

Colombo et al. (2005) observaram reduções significantes no nível clínico de inserção, profundidade de bolsa, porcentagem de sítios com placa visível, sangramento à sondagem e supuração aos 3 meses após o tratamento periodontal (RAR), seguidos de manutenção (controle de placa supragengival). Foram observadas reduções significantes nas prevalências e níveis de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. rectus* e *A. actinomycetemcomitans*. Após 9 meses do tratamento, houve leve aumento no índice de placa visível e sangramento à sondagem. O tratamento periodontal (RAR) não erradicou as espécies envolvidas na infecção periodontal e a recolonização ocorreu rapidamente. Entretanto, a manutenção periodontal (controle de placa supragengival) foi importante na manutenção da microbiota subgengival em baixos níveis.

Fujise et al. (2005) identificaram 160 sítios positivos para *P. gingivalis* em pacientes portadores de periodontite crônica, com profundidade de bolsa maior que 4 mm e sangramento à sondagem, dos quais foram identificados genótipos únicos. Realizado o tratamento periodontal, *P. gingivalis* não foi detectada em 96 dos sítios (redução de 60%). Dos 64 sítios com *P. gingivalis* (40%), foi observada a persistência de *T. forsythia* e do genótipo *fimA* I, demonstrando relação significativa desta última com a persistência do sangramento à sondagem, sendo considerado um agente predisponente.

2.3.2 Tratamento periodontal convencional (RAR) e controle da microbiota no paciente tabagista

Fumantes apresentaram menor resposta clínica favorável ao tratamento periodontal e a eliminação e controle de certos microrganismos foi mais difícil. Nestes casos, a manutenção periodontal (profilaxia supragengival e raspagem e alisamento radiculares) torna-se imprescindível para manter baixos os níveis destes patógenos (HAFFAJEE, SOCRANSKY, 2001; HAFFAJEE et al., 1997; PALMER; MATTHEWS; WILSON, 1999; WINKEL et al., 2001).

Darby et al. (2005) observaram que pacientes não fumantes apresentaram melhores índices clínicos estatisticamente significantes (profundidade de bolsa e sangramento à sondagem). Entretanto, os pacientes fumantes apresentaram melhor índice de higiene bucal, quando comparados aos não fumantes, apesar da pobre reparação periodontal, provavelmente pela influência sistêmica do tabagismo sobre o hospedeiro, além da presença de sinais da recorrência da inflamação gengival mais rápida. A redução da porcentagem de *P. gingivalis* não foi significativa em ambos grupos. Em vista da resposta deficiente de reparação tecidual frente ao tratamento, foi recomendada a instituição do tratamento periodontal não-cirúrgico (raspagem e alisamento radiculares).

2.4.1 Tratamento periodontal convencional (RAR) associado ao antibiótico

Alguns patógenos periodontais, dentre elas as espécies que compõem o Complexo Vermelho não são eliminadas normalmente pelo tratamento periodontal

convencional (RAR), sendo necessária a terapia periodontal de suporte (manutenção periodontal) e a utilização de antibióticos em conjunto (HAFFAJEE; TELES; SOCRANSKY, 2006; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006).

A administração sistêmica (por via oral) de antibióticos vem sendo amplamente utilizada no tratamento das infecções periodontais, e reportados seus efeitos benéficos. Entretanto, foram apresentados resultados satisfatórios ou não. Dentre as causas do insucesso da terapêutica antibiótica, foram associadas a persistência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*; a ineficiente ação no interior do biofilme dentário, haja vista a maior resistência bacteriana no biofilme (ecossistema organizado com a ajuda de glicocálix intercelular) do que no estado planctônico (célula simples), havendo a necessidade da desestruturação ou rompimento mecânico do biofilme para que o antibiótico seja efetivo; a dificuldade do antibiótico em alcançar níveis elevados no sítio da infecção; acesso limitado à superfície radicular e capacidade de invasão aos tecidos por algumas espécies (EHMKE et al., 2005; FERES et al., 2001; FERES et al., 2002; SOCRANSKY, HAFFAJEE, 2002; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006); e, a possibilidade do desenvolvimento da resistência antibiótica (FERES et al., 2001; FERES et al., 2002; SLOTS, 2004; SLOTS; TING, 2002). Nesta perspectiva, foi recomendada a associação entre o tratamento periodontal não cirúrgico e a terapêutica antibiótica, incrementando os efeitos clínicos e microbiológicos do tratamento periodontal (raspagem e alisamento radiculares) (CARVALHO et al., 2004; CARVALHO et al., 2005; EHMKE et al., 2005; FERES et al., 2001; FERES et al., 2002; HAFFAJEE; TORRESYAP; SOCRANSKY, 2007; SLOTS, 2004; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006).

A terapia antibiótica sistêmica no tratamento das infecções periodontais tem sido baseada na premissa de que microrganismos específicos causam doença periodontal destrutiva, dentre eles *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Eikenella corrodens*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* (BEIKLER et al., 2004; EHMKE et al., 2005; SLOTS, 2004; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006). Entretanto, a eliminação seletiva dos patógenos periodontais não foi alcançada, sem alterar as espécies compatíveis com o hospedeiro (LÓPEZ et al., 2006). Foi enfatizada a importância da identificação e conhecimento da composição da microbiota subgengival para a adequação da instituição do tratamento específico (periodontal e antibiótico associado) (LÓPEZ et al., 2004; SLOTS, 2004; SLOTS; TING, 2002; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006). Slots (2004) enalteceu ainda o conhecimento das condições sistêmicas do paciente, para o início do tratamento periodontal seguida pela manutenção periodontal e monitoramento microbiológico, se necessário.

Diversos antibióticos podem ser prescritos, dentre eles as penicilinas (amoxicilina), metronidazol, clindamicina, tetraciclina (doxiciclina), azitromicina, claritromicina e fluoroquinolonas (ciprofloxacina). A eficácia da terapia antibiótica periodontal pode ser determinada pelo espectro antimicrobiano e características fármaco-cinéticas do medicamento, e pelos fatores locais do meio, como a propriedade de ligação do fármaco aos tecidos, relacionamento de outras espécies não patogênicas com o fármaco, a proteção oferecida aos patógenos pelo biofilme, a carga total bacteriana, dentre outros. Dentre as desvantagens da antibioticoterapia sistêmica, foram incluídas a inabilidade do fármaco em alcançar altas concentrações no fluido gengival, aumento do risco de reações adversas, possibilidade de resistência bacteriana e incerta colaboração pelo paciente (SLOTS, 2004).

Clindamicina demonstrou eficácia em periodontite recorrente causada por *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* beta-hemolíticos e vários anaeróbios Gram negativos. Contudo, *E. corrodens* demonstrou-se resistente. A possibilidade de causar colite pseudomembranosa deve ser ponderada. A tetraciclina não apresentou efeito suficiente em infecções mistas, embora tenha possível benefício de inibir collagenases gengivais. Doxíciclina apresentou elevada capacidade de ligação às proteínas e longa meia-vida, enquanto que a minociclina desempenha melhor absorção e penetração nos tecidos. Entretanto, as tetraciclina têm importantes reações adversas sobre dentes e osso, estando contra-indicadas na gestação e em crianças de até 8 anos. Fluoroquinolonas (ciprofloxacina) foram efetivas contra patógenos periodontais, incluindo *A. actinomycetemcomitans*. Penetra facilmente nos tecidos periodontais doentes e no fluido gengival, alcançando elevados níveis, maiores que no soro. Se administrada simultaneamente aos exercícios físicos, pode induzir a tendinopatias, devendo ser evitado. Azitromicina torna-se atrativa, pois é administrada por curto período de tempo, reduzindo a falta de colaboração pelo paciente, exibindo grande capacidade em penetrar nos tecidos periodontais normais ou patológicos. Apresentou elevada atividade contra alguns patógenos periodontais. Entretanto, outras espécies como *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* e cepas de *Peptostreptococcus* podem apresentar resistência (SLOTS, 2004; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006).

Considerações devem ser observadas com relação à alimentação, particularmente nos casos da administração de tetraciclina, azitromicina e fluoroquinolonas, devendo ser antecipada de 1 a 2 horas antes da ingestão do fármaco. O custo também é um fator determinante na seleção do antibiótico. Geralmente as penicilinas (amoxicilina), tetraciclina e metronidazol são mais baratos,

enquanto que a associação entre amoxicilina e ácido clavulânico, azitromicina, claritromicina e ciprofloxacina são mais caros (SLOTS, 2004).

Apesar de pouco estudadas, as penicilinas, particularmente a amoxicilina demonstraram-se efetivas contra os patógenos periodontais (FERES et al., 2001; KURIYAMA et al., 2007; SLOTS; TING, 2002; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006). Entretanto, a associação entre metronidazol e amoxicilina tem sido muito mais efetiva contra periodontopatógenos, particularmente os do Complexo Vermelho, por um período de 12 meses, retornando a contagem aos níveis iniciais (TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006).

O metronidazol apresentou características atrativas no tratamento da periodontite crônica, por tratar-se de um antibiótico de pequeno espectro, sendo indicado no controle da microbiota anaeróbia associada à doença periodontal, particularmente nos sítios com profundidade maior que 4 mm. Diversos trabalhos apresentaram resultados satisfatórios sobre a eficiência quando do metronidazol associado à raspagem e alisamento radiculares, oferecendo maiores benefícios clínicos (redução da profundidade de bolsa, ganho de inserção clínica, sangramento à sondagem e presença de placa visível e supuração) (HAFFAJEE; TORRESYAP; SOCRANSKY, 2007; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006) e microbiológicos (redução dos principais patógenos periodontais como *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) (CARVALHO et al., 2004; CARVALHO et al., 2005; FERES et al., 2001; FERES et al., 2002; SLOTS, 2004; SLOTS; TING, 2002; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006), sendo mais efetivo que a doxiciclina (TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006).

