Sílvia Regina Loureiro Teixeira

“Avaliação do efeito do tratamento periodontal convencional e associado à terapia antimicrobiana em pacientes com periodontite crônica sobre os níveis de *Porphyromonas gingivalis* e dos genótipos *fimA* II e IV no biofilme subgengival”

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

SÃO PAULO
2007

Resumo

TEIXEIRA, S.R.L. **Avaliação do efeito do tratamento periodontal convencional e associado à terapia antimicrobiana em pacientes com periodontite crônica sobre os níveis de *Porphyromonas gingivalis* e dos genótipos *fimA* II e IV no biofilme subgengival.** 2007. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Porphyromonas gingivalis é um dos principais organismos associados à etiologia da periodontite crônica. Estudos sugerem que a diversidade dentro da espécie poderia refletir no potencial virulento da cepa. Alguns genótipos da bactéria caracterizados pela sequência do gene *fimA* que codifica fímbria principal, particularmente o genótipo *fimA* II, seriam mais eficientes na evasão das defesas do hospedeiro, o que poderia influenciar o prognóstico da doença periodontal no paciente portador. O presente estudo foi conduzido para testar a hipótese de que a colonização por diferentes genótipos *fimA* de *P.gingivalis* resultaria em diferenças na resposta ao tratamento periodontal. Assim, o efeito do tratamento periodontal convencional e associado à terapia antimicrobiana foi testado em pacientes fumantes com periodontite crônica. O fumo é considerado um importante fator de risco para a doença periodontal, e pacientes fumantes não respondem adequadamente ao tratamento periodontal conservador. Terapias adicionais, como o uso de antimicrobianos sistêmicos em combinação ao tratamento mecânico são indicadas como método auxiliar. Vinte pacientes com periodontite crônica, fumantes, portadores de *P. gingivalis*, foram analisados, em estudo longitudinal duplo cego, divididos em 2 grupos de tratamento: 11 pacientes receberam tratamento periodontal pela terapia mecânica convencional (RAR - raspagem e alisamento radicular) enquanto 9 pacientes receberam RAR associado a terapia antimicrobiana (500 mg de amoxicilina e 400 mg de metronidazol, 3 vezes ao dia durante 14 dias). O efeito do tratamento foi avaliado sobre parâmetros clínicos, prevalência e níveis subgengivais de *P. gingivalis* e dos genótipos *fimA* II e *fimA* IV. Amostras subgengivais foram obtidas de 9 sítios por paciente (3 rasos, 3 médios e 3 profundos), e analisadas através de estudo quantitativo por PCR em tempo real, antes e 180 dias após o tratamento. A associação da RAR com a terapia antimicrobiana foi mais eficiente que apenas a RAR, tanto considerando-se os parâmetros clínicos quanto

os níveis subgengivais de *P.gingivalis*. Não houve diferença significativa na prevalência de *P.gingivalis* em ambos os tratamentos testados. A porcentagem média de sítios colonizados por *P.gingivalis* caiu de 93% no início para 89% no exame 180 dias após o tratamento no grupo RAR enquanto estes valores foram 70,3% para 64,1% no grupo RAR + antimicrobianos. Porém, a média da contagem de *P. gingivalis* variou de $10^{2,69}$ por μl /amostra antes do tratamento para $10^{2,58}$ 180 dias após a terapia no grupo RAR, enquanto estes valores variaram de $10^{2,81}$ no início para $10^{1,25}$, no exame 180 dias após o tratamento no grupo RAR + antimicrobianos. Diferenças significantes de *P.gingivalis* entre o início e o exame de 180 dias foram somente detectadas no grupo que recebeu tratamento antimicrobiano adicional. A detecção ou níveis do genótipo *fimA* II não se relacionou a parâmetros clínicos de perda periodontal no início do tratamento enquanto o genótipo *fimA* IV foi mais prevalente em bolsas mais profundas. No grupo que recebeu o tratamento mecânico a média da porcentagem de sítios colonizados por paciente pelo genótipo *fimA* II caiu de 25,2% para 20,1% após o tratamento enquanto a detecção do genótipo *fimA* IV caiu de 80,7% para 76,1%. No grupo que recebeu a associação de antimicrobianos, esses valores foram de 27,5% e 19,7% para o genótipo *fimA* II, e 47,5% e 46,8% para *fimA* IV. A média na contagem do genótipo *fimA* II no grupo RAR caiu de $10^{0,73}$ para $10^{0,51}$, e o genótipo *fimA* IV de $10^{1,02}$ para $10^{0,82}$. No grupo que recebeu os antimicrobianos esses valores foram $10^{0,17}$ e $10^{0,30}$ para o genótipo *fimA* II, e $10^{0,53}$ e $10^{0,50}$ para o genótipo *fimA* IV. No entanto, não houve diferença significativa na prevalência e níveis subgengivais dos genótipos *fimA* II e IV de *P. gingivalis* em ambos os grupos entre o início e após o tratamento. Os dados sugerem que o tratamento periodontal mecânico associado a antibioticoterapia sistêmica é mais eficiente na redução dos níveis de *P. gingivalis* em pacientes fumantes que apenas o tratamento periodontal mecânico. No entanto, nenhuma das estratégias de tratamento foi eficiente em promover a redução dos genótipos *fimA* II ou *fimA* IV sugerindo que a redução observada foi efetuada em outros genótipos não identificados.

Palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis*. PCR em tempo real. Genótipos. Tratamento Periodontal. Biofilme subgengival.

Abstract

TEIXEIRA, S.R.L. **Evaluation of conventional periodontal treatment effects and its association with antimicrobial therapy in chronic periodontitis patients on the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes II and IV in the subgingival biofilm.** 2007. 84f. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Porphyromonas gingivalis is one of the main organisms associated with chronic periodontitis. Some studies suggest that the diversity inside the specie could reflect in the virulent potential of the strain. Some bacteria genotypes characterized by the sequence of the gene *fimA* that encodes major fimbriae subunits, mainly the genotype *fimA* II, would be more efficient in the evasion of the host defences, what could influence the prognostic of periodontal disease in the host. The present study aimed to test the hypothesis that the colonization by different *P.gingivalis* *fimA* genotypes would lead to different results on periodontal treatment. Therefore, the effect of conventional periodontal treatment alone or in combination with antibiotic therapy was tested in smoker patients with chronic periodontitis. Tobacco smoking is a main risk factor associated with periodontal disease, and smokers patients do not respond appropriately to periodontal conservative treatment. Additional therapies, such as the use of systemic antibiotics in combination with the mechanical treatment are indicated as an auxiliary method. Twenty chronic periodontitis patients, smokers, hosting *P. gingivalis*, were followed in double-blind longitudinal study, divided in 2 treatment groups: 11 patients received conventional mechanic periodontal treatment (SRP – scaling and root planning) while 9 patients received SRP associated with antimicrobial therapy (500 mg of amoxicillin and 400 mg of metronidazole, 3 times/day for 14 days). The effect of treatment was analysed under clinical parameters, prevalence and subgingival levels of *P. gingivalis* and of the genotypes *fimA* II and IV. Subgingival samples were obtained from 9 sites per patient (3 shallow, 3 medium e 3 deep), and analyzed in quantitative study by Real time PCR before and 180 days after the treatment. The association SRP with antibiotic therapy was more efficient than only SRP, either considering the clinical parameters as well as subgingival levels of *P.gingivalis*. There was not significant difference in prevalence of *P.gingivalis* between both treatments. The average

percentage of *P.gingivalis* colonized patient sites decreased from 93% in baseline to 89% in the 180 days after treatment examination in the SRP group whereas these values were 70,3% to 64,1% in the SRP+antimicrobials group. However, the mean counts of *P.gingivalis* varied from $10^{2,69}$ per $\mu\text{l/sample}$ before treatment to $10^{2,58}$ 180 days after treatment in the SRP group, while these values varied from $10^{2,81}$ at baseline to $10^{1,25}$ in the 180 days after treatment examination in the SRP+antimicrobials group. Significant differences in *P. gingivalis* between baseline and 180 days examination were only detected for the group which received the additional antimicrobial treatment. The detection or levels of genotype *fimA* II were not correlated with clinical parameters of periodontal loss at baseline, whereas genotype *fimA* IV was more prevalent in deeper pocket samples. In the group that received mechanic treatment, the average percentage of colonized sites per patient by genotype *fimA* II decreased from 25.2% to 20.1% after treatment whereas detection of genotype *fimA* IV decreased from 80.7% to 76.1%. In the group that received additional antibiotic treatment, these values were 27.5% to 19.7% for genotype *fimA* II, and 47.5% to 46.8% for *fimA* IV. The mean counts of genotype *fimA* II in group SRP decreased from $10^{0,73}$ to $10^{0,51}$, and of genotype *fimA* IV from $10^{1,02}$ to $10^{0,82}$. In the group that received antibiotics these values were from $10^{0,17}$ to $10^{0,30}$ for genotype *fimA* II, and from $10^{0,53}$ to $10^{0,50}$ for *fimA* IV. However, there were no significant differences in the prevalence and subgingival levels of *P. gingivalis* genotypes *fimA* II and IV in both groups between baseline and after the treatment. These data suggest that the mechanical periodontal treatment associated with systemic antibiotics administration is more efficient in promoting the reduction of levels of *P. gingivalis* in smokers patients than the mechanical periodontal treatment alone. However, none of the treatment strategies were efficient in promoting the reduction of genotypes *fimA* II or *fimA* IV, suggesting that the observed reduction was accomplished in other not identified genotypes.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*. PCR Real-time. Genotypes. Periodontal Treatment. Subgingival Biofilm.