Berglundh et al. (1998) observaram melhora das condições periodontais e supressão de *P. gingivalis* e outros patógenos periodontais como *A.*

actinomycetemcomitans e *P. intermedia*, nos pacientes que receberam tratamento periodontal (RAR) e antibióticos (amoxicilina e metronidazol). A associação das terapias antibiótica sistêmica e mecânica foi mais efetiva que a terapia mecânica sozinha em termos de melhora das características clínicas e microbiológicas da doença periodontal.

Redução da profundidade de bolsa e do nível clínico de inserção foram observados por Feres et al. (2001), em pacientes portadores de periodontite crônica, submetidos ao tratamento periodontal associados à terapêutica antibiótica (metronidazol ou amoxicilina). Redução marcante dos níveis e proporção de *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* foram encontrados durante a administração dos antibióticos. Os autores concluíram que o metronidazol e a amoxicilina foram úteis na redução rápida da quantidade dos patógenos periodontais, embora devam estar associados com outros tratamentos.

Carvalho et al. (2004) notaram que os maiores benefícios clínicos (redução na perda de inserção em bolsas rasas e profundas, na profundidade de bolsa, e na porcentagem de sítios com sangramento à sondagem e supuração) ocorreram quando foi combinado o tratamento periodontal (RAR), metronidazol e profilaxia profissional supragengival semanal. Metronidazol apresentou as melhores respostas clínicas nos sítios com profundidade de bolsa inicial maior de 6 mm.

Em estudo subsequente, Carvalho et al. (2005) apresentaram os resultados microbiológicos das amostras de placa subgengival, reduzindo a média da maioria das 39 espécies em todos os grupos aos 90 dias, em comparação ao exame clínico, utilizando-se o método *checkerboard* de hibridização DNA-DNA. As proporções médias das espécies do Complexo Vermelho diminuíram de 18,4% presente no

exame clínico a 3% aos 90 dias pós-terapia no grupo que recebeu tratamento periodontal (RAR), metronidazol e profilaxia profissional supragengival semanal.

Ehmke et al. (2005) demonstraram que em sítios com profundidade de bolsa maiores ou iguais a 7 mm, que albergaram *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, a terapia antibiótica (metronidazol e amoxicilina) associada à periodontal foi significativamente mais efetiva na redução da porcentagem de sítios mostrando perda de inserção, em comparação a terapia periodontal sozinha. Com relação à progressão da doença (perda de inserção), sítios mais profundos com menor acesso a instrumentação foram beneficiados pela administração de antibióticos, enquanto que a terapia antibiótica pareceu não ter efeito em bolsas mais rasas. Redução significativa de *P. gingivalis* foi observada a partir do décimo dia do tratamento até 3 meses no decorrer da manutenção periodontal (raspagem supragengival).

Haffajee, Teles e Socransky (2006) apresentaram a coletânea de dados do *Forsyth Institute* de 1994 até 2006, baseados na casuística de diversos estudos sobre os efeitos dos tratamentos instituídos na composição da microbiota subgengival. Os pacientes foram divididos pelos diversos tratamentos instituídos. Foram monitorados, clínica e microbiologicamente, 461 sujeitos, divididos em 17 grupos de tratamento, pelo período de 12 meses. Terapia periodontal básica (RAR) foi empregada em todos os grupos. Foram observadas reduções das porcentagens de sítios com sangramento à sondagem e média da profundidade de bolsa, aos 3 meses em comparação ao exame inicial, havendo melhora modesta nos demais parâmetros após 12 meses. A porcentagem de sítios com vermelhão gengival, placa e nível clínico de inserção mostraram leve aumento dos 3 aos 12 meses pós-tratamento, embora significativamente menores que os valores do exame inicial. Os melhores resultados em profundidade de bolsa e NIC foram alcançadas em bolsas

mais profundas e resultados modestos foram conseguidos em bolsas rasas e moderadas. Redução na profundidade de bolsa foi apresentada em 88,6% dos pacientes aos 12 meses, enquanto que 11,4% mostraram a média aumentada. Aproximadamente 2/3 dos pacientes mostraram melhora na média do nível clínico de inserção aos 12 meses. O restante apresentou aumento da perda de inserção. No exame inicial, foram observadas correlações entre a detecção de espécies do Complexo Vermelho, incluindo *P. gingivalis* e bolsas profundas e sangramento a sondagem. Foi também observada correlação significativa entre a redução da contagem de várias espécies, particularmente *P. gingivalis*, e a redução da profundidade de bolsa e ganho de inserção, alcançada aos 3 meses e mantida até 12 meses. A administração sistêmica de antibióticos, em conjunto com outras terapias, apresentou os melhores resultados, auxiliando na redução de profundidade de bolsa e ganho do nível de inserção clínica, reduzindo ainda o risco de progressão da doença, com futura perda de inserção. Apresentaram também as maiores reduções significativas na contagem média de várias espécies bacterianas. Dos pacientes avaliados, 169 foram acompanhados aos 24 meses. Muitos parâmetros clínicos foram mantidos, embora nível clínico de inserção tenha aumentado. O grupo que recebeu antibiótico sistêmico (metronidazol e amoxiciclina) foram os que apresentaram os melhores resultados em profundidade de bolsa e nível clínico de inserção. Houve redução significativa de *P. gingivalis*, e outras espécies do Complexo Vermelho nos pacientes tratados por metronidazol e amoxiciclina. Os antibióticos pareceram ter o máximo benefício entre 3 e 6 meses após a terapia.

Haffajee, Torresyap e Socransky (2007) comparando a administração sistêmica de azitromicina, metronidazol e doxiciclina, cada qual associadas à terapia periodontal (RAR) e somente a RAR (grupo controle) em pacientes com periodontite

crônica, observaram melhora estatisticamente significativa na profundidade de bolsa e nível clínico de inserção aos 3, 6 e 12 meses de tratamento (de todos os grupos), embora muito mais marcante nos grupos metronidazol e azitromicina, em comparação ao grupo controle. Houve aumento da profundidade de bolsa e do nível clínico de inserção no grupo tratado com doxiciclina após 3 meses, tempo no qual foi cessada a administração dos antibióticos. As menores reduções foram observadas em bolsas rasas e as maiores em bolsas profundas (maiores que 6 mm).

Kuriyama et al. (2007) avaliaram a suscetibilidade de 800 isolados oriundos de infecções dentoalveolares de origens endodônticas, periodontais, pericoronarites e infecções pós-operatórias. Deste total, 48 pertenceram ao gênero *Porphyromonas*, sendo suscetível a maioria dos antibióticos. Apenas uma cepa (2,1%) das 48 de *Porphyromonas* foi resistente à amoxicilina. Cefaclor apresentou a menor atividade contra o gênero *Porphyromonas*.

2.4.2 Tratamento periodontal convencional (RAR) associado ao antibiótico no paciente tabagista

A terapêutica medicamentosa com a administração de antibióticos tem sido sugerida como adjuvantes ao tratamento periodontal conservador não-cirúrgico em pacientes fumantes (PALMER; MATTHEWS; WILSON, 1999; WINKEL et al., 2001).

Palmer, Matthews e Wilson (1999) observaram que fumantes apresentaram resposta mais deficiente frente ao tratamento periodontal (RAR), indiferente da aplicação tópica de metronidazol ou administrado sistemicamente. Fumantes

apresentaram reduções significativamente menores nas profundidades de bolsas aos 6 meses em comparação aos não fumantes. Ganho nos níveis de inserção foi de aproximadamente 0,55 mm e não houve diferença estatisticamente significativa entre fumantes e não fumantes. Não houve diferença em quaisquer mensurações clínicas na resposta dos 3 regimes de tratamentos aos 2 e 6 meses entre fumantes e não fumantes. Foi observada a redução na proporção de espiroquetas aos 6 meses, sendo menor em fumantes em comparação aos não fumantes (35,8% e 46,7%, respectivamente).

Winkel et al. (2001) avaliaram o efeito do metronidazol e amoxicilina, administrados sistemicamente, adjunto ao tratamento periodontal, em pacientes portadores de periodontite crônica, fumantes e não fumantes. Os resultados clínicos (redução em profundidade de bolsa e melhora do nível clínico de inserção, em sítios maiores ou iguais que 7 mm) e microbiológicos (redução da porcentagem de *P. gingivalis* de 46% para 11%) foram significativamente melhores no grupo de pacientes que recebeu associação antibiótica em comparação ao que recebeu a terapia periodontal sozinha. Os melhores resultados clínicos em pacientes fumantes foram apresentados naqueles tratados com antibióticos. Estes resultados suportaram a indicação da terapêutica antibiótica em pacientes portadores de *P. gingivalis* e em fumantes.

2.5 Associação antibiótica entre Metronidazol e Amoxicilina

A associação entre o metronidazol e a amoxicilina tem sido usada com sucesso no tratamento da periodontite avançada, angariando efeitos sinérgicos contra a infecção periodontal, incrementando parâmetros clínicos (na redução da profundidade de bolsas e ganho de inserção clínica) e reduzindo significativamente o número de sítios com *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e particularmente *P. gingivalis* (LÓPEZ, 2000; LÓPEZ; GAMONAL, 1998; LÓPEZ et al., 2006; SLOTS, 2004; SLOTS; TING, 2002; WINKEL et al., 2001).

A associação entre metronidazol e ciprofloxacina pode substituir a associação entre metronidazol e amoxiciclina em pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos. Essa associação demonstrou-se efetiva em infecções mistas causadas por anaeróbios e entéricos (SLOTS, 2004).

Winkel, van Winkelhoff e van der Velden (1998) observaram, a priori, a melhoria dos índices de placa, sangramento, profundidade de bolsa e nível clínico de inserção, após a instituição do tratamento periodontal inicial (após 21 semanas do exame inicial). Entretanto, após a administração sistêmica da associação antibiótica entre metronidazol e amoxicilina, foram observadas as maiores melhoras dos índices clínicos, com a completa eliminação da supuração, embora o índice de placa tenha aumentado. Houve a redução de algumas espécies, dentre elas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. intermedia*. De acordo com os resultados obtidos, os pacientes foram divididos em 2 grupos: grupo A, sem níveis detectáveis de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e menos de 5% de *P. intermedia*; e o grupo B, com a presença de uma dessas três espécies ou mais de 5% de *P. intermedia*. Mesmo após a administração dos antibióticos, o grupo B apresentou maiores números significantes dos índices de placa, sangramento, sondagem de bolsa e nível de inserção clínica, em comparação ao grupo A.

López, Gamonal e Martinez (2000) observaram significativa melhora clínica nos pacientes submetidos à terapia antibiótica (grupo teste, com metronidazol e amoxiciclina administrados 7 dias a cada 4 meses), comparados aos pacientes que receberam placebo, os quais apresentaram deterioração do estado periodontal. Após 12 meses, o grupo teste apresentou ganho de inserção (0,43 mm), redução de sítios ativos, da profundidade de bolsas, na porcentagem de sítios com sangramento a sondagem (significantes estatisticamente). Sucessivas perdas de inserção ou abscessos periodontais foram observadas apenas no grupo controle.

Embora Feres et al. (2002) tenham avaliado a possibilidade de resistência bacteriana decorrente da administração associada entre metronidazol e amoxiciclina, a porcentagem média dos isolados resistentes aumentaram durante a administração de antibióticos e retornaram aos níveis iniciais após 90 dias da terapia. As espécies mais resistentes ao metronidazol foram *Actinomyces naeslundii* 1, *Streptococcus constellatus*, *A. naeslundii* 2, *S. mitis*, *S. oralis*, *A. odontolyticus*, *S. sanguis* e à amoxiciclina, *S. constellatus*, *P. nigrescens*, *Eubacterium saburreum*, *A. naeslundii* 1, *S. oralis*, *P. melaninogenica* e *P. intermedia*. A amoxiciclina apresenta-se suscetível a beta-lactamase e esta enzima foi correlacionada com o aumento da profundidade das bolsas periodontais. *P. intermedia*, *T. forsythia* e *Fusobacterium nucleatum* são espécies produtoras de beta-lactamase. Resistência antibiótica ao metronidazol pela *P. gingivalis* não foi reportada, embora determinadas cepas se apresentaram resistentes à amoxiciclina.

Rooney et al. (2002) avaliaram os resultados da administração antibiótica associada ao tratamento periodontal em pacientes portadores de periodontite crônica, divididos em grupos: metronidazol, amoxiciclina, metronidazol e amoxiciclina, e placebo. O grupo que recebeu amoxiciclina e metronidazol apresentou melhorias

significativas dos índices clínicos (redução nos índices de profundidade de bolsa, perda de inserção, sangramento à sondagem e supuração), bem como microbiológicos (redução estatisticamente significativa na porcentagem de *P. intermedia*) em comparação com os demais grupos.

López et al. (2006) determinaram o efeito do metronidazol associado à amoxicilina, avaliando parâmetros microbiológicos e clínicos em 22 pacientes portadores de periodontite crônica, os quais foram divididos em dois grupos, um recebendo antibióticos (grupo estudo) e outro recebendo tratamento periodontal e placebo (grupo controle), embora ambos grupos tenham recebido orientação da higiene bucal e raspagem supragengival no exame inicial. Foram observadas melhorias clínicas (maior redução das médias de profundidade de bolsa, perda de inserção e de sangramento à sondagem), bem como redução da quantificação dos patógenos, incluindo as espécies do Complexo Vermelho, mensurados pela técnica de hibridização DNA-DNA *checkerboard*, sem, entretanto, diferenças estatisticamente significantes, no grupo estudo em comparação ao grupo controle, do *baseline* até os 12 meses de acompanhamento. Os autores concluíram que as alterações clínicas e microbiológicas foram similares, após a administração sistêmica de metronidazol e amoxicilina associados como única terapêutica, ou após o tratamento periodontal.

Slots e Ting (2002) recomendaram que, caso os testes microbiológicos não estejam disponíveis, a terapia combinada entre metronidazol e amoxiciclina (250 mg e 500 mg, respectivamente, três vezes ao dia durante 8 dias) pode ser a primeira escolha razoável no tratamento da doença periodontal crônica, sendo a escolha apropriada em 70% dos casos, não afetando, entretanto, *Pseudomonas* e bacilos entéricos. Nestes casos, pode ser prescrito e administrado metronidazol e

ciprofloxacina (500 mg de cada, duas vezes ao dia durante 8 dias), que afeta anaeróbios, bacilos entéricos e *A. actinomycetemcomitans*. Contudo, além da redução de níveis de bactérias periodontopatogênicas, os antibióticos sistêmicos podem promover o crescimento e aumento dos níveis de espécies antibiótico-resistentes, inocentes ou benéficas, como espécies dos gêneros *Streptococcus* ou *Actinomyces*, que são capazes de inibir patógenos periodontais Gram negativos. O metronidazol aumentou a proporção de *S. sanguis*, *S. mutans*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* e *A. viscosus*. Estas espécies não são consideradas periodontopatogênicas, embora apresentem ação cariogênica na superfície radicular, especialmente as espécies do gênero *Streptococcus*.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar os efeitos clínicos (índice de placa, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração) e microbiológicos (referente à presença de *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* II, *fimA* IV e *ragB*) após 180 dias do tratamento periodontal mecânico (RAR) associado à administração sistêmica de antibióticos (M+A), comparados ao tratamento periodontal mecânico (RAR) em pacientes fumantes com periodontite crônica, utilizando-se o PCR convencional (primers específicos para 16S rRNA).

Relacionar a presença de *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* II, *fimA* IV e *ragB* com a profundidade de sondagem (PS) da população estudada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos indivíduos

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação dos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos (UnG) e da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), os quais aprovaram o referido projeto (Anexos A e B, respectivamente).

Vinte indivíduos fumantes portadores de periodontite crônica que compareceram à Clínica Odontológica da Universidade Guarulhos foram selecionados e incluídos neste estudo. A seleção foi realizada por dois alunos do Curso de Pós-Graduação em Odontologia (Nível: Mestrado; Área de Concentração: Periodontia), sob supervisão dos professores da Disciplina. Todos os participantes receberam informação verbal e escrita sobre os objetivos do estudo, riscos e benefícios proporcionados, tipos de medições clínicas, coletas e terapias a serem utilizadas. A participação na pesquisa foi voluntária e os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C), estando de acordo com a Resolução nº 196/96 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde.

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Como critérios de inclusão, os indivíduos fumantes deveriam consumir pelo menos 10 cigarros por dia por um período mínimo de 5 anos (MATARAZZO, 2006), com idade igual ou superior a 30 anos e possuir um mínimo de 15 dentes. Para caracterizar a presença de doença periodontal crônica, o indivíduo deveria apresentar pelo menos 1 sítio interproximal, não contíguo, com PS entre 5 e 7mm e NCI entre 5 e 10mm, por sextante.

Os critérios de exclusão foram: pacientes gestantes ou lactantes; histórico de tratamento periodontal prévio; antibioticoterapia nos últimos seis meses; doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro; condição prévia que exigisse medicação antibiótica profilática ao tratamento; e hipersensibilidade relatada ao metronidazol e/ou à penicilina (MATARAZZO, 2006).

4.2 Avaliação clínica e periodontal

No exame inicial, foi procedido o exame clínico e periodontal com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo e selecionar os sítios-teste. As mensurações foram realizadas por dois examinadores calibrados pelo método de erro padrão da medida e erro médio percentual (MATARAZZO, 2006).

As mensurações clínicas foram realizadas 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 foram:

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

4.3 Coleta microbiológica

4.3.1 Seleção dos sítios testes

Foram selecionados de 6 a 9 sítios em cada voluntário, distribuídos uniformemente de acordo com a profundidade de sondagem inicial nas seguintes categorias de bolsa (2 a 3 sítios por categoria): rasas ($PS \leq 3\text{mm}$), moderadas (PS 4 a 6 mm), e profundas ($PS \geq 7\text{mm}$). Estes sítios foram localizados em faces dentais interproximais não-contíguas, e preferencialmente distribuídos entre os 4 quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endodôntico-periodontal não foram incluídos. Amostras de placa subgengival foram coletadas no *baseline* e 180 dias pós-terapia.

4.3.2 Coleta das amostras de placa subgengivais

Após a profilaxia supragengival (remoção de cálculo e placa), as amostras de placa subgengivais foram retiradas com curetas Gracey estéreis do tipo *minifive* (HuFriedy®), posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único golpe de raspagem no sentido ápico-coronal (MATARAZZO, 2006). As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais, contendo 150µl de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 mM EDTA pH 7,6 (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil), sendo acrescentado 100µl de NaOH (Labsynth) a 0,5M, com o propósito de permanecer a viabilidade do DNA bacteriano por maior período de tempo. Os tubos plásticos foram previamente identificados com o código do indivíduo, data e sítio, e

após a coleta foram armazenados sob refrigeração a -20°C até as amostras serem analisadas por meio da técnica de PCR (16S rRNA) para identificação, *a priori*, de *P. gingivalis* e seus genótipos no Laboratório de Microbiologia Oral do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.4 Delineamento experimental

No exame inicial, os indivíduos ($n=20$) foram submetidos à anamnese, exame clínico periodontal e coleta de amostras do biofilme subgengival dos sítios selecionados. Os indivíduos foram aleatoriamente distribuídos por meio de uma tabela de números equiprováveis nos seguintes grupos terapêuticos:

- Grupo Controle: tratamento periodontal mecânico (RAR) + medicamento placebo sistêmico, administrados 3 vezes ao dia durante 14 dias ($n=11$);
- Grupo Estudo: tratamento periodontal mecânico (RAR) + metronidazol (400 mg) e amoxicilina (500 mg) sistêmicos, administrados 3 vezes ao dia durante 14 dias ($n=9$).