1 Introdução

Porphyromonas gingivalis é um cocobacilo, Gram negativo, assacarolítico e anaeróbio estrito (HOLT et al., 1999), associado à etiologia da doença periodontal crônica (DARVEAU et al., 1998). Essa espécie é encontrada em maior prevalência, proporção e números absolutos em bolsas periodontais profundas do que em bolsas com profundidade moderada ou rasa (KAWADA et al., 2004).

As bactérias da placa subgengival co-habitam em complexos (SOCRANSKY et al., 1998). Foram descritos 5 complexos bacterianos principais no ambiente subgengival, de acordo com a relação entre as diferentes espécies, denominados complexos vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo. *P.gingivalis* integra o complexo vermelho, associada a *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. O complexo vermelho foi fortemente relacionado à periodontite crônica avançada, particularmente em relação à profundidade de bolsa e sangramento à sondagem. *P.gingivalis* está presente, em altos níveis, em sítios com sangramento à sondagem e supuração (SLOTS et al., 1999; SOCRANSKY et al., 2000; HAFFAJEE et al., 2005).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a proporção de *P.gingivalis* varia entre indivíduos de diferentes populações geográficas. A proporção média de *P.gingivalis* entre pacientes com periodontite crônica variou de 1.6% a 11.9% da microbiota, sendo que os chilenos apresentaram a proporção mais alta e os suecos a proporção mais baixa, e níveis intermediários foram encontrados entre brasileiros e norte americanos, não havendo diferenças entre o Brasil e países da América do Sul (HAFFAJEE et al., 2004; CORTELLI et al., 2005).

Para a detecção de *P.gingivalis* podem ser empregados métodos dependentes e independentes de cultivo. Os exames dependentes de cultura, considerado padrão-ouro, estão em desuso pelo tempo despendido e menor sensibilidade, embora ofereçam como vantagem o isolamento da amostra para determinação da suscetibilidade a antimicrobianos (ASHIMOTO et al., 1996; ANZAI, 2004; MISSAILIDIS et al., 2004). Métodos independentes de cultivo como a Reação em cadeia da polimerase (PCR) oferecem a vantagem da alta sensibilidade, mas apresentam a desvantagem se não serem quantitativos,

uma vez que os agentes implicados nas doenças podem estar presentes em sítios sem perda de inserção em pacientes com periodontite ou mesmo em pacientes saudáveis (MISSAILIDIS et al., 2004). Portanto, não somente a presença do organismo é importante, mas altos níveis e proporção são fundamentais para a ocorrência da doença periodontal destrutiva (TELES et al., 2006). Outros métodos, empregando sondas de DNA total, como a hibridação DNA-DNA pelo checkerboard são apenas semiquantitativos (SOCRANSKY et al, 1994), mas oferecem a vantagem de analisar um número de espécies significativo, propiciando a determinação da porcentagem de determinada espécie em relação ao total de espécies analisadas. No entanto, a especificidade deste método pode ser discutida, devido ao uso de sondas de DNA total, dificultando a diferenciação entre cepas da mesma espécie ou entre espécies muito relacionadas.

A reação de amplificação em tempo real (PCR *Real Time*) representa um grande avanço nos métodos moleculares de análise da microbiota por permitir uma análise quantitativa de organismos presentes na amostra. É uma metodologia usada amplamente para investigações biológicas, sendo capaz de quantificar amostras com pouca quantidade de seqüências específicas de ácidos nucleicos, através da amplificação e monitoramento do progresso da amplificação usando fluorescência (VALASEK et al., 2005). O método apresenta grande sensibilidade e especificidade. A análise de amostras subgengivais de 259 pacientes apresentando periodontite severa demonstrou a presença de *P.gingivalis* pelo método de cultura em 43% das amostras de biofilme subgengival e em 53% das amostras através de PCR em tempo real (BOUTAGA et al., 2003). Por outro lado, não foram detectadas diferenças na sensibilidade do PCR convencional e PCR em tempo real na detecção de bactérias periodontopatogênicas entre elas *P.gingivalis* em saliva e bolsa periodontal (SAKAMOTO et al., 2001).