A antibioticoterapia sistêmica foi iniciada no mesmo dia do início da terapia periodontal mecânica (RAR), a qual foi realizada em 6 sessões e concluída em 21 dias. A avaliação clínica e coleta das amostras subgengivais foram repetidas na consulta de reavaliação após 180 dias do término do tratamento.

4.5 Procedimentos terapêuticos

4.5.1 Terapia periodontal básica

Após o registro das mensurações clínicas e coleta de placa subgengival para a análise microbiológica, todos os indivíduos foram submetidos às consultas de adequação do meio bucal, que incluíram orientação da higiene bucal (OHB), raspagem supragengival de todos os dentes, remoção dos excessos de restaurações por desgaste, selamento provisório das lesões cariosas cavitadas, curativos endodônticos e exodontias. Durante as consultas de OHB, os indivíduos foram instruídos a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental Colgate Total® (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Subsequentemente, os indivíduos receberam tratamento periodontal mecânico (RAR) em seis consultas, nas quais foram utilizadas curetas Gracey números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (HuFriedy®), sob anestesia local (HAFFAJEE et al., 1997) com Citocaína 3%® (cloridrato de prilocaína a 3%, felipressina 0,03UI/mL, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Itapira, SP, Brasil). Estas consultas de RAR tiveram duração de aproximadamente 1 hora e foram realizadas em no máximo 21 dias, por dois alunos treinados do Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia da Universidade Guarulhos (MATARAZZO, 2006). Outras necessidades de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da clínica odontológica da própria universidade.

4.5.2 Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos e placebo

Os indivíduos do Grupo Estudo receberam RAR e administração sistêmica (via oral) de 1,2 g/dia de metronidazol (400 mg de 8/8 hs) combinado com 1,5 g/dia de amoxicilina (500 mg de 8/8 horas) por 14 dias, iniciada em conjunto a terapia periodontal básica. Os pacientes do Grupo Controle receberam comprimidos de placebo e foram orientados a seguir o mesmo regime dos pacientes que receberam as substâncias ativas. O antibiótico foi manipulado especialmente para este estudo pela Farmácia de Manipulação Ervanário (Maringá, PR, Brasil), sendo fornecido gratuitamente aos sujeitos da pesquisa. Os pacientes foram monitorados de 4 em 4 dias quanto a reações adversas da medicação e para controle da cooperação na ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, por um aluno de iniciação científica (MATARAZZO, 2006).

4.6 Análise microbiológica

4.6.1 Extração do DNA das cepas controle para identificação e genotipagem de *P.gingivalis*

Como controle positivo, foi utilizado DNA cromossômico das seguintes amostras de *P.gingivalis*: W83 para detecção de *P. gingivalis* e genótipo *rag B*, HW24D-1 para detecção do genótipo *fimA* II e HG564 para detecção do genótipo *fimA* IV.

Alíquotas do estoque congelado de cada uma das cepas em 20% de glicerol em freezer -80°C foram inoculadas em placas de ágar Brucella sangue. As placas foram incubadas sob condições de anaerobiose, durante o período de 10 a 15 dias a 37°C , em câmara de anaerobiose (Plas Lab, Lansing, MI, EUA) em atmosfera de 85% N_2 , 5% CO_2 e 10% H_2 (Oxilumen, São Paulo, Brasil).

Após o desenvolvimento das culturas de *P.gingivalis*, as colônias foram suspensas com auxílio de alças plásticas padronizadas de $1\mu\text{l}$ em $300\mu\text{l}$ de água milliQ estéril em microtubos de centrifuga de 1,5ml. A extração do DNA foi realizada de acordo com o método descrito por Teanpaisan; Douglas (1999). A lise das células foi realizada por imersão dos microtubos por 10 minutos em água fervente, seguindo-se centrifugação por 10 min/ $10.000\times g$ / 4°C . O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de centrifuga e armazenado em freezer -20°C (TEANPAISAN; DOUGLAS, 1999).

4.6.2 Extração de DNA das amostras dos pacientes

Em microtubo de centrífuga de 0,2ml foi adicionado 8,8µl de cada amostra em TE pH 7,6, 1µl de Tween 20 a 5% e 0,2µl de Proteinase K a 10mg/ml. Cada microtubo devidamente identificado foi inserido em termociclador e incubado a 55°C por 2 horas e 95°C por 10min. (DEWHIRST et al., 2000). O DNA purificado foi estocado a -20 °C.

4.6.3 Detecção da presença de *P. gingivalis*

Para determinar a presença de *P.gingivalis*, o DNA das amostras foi submetido à amplificação da região 16S *rRNA*, através da utilização de iniciadores espécie-específicos, homólogos a seqüência de 16S *rRNA* de *P. gingivalis* descritos por Amano et al. (1999) e Amano et al. (2000) cuja seqüência é apresentada na tabela 4.1.

Para cada reação de amplificação foram utilizados 8,75µl de água miliQ; 2,5µl de solução tampão (10x PCR *buffer*); 0,5µl de solução estoque 10mM de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 0,75µl de MgCl₂ cuja concentração foi otimizada para 1,5 mM; 0,25µl de cada *Primer* (iniciador) (25 pM); 0,5µl de *Taq DNA Polymerase* (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil); e 1,5µl de DNA de cada amostra dos pacientes, totalizando de 15µl de reação.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil) com desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguindo-

se 30 ciclos de 94°C por 30 seg., 58°C por 30 seg., 72°C por 30 seg. e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos (AMANO et al., 1999).

Controles negativos e positivos foram incluídos em cada lote de amostras analisadas. O controle negativo foi constituído da mistura padrão de PCR com adição de 1,5µl de água miliQ, e o controle positivo foi obtido utilizando-se a mistura padrão de PCR acrescida da mesma quantidade (1,5µl) de DNA molde da cepa *P. gingivalis* W83, originando um produto de 197bp.

Todos os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE - Tris acetato 40mM, pH 8,5; EDTA 2mM) e corados com brometo de etídio. Os fragmentos específicos de 197bp, correspondentes à detecção de DNA de *P. gingivalis* foram visualizados e documentados sob luz ultravioleta em transiluminador (Pharmacia Biotech, San Francisco, USA).

Tabela 4.1. Sequências dos iniciadores utilizados para determinação de *P.gingivalis*, fímbrias do tipo *fimA* II, *fimA* IV e do gene *ragB* e seus respectivos tamanhos do produto esperado (AMANO et al., 1999 e 2000; NAKAGAWA et al., 2002; HANLEY et al., 1999)

Gene	Iniciadores	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Produto esperado (pb)
<i>P.gingivalis</i> rRNA	Pg rRNAf	5'TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC 3'	197
	Pg rRNAr	5'ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC 3'	
<i>FimA</i> II	<i>fimA</i> II upper	5'ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G 3'	257
	<i>fimA</i> II lower	5'AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A 3'	
<i>FimA</i> IV	<i>fimA</i> IV upper	5' CTA TTC AGG TGC TAT TAC CCA A '3	251
	<i>fimA</i> IV lower	5' AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A '3	
Operon <i>ragAB</i>	<i>ragB2</i>	5'- GAC TCT TGG CTC GTT TAC TG-3' 5'ACG CAA ACG ACT ACC CTC A-3'	436

4.6.4 Análise da presença do gene *fimA* II nas amostras *P. gingivalis* positivas

Nas amostras *P. gingivalis* positivas, foi realizada a detecção do gene *fimA* II. Para cada reação de amplificação foram utilizados 8,75µl de água miliQ; 2,5µl de solução tampão (10x PCR *buffer*); 0,5µl de solução estoque 50mM de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 0,75µl de MgCl₂ cuja concentração foi otimizada para 1,5 mM; 0,25µl (100 pmol de cada *Primer* - 25 pM); 0,5µl de *Taq DNA Polymerase* (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil); 0,25µl de BSA (Biotools, New

England, USA) (ROEUX, 2003; STOMMEL et al., 1997); e 1,5µl de DNA de cada amostra dos pacientes, totalizando de 15µl de reação. As reações de amplificação foram realizadas com um ciclo inicial de 95°C por 5 min, seguidas por 30 ciclos de 94°C por 30s, 58°C por 30s, 72°C por 30s e extensão final a 72°C por 7 minutos (AMANO et al., 1999; AMANO et al., 2000). DNA da amostra padrão HW24D-1 que apresenta o genótipo *fimA* tipo II foi submetido a reação de amplificação como controle positivo, originando um produto de 257bp. Para o controle negativo, foi adicionada 1,5µl de água miliQ.

4.6.5 Análise da presença do gene *fimA* IV nas amostras *P. gingivalis* positivas

Nas amostras *P. gingivalis* positivas, foi realizada a detecção do gene *fimA* IV. Para cada reação de amplificação foram utilizados 8,75µl de água miliQ; 2,5µl de solução tampão (10x PCR *buffer*); 0,5µl de solução estoque 50mM de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 0,75µl de MgCl₂ cuja concentração foi otimizada para 1,5 mM; 0,25µl (100 pmol de cada *Primer* - 25 pM); 0,5µl de *Taq DNA Polymerase* (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil); 0,25µl de BSA (Biotools, New England, USA); e 1,5µl de DNA de cada amostra dos pacientes, totalizando de 15µl de reação. As reações de amplificação foram realizadas com um ciclo inicial de 95°C por 5 min, seguidas por 30 ciclos de 94°C por 30s, 58°C por 30s, 72°C por 30s e extensão final a 72°C por 7 minutos (AMANO et al., 1999). DNA da amostra padrão

HG564 que apresenta o genótipo *fimA* tipo IV foi submetido a reação de amplificação como controle positivo, originando um produto de 251bp. Para o controle negativo, foi adicionada 1,5µl de água miliQ.

4.6.6 Análise da presença do gene *ragB* nas amostras *P. gingivalis* positivas

Para determinar a presença do operon *ragAB* em amostras de *P. gingivalis*, foi realizada a amplificação através da utilização de pares de *primers* específicos, *ragB2* (tabela 4.1) descritos por Hanley, Aduse-Opoku e Curtis (1999).

Para cada reação de amplificação foram utilizados 8,75µl de água miliQ; 2,5µl de solução tampão (10x PCR *buffer*); 0,5µl de solução estoque 10mM de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 0,75µl de MgCl₂ cuja concentração foi otimizada para 1,5 mM; 0,25µl (100 pmol de cada *Primer* - 25 pM); 0,5µl de *Taq Platinun DNA* (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 0,25µl de BSA (Biotools, New England, USA); e 3µl de DNA de cada amostra dos pacientes, totalizando de 16,75µl de reação.

As reações de amplificação foram realizadas com um ciclo inicial de 95°C por 1min. seguido por 30 ciclos de 95°C por 2 min., 50°C por 1min, 72°C por 2 min. e extensão final a 72°C por 5 minutos (HANLEY; ADUSE-OPOKU; CURTIS, 1999).

Controles negativos e positivos foram incluídos em cada lote de amostras analisadas. O controle negativo foi constituído da mistura padrão de PCR com o

DNA molde trocado por 3µl de água estéril (miliQ); o controle positivo foi obtido utilizando-se a mistura padrão de PCR acrescido de 3µl de DNA molde da amostra de *P.gingivalis* W83, originando um produto de 436bp (HANLEY; ADUSE-OPOKU; CURTIS, 1999).

Todos os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE - Tris acetato 40mM, pH 8,5; EDTA 2mM), corados com brometo de etídio, visualizados e documentados sob luz ultravioleta em transiluminador (Pharmacia Biotech, San Francisco, USA).

4.7 Análise Estatística

Para a detecção da frequência de *P. gingivalis* foi usado o teste de McNemar. Para a análise de correlação entre os parâmetros clínicos foi utilizado o teste qui-quadrado. O nível de significância adotado foi 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Resultados baseados na redução dos Parâmetros Microbiológicos (*P. gingivalis*, *fimA* II, *fimA* IV e *ragB*) e Clínicos (IP,SG, SS e SUP)

5.1.1 Efeito do tratamento sobre a detecção de *P. gingivalis*

A distribuição dos sítios periodontais analisados de acordo com a prevalência de *P. gingivalis* na coleta inicial e após 180 dias da terapia está apresentada na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Distribuição dos sítios subgengivais nos exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a detecção de *P. gingivalis* por PCR

Detecção de <i>P.gingivalis</i>		Coleta inicial n (%)					
		RAR			RAR+M+A		
		Sítios +	Sítios -	Total	Sítios +	Sítios -	Total
Coleta 180 dias após a terapia	Sítios +	36 (38,3%)	20 (21,3%)	56 (59,6%)	27 (37%)	12 (16,4%)	39 (53,4%)
	Sítios -	20* (21,3%)	18 (19,1%)	38 (40,4%)	6* (8,2%)	28 (38,3%)	34 (46,6%)
	Total	56 (59,6%)	38 (40,4%)	94 (100%)	33 (45,2%)	40 (54,8%)	73 (100%)

*p=0,079.

Após 180 dias do tratamento, houve redução na prevalência de *P. gingivalis* nos sítios do grupo RAR, de 59,6 para 21,3%. O grupo RAR+M+A apresentou redução na prevalência de 45,2 e 8,2%, nas coletas inicial e final, respectivamente). Apesar das diferenças, após análise estatística (teste qui-quadrado), não foi detectada diferença significativa (p=0,079), na prevalência de *P. gingivalis* após os dois tratamentos.

5.1.2 Efeito do tratamento sobre a detecção do genótipo *fimA* II de *P. gingivalis*

A distribuição dos sítios periodontais analisados de acordo com a detecção do genótipo *fimA* II na coleta inicial e após 180 dias da terapia está sintetizada na tabela 5.2.

Tabela 5.2. Distribuição dos sítios subgengivais nos exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a detecção do genótipo *fimA* II de *P. gingivalis* por PCR

<i>FimA</i> II		Coleta inicial n (%)					
		RAR			RAR+M+A		
		Sítios +	Sítios -	Total	Sítios+	Sítios -	Total
Coleta 180 dias após a terapia	Sítios +	0	2 (3,6%)	2 (3,6%)	1 (3,0%)	8 (24,2%)	9 (27,3%)
	Sítios -	4* (7,1%)	50 (89,3%)	54 (96,4%)	4** (12,1%)	20 (60,6%)	24 (72,7%)
	Total	4 (7,1%)	52 (92,9%)	56 (100%)	5 (15,2%)	28 (84,8%)	33 (100%)

*p=0,687; **p=0,388.

Referente à detecção do genótipo *fimA* II, o grupo RAR apresentou redução completa (100%). No entanto, o grupo RAR+M+A apresentou redução parcial, de 15,2 para 12,1%. Após análise estatística (teste qui-quadrado), não foi detectada diferença significativa (p=0,687 e p=388, referente aos grupos experimentais I e II,

respectivamente), na prevalência do genótipo *fimA* II de *P. gingivalis*, após os dois tratamentos.

5.1.3 Efeito do tratamento sobre a detecção do genótipo *fimA* IV de *P. gingivalis*

A distribuição dos sítios periodontais analisados de acordo com a detecção do genótipo *fimA* IV de *P. gingivalis* na coleta inicial e após 180 dias da terapia está apresentada na tabela 5.3.

Tabela 5.3. Distribuição dos sítios subgengivais nos exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a detecção do genótipo *fimA* IV de *P. gingivalis* por PCR

<i>FimA</i> IV		Coleta inicial n (%)					
		RAR			RAR+M+A		
		Sítios +	Sítios -	Total	Sítios+	Sítios -	Total
Coleta 180 dias após a terapia	Sítios +	1 (1,8%)	0	1 (1,8%)	0	0	0
	Sítios -	5* (8,9%)	50 (89,3%)	55 (98,2%)	0	33 (100%)	33 (100%)
	Total	6 (10,7%)	50 (89,3%)	56 (100%)	0	33 (100%)	33 (100%)

*p=0,063.

Houve redução na detecção do genótipo *fimA* IV de *P. gingivalis* nos sítios do grupo RAR, de 10,7 para 8,9%. O grupo RAR+M+A não apresentou sítios com o genótipo *fimA* IV detectável. Após o emprego do teste qui-quadrado, não foi detectada diferença significativa ($p=0,063$), na prevalência do genótipo *fimA* IV de *P. gingivalis* após os dois tratamentos.

5.1.4 Efeito do tratamento sobre a detecção do genótipo *ragB*⁺ de *P. gingivalis*

A distribuição dos sítios periodontais analisados de acordo com a prevalência do genótipo *ragB*⁺ de *P. gingivalis* na coleta inicial e após 180 dias da terapia está apresentada na tabela 5.4.

Tabela 5.4. Distribuição dos sítios subgingivais nos exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a detecção do genótipo *ragB*⁺ de *P. gingivalis* por PCR

<i>RagB</i> ⁺		Coleta inicial n (%)					
		RAR			RAR+M+A		
		Sítios +	Sítios -	Total	Sítios+	Sítios -	Total
Coleta 180 dias após a terapia	Sítios +	1 (1,8%)	0	1 (1,8%)	1 (3,0%)	2 (6,1%)	3 (9,1%)
	Sítios -	6* (10,7%)	49 (87,5%)	55 (98,2%)	1** (3,0%)	29 (87,9%)	30 (90,9%)
	Total	7 (12,5%)	49 (87,5%)	56 (100%)	2 (6,1%)	31 (93,9%)	33 (100%)

*p=0,031; **p=1,000.

O grupo RAR apresentou redução de sítios do genótipo *ragB*, de 12,5 para 10,7%. O grupo RAR+M+A apresentou redução de 6,1 para 3,0%. Após análise estatística (teste qui-quadrado), foi detectada diferença estatisticamente significativa (p=0,031), na prevalência do genótipo *ragB*⁺ de *P. gingivalis* após o tratamento (RAR).

5.1.5 Efeito do tratamento sobre o IP

A distribuição dos sítios periodontais analisados de acordo com a prevalência de IP visível na coleta inicial e após 180 dias da terapia está apresentada na tabela 5.5.

Tabela 5.5. Distribuição dos sítios subgengivais nos exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a presença de IP

IP		Exame inicial n (%)					
		RAR			RAR+M+A		
		Sítios +	Sítios -	Total	Sítios +	Sítios -	Total
Coleta 180 dias após a terapia	Sítios +	32 (34,0%)	12 (12,8%)	44 (46,8%)	30 (41,1%)	6 (8,2%)	36 (49,3%)
	Sítios -	27* (28,7%)	23 (24,5%)	50 (53,2%)	24* (32,9%)	13 (17,8%)	37 (50,7%)
	Total	59 (62,8%)	35 (37,2%)	94 (100%)	54 (74%)	19 (26%)	73 (100%)

*p=0,888.

Após 180 dias do tratamento, houve redução na quantidade de sítios com IP visível dos pacientes do grupo RAR, de 62,8 para 28,7%, bem como apresentada pelo grupo RAR+M+A, de 74 para 32,9%, nas coletas inicial e final, respectivamente. Após análise estatística (teste qui-quadrado), não foi detectada diferença significativa (p=0,888), no IP após os dois tratamentos.

5.1.6 Efeito do tratamento sobre o SG

A distribuição dos sítios periodontais analisados de acordo com a prevalência de SG positivos na coleta inicial e após 180 dias da terapia está apresentada na tabela 5.6.

Tabela 5.6. Distribuição dos sítios subgengivais nos exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a presença de SG

SG		Exame inicial n (%)					
		RAR			RAR+M+A		
		Sítios +	Sítios -	Total	Sítios +	Sítios -	Total
Coleta 180 dias após a terapia	Sítios +	8 (8,5%)	6 (6,4%)	14 (14,9%)	2 (2,7%)	2 (2,7%)	4 (5,5%)
	Sítios -	7* (7,5%)	73 (77,6%)	80 (85,1%)	6* (8,2%)	63 (86,3%)	69 (94,5%)
	Total	15 (16%)	79 (84%)	94 (100%)	8 (11%)	65 (89%)	73 (100%)

*p=0,192.

A quantidade de sítios com SG positivo nos pacientes do grupo RAR foram reduzidas de 16 para 7,5%. Entretanto, o grupo RAR+M+A apresentou redução mais

discreta, de 11 para 8,2%. Após análise estatística (teste qui-quadrado), não foi detectada diferença significativa ($p=0,192$), no SG após os dois tratamentos.

5.1.7 Efeito do tratamento sobre o SS

A distribuição dos sítios periodontais analisados de acordo com a prevalência de SS na coleta inicial e após 180 dias da terapia está apresentada na tabela 5.7.

Tabela 5.7. Distribuição dos sítios subgengivais nos exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a presença de SS

SS		Exame inicial n (%)					
		RAR			RAR+M+A		
		Sítios +	Sítios -	Total	Sítios +	Sítios -	Total
Coleta 180 dias após a terapia	Sítios +	46 (48,9%)	13 (13,8%)	59 (62,8%)	41 (56,2%)	8 (10,9%)	49 (67,1%)
	Sítios -	29* (30,8%)	6 (6,4%)	35 (37,2%)	21* (28,8%)	3 (4,1%)	24 (32,9%)
	Total	75 (79,8%)	19 (20,2%)	94 (100%)	62 (85%)	11 (15%)	73 (100%)

* $p=0,562$.

Houve redução na quantidade de sítios com SS positivo no grupo RAR, de 79,8 para 30,8%. O grupo RAR+M+A apresentou redução de 85 para 28,8%. Após análise estatística (teste qui-quadrado), não foi detectada diferença significativa ($p=0,562$), no SS após os dois tratamentos.

5.1.8 Efeito do tratamento sobre a SUP

A distribuição dos sítios periodontais analisados de acordo com a prevalência de SUP na coleta inicial e após 180 dias da terapia está apresentada na tabela 5.8.

Tabela 5.8. Distribuição dos sítios subgengivais nos exame inicial e após 180 dias do tratamento nos grupos RAR e RAR+M+A de acordo com a presença de SUP

SUP		Exame inicial n (%)					
		RAR			RAR+M+A		
		Sítios +	Sítios -	Total	Sítios +	Sítios -	Total
Coleta 180 dias após a terapia	Sítios +	0	0	0	0	0	0
	Sítios -	4* (4,3%)	90 (95,7%)	94 (100%)	1** (1,4%)	72 (98,6%)	73 (100%)
	Total	4 (4,3%)	90 (95,7%)	94 (100%)	1 (1,4%)	72 (98,6%)	73 (100%)

*p=0,212; **p=0,076.

Após 180 dias do tratamento, houve redução completa (100%) na quantidade de sítios com SUP positivo no grupo RAR, como também foi observada no grupo RAR+M+A. Após análise estatística (teste qui-quadrado), não foi detectada diferença significativa ($p=0,212$ e $p=0,076$, referente aos grupos experimentais I e II, respectivamente), na prevalência de SUP, após os dois tratamentos.

5.2 Relação entre a presença de *P. gingivalis* e os genótipos *fimA* II, *fimA* IV e *ragB* e PS, no exame inicial

5.2.1 Prevalência de *P. gingivalis*

A tabela 5.9 apresenta a distribuição de sítios positivos para *P.gingivalis* baseados na estratificação de acordo com a PS.

Tabela 5.9. Distribuição de *P. gingivalis* baseado na estratificação de acordo com a PS

Detecção de <i>P. gingivalis</i> X PS	RAR*	RAR+M+A**
Bolsa rasa	19 (34%)	6 (18,2%)
Bolsa média	20 (35,7%)	13 (39,4%)
Bolsa profunda	17 (30,3%)	14 (42,2%)
Total	56 (100%)	33 (100%)

*p=0,528; **p=0,171

No Grupo Experimental I, dos 94 sítios avaliados, *P. gingivalis* foi detectada em 56 sítios (59,6%), sendo 19 (34%) com bolsa rasa, 20 (35,7%) com bolsa média e 17 (30,3%) com bolsa profunda. O teste estatístico qui-quadrado demonstrou que a presença de *P. gingivalis* independe da PS ($p=0,528$).

No Grupo Experimental II, dos 73 sítios avaliados, *P. gingivalis* foi detectada em 33 sítios (45,21%), sendo 6 (18,2%) com bolsa rasa, 13 (39,4%) com bolsa média e 14 (42,4%) com bolsa profunda. O teste estatístico qui-quadrado demonstrou que a presença de *P. gingivalis* independe da PS ($p=0,171$).

No exame inicial, não foi detectada diferença significativa na distribuição de *P. gingivalis* nas categorias de PS entre os grupos experimentais ($p=0,250$).

5.2.2 Prevalência do genótipo *fimA* II de *P. gingivalis*

A tabela 5.10 apresenta a distribuição de sítios positivos para *fimA* II baseados na estratificação de acordo com a PS.

Tabela 5.10 - Distribuição de *fimA* II baseado na estratificação de acordo com a PS

Deteção de <i>fimA</i> II X		
PS	RAR	RAR+M+A
Bolsa rasa	0	1 (20%)
Bolsa média	4 (100%)	2 (40%)
Bolsa profunda	0	2 (40%)
Total	4 (100%)	5 (100%)

Dos 56 sítios avaliados, o genótipo *fimA* II foi detectado, no Grupo Experimental I, em apenas 4 sítios (7,2%), os quais estiveram presentes em sítios com bolsa intermediária, não sendo detectado este genótipo em amostras subgingivais obtidas de bolsas rasas ou profundas. Não foi possível o emprego do teste estatístico.

No Grupo Experimental II, dos 33 sítios avaliados, o genótipo *fimA* II foi detectado em 5 sítios (15,2%), sendo 1 sítio (20%) com bolsa rasa, 2 sítios (40%) em bolsas médias e 2 sítios (40%) em bolsa profunda. Não foi possível o emprego do teste estatístico.

5.2.3 Prevalência do genótipo *fimA* IV de *P. gingivalis*

A tabela 5.11 apresenta a distribuição de sítios positivos para *fimA* IV baseados na estratificação de acordo com a PS.

Tabela 5.11. Distribuição de *fimA* IV baseado na estratificação de acordo com a PS

Detecção de <i>fimA</i> IV X		
PS	RAR	RAR+M+A
Bolsa rasa	1 (16,7%)	0
Bolsa média	3 (50%)	0
Bolsa profunda	2 (33,3%)	0
Total	6 (100%)	0

Dos 56 sítios avaliados, o genótipo *fimA* IV foi detectado no Grupo Experimental I em 6 sítios (10,7%), sendo 1 (16,7%) com bolsa rasa, 3 (50%) com bolsa média e em 2 (33,3%) com bolsa profunda. Não foi possível o emprego do teste estatístico.

Não foram detectados genótipos *fimA* IV no Grupo Experimental II.

5.2.4 Prevalência do genótipo *ragB* de *P. gingivalis*

A tabela 5.12 apresenta a distribuição de sítios positivos para *ragB* baseados na estratificação de acordo com a PS.

Tabela 5.12. Distribuição de *ragB* baseado na estratificação de acordo com a PS

Detecção de <i>RagB</i> X		
PS	RAR	RAR+M+A
Bolsa rasa	2 (28,6%)	1 (50%)
Bolsa média	4 (57,1%)	1 (50%)
Bolsa profunda	1 (14,3%)	0
Total	7 (100%)	2 (100%)

No Grupo Experimental I, dos 56 sítios positivos para *P. gingivalis*, o genótipo *ragB*⁺ foi detectado em 7 sítios (12,5%), sendo 2 (28,6%) com bolsa rasa, 4 (57,1%) com bolsa média e em 1 (14,3%) com bolsa profunda.

Dos 33 sítios positivos no Grupo Experimental II, o genótipo *ragB* foi detectado em 2 sítios (6,1%), sendo 1 sítio com bolsa rasa e outro com bolsa média. Não foi detectado o genótipo *ragB* em sítios com bolsa profunda.

Em ambos grupos, não foi possível o emprego do teste estatístico.

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeito do tratamento sobre os parâmetros clínicos e microbiológicos após 180 dias do tratamento

Os índices clínicos apresentaram melhora após a instituição de ambos tratamentos. O grupo RAR apresentou a maior redução no SG (de 16 para 7,5%), enquanto que o grupo RAR+M+A apresentou redução mais discreta no SG (de 11 para 8,2%). A redução na detecção do genótipo *ragB*⁺ foi maior (estatisticamente significativa) no grupo RAR, em comparação ao grupo RAR+M+A. Ambos grupos apresentaram redução completa da SUP.

De acordo com os benefícios angariados pela RAR no presente estudo, outros diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos benéficos do tratamento periodontal não cirúrgico baseados pela avaliação clínica e microbiológica. O tratamento promovido pela RAR apresentou melhora de parâmetros clínicos, como a profundidade de bolsa, nível de inserção clínica, e os índices de placa, sangramento e supuração, além de induzir a redução do número de microorganismos subgingivais, inclusive *P. gingivalis* (BROCHUT et al., 2005; CUGINI et al., 2000; DOUNGUDOMDACHA et al., 2001; HAFFAJEE; TELES; SOCRANSKY, 2006; MOMBELLI et al., 2000; PAWLOWSKI et al., 2005; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006; XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000).

A terapêutica antibiótica associada ao tratamento periodontal conservador não-cirúrgico em pacientes fumantes tem sido sugerida (PALMER; MATTHEWS; WILSON, 1999; WINKEL et al., 2001). Dentre os vários fármacos administrados, o metronidazol e a amoxicilina, apresentaram os melhores resultados (LÓPEZ, 2000; LÓPEZ; GAMONAL, 1998; LÓPEZ et al., 2006; WINKEL et al., 2001).

O metronidazol, por tratar-se de um antibiótico de pequeno espectro e indicado para o controle da microbiota anaeróbia associada à doença periodontal, apresentou-se eficiente associado à raspagem e alisamento radiculares, reduzindo taxas dos principais patógenos periodontais como *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* (CARVALHO et al., 2004; CARVALHO et al., 2005; FERES et al., 2001; FERES et al., 2002; SLOTS, 2004; SLOTS; TING, 2002; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006). Carvalho et al. (2005) apresentaram redução das proporções médias das espécies do Complexo Vermelho de 18,4 (exame inicial) para 3% (após 90 dias da terapia) no grupo que recebeu tratamento periodontal (RAR), metronidazol e profilaxia profissional supragengival semanal. Ehmke et al. (2005) observaram redução significativa de *P. gingivalis* em bolsas profundas (maiores ou iguais a 7 mm), após terapia antibiótica (metronidazol e amoxicilina) associada à periodontal. Haffajee, Teles e Socransky (2006) observaram redução significativa de *P. gingivalis*, e outras espécies do Complexo Vermelho nos pacientes tratados por metronidazol e amoxiciclina.

A amoxicilina demonstrou-se efetiva contra os patógenos periodontais (FERES et al., 2001; KURIYAMA et al., 2007; SLOTS; TING, 2002; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006). Entretanto, a associação entre metronidazol e amoxicilina tem sido muito mais efetiva contra periodontopatógenos, particularmente os do Complexo Vermelho, e que segundo Teles, Haffajee e Socransky (2006), esta

redução tem sido mantida por um período de 12 meses, retornando a contagem aos níveis iniciais após este prazo.

O grupo RAR+M+A apresentou as maiores reduções no IP (de 74 para 32,9%) e no SS (de 85 para 28,8%), em comparação ao grupo RAR. Estes resultados podem sugerir que a administração de antibióticos associados ao tratamento periodontal (RAR+M+A) foi superior, melhorando o IP e o SS. Em contrapartida, o tratamento periodontal convencional (RAR) foi suficiente e melhorou o SG e SUP. Houve redução de PS após 180 dias em ambos grupos, independente da presença de *P. gingivalis*, embora o grupo RAR+M+A apresentou menor PS, em comparação ao grupo RAR, após 180 dias. Similarmente, NIC foi reduzida após 180 dias em ambos grupos, sendo a maior redução apresentada pelo grupo RAR+M+A, também independente da presença de *P. gingivalis*.

Estes dados estão de acordo com os obtidos na literatura. O metronidazol apresentou resultados satisfatórios quando associado à terapia periodontal (RAR), como a redução de sítios ativos e da profundidade de bolsa, sangramento à sondagem e presença de placa visível e supuração, além do ganho de inserção clínica (BERGLUNDH et al., 1998; FERES et al., 2001; HAFFAJEE; TORRESYAP; SOCRANSKY, 2007; LÓPEZ; GAMONAL; MARTINEZ, 2000; LÓPEZ et al., 2006; ROONEY et al., 2002; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006). Adicionalmente, foi observado que os maiores benefícios clínicos (redução na perda de inserção em bolsas rasas e profundas, na profundidade de bolsa, e na porcentagem de sítios com sangramento à sondagem e supuração) ocorreram nos sítios com profundidade de bolsa inicial maior de 6 mm (CARVALHO et al., 2004; HAFFAJEE; TELES; SOCRANSKY, 2006; HAFFAJEE; TORRESYAP; SOCRANSKY, 2007; WINKEL et al., 2001). Palmer, Matthews e Wilson (1999) observaram que fumantes

apresentaram resposta mais deficiente frente ao tratamento periodontal (RAR). Fumantes apresentaram reduções significativamente menores nas profundidades de bolsas em comparação aos não fumantes.

No presente estudo, foi angariada a redução na prevalência de *P. gingivalis* nos sítios do grupo RAR, de 59,6 para 21,3%. A redução foi menos pronunciada no grupo RAR+M+A (de 45,2 para 8,2%, nas coletas inicial e final, respectivamente). Não foi detectada diferença estatisticamente significativa, na prevalência de *P. gingivalis* após os dois tratamentos. Similarmente, Winkel et al. (2001) alcançaram a redução da porcentagem de *P. gingivalis* de 46 para 11%, após a administração de metronidazol e amoxicilina associados ao tratamento periodontal, em pacientes fumantes. No presente estudo, só houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais referente à redução da detecção do genótipo *ragB*+

6.2 Relação da *P. gingivalis* e genótipos *fimA* II, *fimA* IV e *ragB* com PS

A detecção de *P. gingivalis* foi equivalente a 53,3% (n=89). O grupo RAR apresentou 59,6% (n=56) e o grupo RAR+M+A apresentou 45,2% (n=33), estando de acordo com estudos prévios (HAFFAJEE et al., 2004; LÓPEZ et al., 2004). Van Winkelhoff et al. (2002) encontraram, utilizando método de cultura bacteriana, *P. gingivalis* em 59,5% dos pacientes com periodontite. Cortelli et al. (2005) encontraram *P. gingivalis* em 68% dos pacientes com periodontite crônica.

P. gingivalis vêm sendo fortemente associada à patogênese da periodontite, encontrada em maior prevalência, proporção e números absolutos em bolsas

periodontais profundas em comparação com bolsas rasas e moderadas, havendo relação entre a quantidade de *P. gingivalis* e a profundidade da bolsa periodontal (AMANO et al., 1999; DOUNGUDOMDACHA et al., 2001; SANZ et al., 2004). Entretanto, no presente estudo, não foi observada relação estatisticamente significativa entre a detecção de *P. gingivalis* e bolsa profunda. No presente estudo, somente o grupo RAR+M+A apresentou maior prevalência em bolsas profundas (42,4%), enquanto que o grupo RAR demonstrou maior predileção em bolsas moderadas (35,7%). *P. gingivalis* esteve também presente, em elevada detecção, em sítios com sangramento à sondagem e supuração (AMANO et al., 1999; AMANO et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2002). Neste estudo, optou-se pela avaliação do relacionamento entre a detecção de *P. gingivalis* e a PS, haja vista que este microorganismo é anaeróbico e seria pouco provável a associação entre *P. gingivalis* e alguns parâmetros clínicos como IP, SG e SS.

Embora tenha sido constatada a maior predileção de determinadas espécies subgengivais, como *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, e particularmente de *P. gingivalis* em pacientes fumantes (BORRELL; PAPAPANOU, 2005; COLOMBO et al., 2002; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2001; VAN WINKELHOFF et al., 2001), este trabalho não apresentou maior detecção que a esperada, pelo fato da população ser composta de sujeitos tabagistas. Natto et al. (2005) não relacionaram o tabagismo com o aumento na detecção de espécies da microbiota subgengival, sugerindo que esta microflora é independente do uso do tabaco, no qual foram detectados baixos níveis de *P. gingivalis*.

O genótipo *fimA* II apresentou-se como o mais prevalente entre isolados de pacientes com periodontite crônica: Amano et al. (1999) encontraram em 68,4% dos pacientes; Amano et al. (2000) em 66,1% dos pacientes; Nakagawa et al. (2002) em

47,4%; Beikler et al. (2003) em 38,2%; e Missailidis et al. (2004) em 47%. No presente estudo, o genótipo *fimA* II foi detectado em 22,4% (7,2 e 15,2%, referentes aos grupos RAR e RAR+M+A, respectivamente).

O genótipo *fimA* IV foi detectado em 10,7%, apresentados somente pelo grupo RAR. Amano et al. (2000) encontraram o genótipo IV (16,5%) em prevalência inferior apenas ao tipo II. Essa diferença entre estudos no Japão e Brasil poderia refletir diferente padrão de colonização em indivíduos de diferentes etnias.

O genótipo *ragB*⁺ foi encontrado em aproximadamente 20% dos isolados de *P. gingivalis*, estando associada à maior perda periodontal (CURTIS; HANLEY; ADUSE-OPOKU, 1999). Anzai (2004) identificou o locus *ragB*⁺ em 19% de amostras de pacientes brasileiros com periodontite. No presente estudo, o genótipo *ragB*⁺ foi detectado em 18,6% (12,5 e 6,1%, referentes aos grupos RAR e RAR+M+A, respectivamente), não podendo ser relacionado com bolsa profunda.

7 CONCLUSÕES

Baseado na metodologia empregada pode-se concluir que:

1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento periodontal mecânico associado à administração sistêmica de antibióticos (RAR+M+A) e o tratamento periodontal mecânico (RAR) nos pacientes fumantes, em relação à detecção de *P. gingivalis*. O grupo RAR apresentou-se mais efetivo (estatisticamente significativo) na redução de prevalência do genótipo *ragB*, em comparação ao grupo RAR+M+A, após 180 dias do tratamento.
2. Não foi observada relação estatisticamente significativa entre a prevalência de *P. gingivalis* e dos genótipos *fimA* II, *fimA* IV e *ragB* com profundidade de sondagem (PS) no exame inicial.

REFERÊNCIAS¹

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

Amano A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci* 2007;12:3965-74.

Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res* 2004;39(2):136-42.

Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1426-30.

Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol* 2001;72(3):368-73.

Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and periodontal health status. *J Dent Res* 2000;79(9):1664-8.

Anzai D. Genotipagem de *Porphyromonas gingivalis* baseada na presença do operon *ragAB* e através de REP PCR [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

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

Beikler T, Peters U, Prajane S, Prior K, Ehmke B, Flemmig TF. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in Caucasians. *Eur J Oral Sci* 2003;111(5):390-4.

¹De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Beikler T, Prior K, Ehmke B, Flemmig TE. Specific antibiotics in the treatment of periodontitis - a proposed strategy. *J Periodontol* 2004;75(1):169-75.

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

Bonass WA, Marsh PD, Percival RS, Aduse-Opoku J, Hanley SA, Devine DA, et al. Identification of *ragAB* as a temperature-regulated operon of *Porphyromonas gingivalis* W50 using differential display of randomly primed RNA. *Infect Immun* 2000;68(7):4012-7.

Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl 6):132-58.

Brochut PF, Marin I, Baehni P, Mombelli A. Predictive value of clinical microbiological parameters for the treatment outcome of scaling and root planning. *J Clin Periodontol* 2005;32(7):695-701.

Burt B. Position Paper: Epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol* 2005;76(8):1406-19.

Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population: I. Clinical results. *J Clin Periodontol* 2004;31(12):1070-6.

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

Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K, Abbey K, Fleischmann RD, Walling J, Duncan MJ. Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 2004;186(16):5473-9.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalem WJ, Mendes MC, et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73(4):360-9.

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

Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32(8):860-6.

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

Curtis MA, Hanley SA, Aduse-Opoku J. The rag locus of *Porphyromonas gingivalis*: a novel pathogenicity island. *J Periodont Res* 1999;34(7):400-5.

Cutler CW, Kalmar JR, Genco CA. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol* 1995;3(2):45-51.

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Clinical and microbiological effect of scaling and root planning in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2005;32(2):200-6.

Dewhirst FE, Tamer MA, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Boches SK, et al. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(3):196-202.

Doungudomdacha S, Rawlinson A, Walsh TF, Douglas CWI. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol* 2001;28(5):437-5.

Ebersole JL, Kesavalu L, Schneider SL, Machen RL, Holt SC. Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. *Oral Dis* 1995;1(3):115-28.

Eick S, Rödel J, Einax JW, Pfister W. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(4):201-8.

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

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

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson S, Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol* 2002;29(8):724-35.

Fujise O, Miura M, Hamachi T, Maeda K. Involvement of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* genotype in treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol* 2005;76(10):1661-6.

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

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

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

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, López NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 2004;31(11):996-1002.

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

Hanley SA, Aduse-Opoku J, Curtis MA. A 55-KiloDalton immunodominant antigen of *Porphyromonas gingivalis* W50 has arisen via horizontal gene transfer. *Infect Immun* 1999; 67(3):1157-71.

Katz J, Ward DC, Michalek SM. Effect of host responses on the pathogenicity of strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11(5):309-18.

Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, et al. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(4):285-8.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Molecular Biol Rev* 1998;62(4):1244-63.

López NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71(6):948-54.

López NJ, Gamonal JA. Effects of metronidazole plus amoxicillin in progressive untreated adult periodontitis: results of a single 1-week course after 2 and 4 months. *J Periodontol* 1998;69(11):1291-8.

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

López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004;75(5):717-25.

López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006;33(9):648-60.

Matarazzo F. Avaliação clínica e microbiológica do uso sistêmico de metronidazol e amoxicilina como coadjuvantes à raspagem e alisamento radicular em indivíduos fumantes com periodontite crônica. [Dissertação de Mestrado]. Guarulhos: Universidade Guarulhos; 2007.

Millar DJ, Scott EE, Slaney JM, Sally U, Benjamin P, Curtis MA. Production and characterisation of monoclonal antibodies to the principle sonicate antigens of *Porphyromonas gingivalis* w50. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;7(3):211-22.

Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MPA. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(4):224-9.

Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. J Periodontol 2000;71(1):14-21.

Murakami Y, Masuda T, Imai M, Iwami J, Nakamura H, Noguchi T, et al. Analysis of major virulence factors in *Porphyromonas gingivalis* under various culture temperatures using specific antibodies. Microbiol Immunol 2004;48(8):561-9.

Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. J Clin Microbiol 2000;38(5):1909-14.

Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S, et al. Identification of a new variant of *fimA* gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. J Periodontal Res 2002;37(6):425-32.

Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeuchi H, Yoshioka H, et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. Oral Microbiol Immunol 2008;23(2):170-2.

Natto S, Baljoon M, Dahlén G, Bergström J. Tobacco smoking and periodontal microflora in a Saudi Arabian population. J Clin Periodontol 2005;32(6):549-55.

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

Pawlowski AP, Chen A, Hacker BM, Mancl LA, Page RC, Roberts FA. Clinical effects of scaling and root planing on untreated teeth. J Clin Periodontol 2005;32(1):21-8.

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

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

Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR Primer – A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. p. 35-41.

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. J Clin Periodontol 2004;31(12):1034-47.

Slots J. Position Paper. Systemic antibiotics in Periodontics. J Periodontol 1996;67(8):831-8.

Slots J. Systemic antibiotics in Periodontics. J Periodontol 2004;75(11):1553-65.

Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal diseases. Periodontol 2000 2002;28:106-76.

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

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

Stommel JR, Panta GR, Levi A, Rowland LJ. Effects of gelatin and BSA on the amplification reaction for generating RAPD. BioTechniques 1997;22(6):1064-6.

Takamatsu N, Yano H, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontol 1999;70(6):574-80.

Teanpaisan R, Douglas CW. Molecular fingerprinting of *Porphyromonas gingivalis* by PCR of repetitive extragenic palindromic (REP) sequences and comparison with other fingerprinting methods. J Med Microbiol 1999;48(8):741-9.

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

Umeda JE, Missailidis C, Longo PL, Anzai D, Wikström M, Mayer MPA. Adhesion and invasion to epithelial cells by *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21(6):415-9.

van der Ploeg JR, Giertsen E, Lüdin B, Mörgeli C, Zinkernagel AS, Gmür R. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in dental plaque. *FEMS Microbiol Lett* 2004;232(1):31-7.

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

Van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002;29(11):1023-8.

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

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

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

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

Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol* 1996;67(10):1050-4.

Zhao L, Wu Y-F, Meng S, Yang H, OuYang Y-L, Zhou X-D. Prevalence of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in Chinese adults. *J Periodontal Res* 2007;42(6):511-7.

ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos (UnG)

Guarulhos, 23 de junho de 2005.

Exma. Sra.
Profª. Magda Gomes Feres

Referência: **Aprovação de Projeto**

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

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

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

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

Luciene Cristina de Figueiredo
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa

ANEXO B - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 08/08

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU Ad referendum o protocolo de pesquisa: **"AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO PERIODONTAL CONVENCIONAL E ASSOCIADO À TERAPIA ANTIMICROBIANA EM PACIENTES FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA SOBRE OS NÍVEIS E GENÓTIPOS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS NO BIOFILME SUBGENGIVAL"**, de responsabilidade do Pesquisador: **IRINEU GREGNANIN PEDRON**, sob orientação da Professora Doutora **MÁRCIA PINTO ALVES MAYER**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 25 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu (nome) _____, (nacionalidade) _____, (profissão) _____, portador do R.G. _____, C.I.C. _____, residente e domiciliado à Rua _____, telefone _____, na cidade de _____, Estado de _____, concordo em participar dessa pesquisa – AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO DO METRONIDAZOL E AMOXICILINA DE USO SISTÊMICO EM INDIVÍDUOS FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA. Estou ciente que essa pesquisa pretende estudar o efeito do uso de antibióticos (metronidazol e amoxicilina) associados ao tratamento tradicional de raspagem na eliminação da doença periodontal. A doença periodontal é a inflamação das gengivas e pode levar até a perda dos dentes. É causada pela presença de placa dentária, uma camada localizada na superfície dos dentes e composta por microrganismos (bactérias) que causam a inflamação das gengivas. Para participar desse estudo é necessário ser fumante e ter a doença periodontal, estar com boa saúde geral, não ter sofrido tratamento nas gengivas, nem tomado antibióticos ou utilizado bochechos nos últimos 6 meses, e quando mulheres, não estar grávida ou amamentando.

Os participantes serão submetidos a quatro exames completos dos dentes e das gengivas que serão efetuados por profissionais formados em Odontologia, sob a supervisão de professores na Clínica Odontológica da UnG. Os exames serão realizados antes e após o tratamento da inflamação das gengivas. Nesta oportunidade, amostras de placa dentária serão coletadas por meio de curetas odontológicas estéreis para a realização do exame microbiológico e identificação dos microrganismos envolvidos na doença periodontal.

O tratamento utilizado será de raspagem das superfícies dos dentes (coroa e raiz) sob anestesia local, e uso de antibióticos diários (metronidazol 3x/dia e amoxicilina 3x/dia) que ajudam na eliminação dos microrganismos (germes) presentes na placa dentária causadora das doenças nas gengivas.

Guarulhos, ____ de _____ de 200 ____.

_____
Assinatura do Voluntário
Pesquisador Responsável

_____
Dra. Magda Feres – CRO-SP 77.854

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

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

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

Recebi todas as informações sobre a minha participação nesse estudo, e a garantia de novos esclarecimentos que julgar necessários durante o decorrer da pesquisa. Também fui verbalmente informado sobre os possíveis benefícios e riscos, assim como, todos os passos desse experimento serão acompanhados por um Pesquisador Responsável. Os procedimentos são simples, não oferecem risco diferente de um tratamento odontológico comum e serão realizados por profissionais com experiência.

Tomei conhecimento de que não terei custos extras e que tenho plena liberdade para recusar a participação na referida pesquisa a qualquer momento, sem penalização alguma. Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e a publicação dos dados e resultados obtidos do relatório geral da pesquisa. Recebi a garantia do sigilo que assegura a privacidade dos participantes do estudo, uma vez que os dados obtidos são confidenciais.

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

Guarulhos, ____ de _____ de 200 ____.

Assinatura do Voluntário

Dra. Magda Feres – CRO-SP 77.854
Pesquisador Responsável

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