Não somente a composição da microbiota influencia na severidade da doença periodontal, mas também fatores inerentes ao hospedeiro poderiam induzir a progressão da doença.

O tabagismo é um fator de risco estabelecido à periodontite e foi associado com maior perda óssea e dentária, profundidade de bolsas periodontais e perda de inserção clínica (NATTO et al., 2005). O fumo interfere

nos mecanismos de defesa dos tecidos periodontais, no entanto esta interferência ainda não foi completamente entendida. Foi demonstrado em modelos animais que o efeito vasoconstritor da nicotina resultou em uma menor cicatrização de feridas (SILVERSTEIN, 1992). Não somente a nicotina, mas também outros agentes do tabaco como o monóxido de carbono, acroleína e o aldeído podem interferir nos eventos de cicatrização (POGGI, 2002).

Determinadas espécies subgengivais foram detectadas em maior prevalência entre fumantes, como *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e particularmente *P. gingivalis*, em comparação aos não fumantes ou ex-fumantes. Além disso, fumantes apresentaram menor resposta clínica favorável ao tratamento periodontal e à eliminação ou controle de certos microrganismos. Seis meses após o tratamento periodontal convencional ocorreu menor redução na profundidade de bolsa em fumantes (1,23 mm) do que em não fumantes (1,92 mm), bem como menor redução na proporção de espiroquetas (PALMER et al., 1999). Estudos mostram que em pacientes fumantes o nível de calcificação da placa é maior do que em não-fumantes o que poderia explicar um pior prognóstico da doença (BERGSTROM, 2005). Portanto, a manutenção periodontal (profilaxia supragengival, raspagem e alisamento radiculares) torna-se imprescindível para manter baixos os níveis destes patógenos, principalmente entre fumantes (HAFFAJEE et al., 1997; PALMER et al., 1999; HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2001; WINKEL et al., 2001) e a administração de antibióticos tem sido sugerida como complementar ao tratamento periodontal conservador nestes pacientes (KINANE e RADVAR, 1997; PALMER et al., 1999; WINKEL et al., 2001).

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos do tratamento periodontal não cirúrgico através da avaliação de critérios clínicos e microbiológicos. O tratamento baseado no controle do biofilme supragengival, através da raspagem e alisamento radicular (RAR) foi capaz de melhorar parâmetros clínicos como a profundidade de bolsa, nível de inserção clínica, índices de placa, sangramento e supuração, além de promover a redução do número de microrganismos subgengivais, inclusive *P.gingivalis* (HELLSTROM et al., 1996; CUGINI et al., 2000; MOMBELLI et al., 2000; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000a; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000b; DOUNGUDOMDACHA et al., 2001;

BROCHUT et al., 2005; PAWLOWSKI et al., 2005). Estudos que analisaram parâmetros microbiológicos também ressaltaram a importância do controle de placa como fator de sucesso ao tratamento periodontal. Entre 9 e 12 meses após o tratamento periodontal (raspagem e alisamento radicular) associado ao controle do biofilme supragengival, ocorreu diminuição na prevalência e nível de alguns patógenos como *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *Campylobacter rectus* e *A. actinomycetemcomitans* e aumento na prevalência de espécies consideradas benéficas como *Actinomyces spp* e *Veillonella parvula* (XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000a; COLOMBO et al., 2005).

Através de PCR em tempo real foi demonstrado que após o tratamento periodontal conservador pode ser observada significativa diminuição de *P. gingivalis* (SAKAMOTO et al., 2004; KAWADA et al., 2004). No entanto, a erradicação subgengival de *P. gingivalis* pode requerer cirurgia periodontal assim como terapia antibiótica, possivelmente devido a sua capacidade de invadir células do hospedeiro (SLOTS, 1999; TUAN et al., 2000).

A remoção mecânica do biofilme subgengival resulta numa breve redução de microrganismos e o biofilme bacteriano pode ser restaurado em cerca de 7 dias, porém as espécies do complexo vermelho retornam mais lentamente. Dois fenômenos importantes ocorrem após a remoção mecânica do biofilme: a mudança na proporção das espécies durante a recolonização e a modificação no habitat. O habitat influencia a colonização microbiana, sendo que espécies dependentes de bolsas profundas ou nutrientes oriundos do maior volume de fluido gengival decorrente da inflamação irão recolonizar em menor número e mais tardiamente. Assim a administração de quimioterápicos por 2 semanas aumenta a resposta terapêutica devido à rápida redução de espécies sensíveis no interior da bolsa e nos tecidos moles que circundam a bolsa periodontal, dificultando a recolonização por essas espécies (HAFFAJEE et al., 2006).

In vitro, as penicilinas - especialmente a amoxicilina - apresentam-se bastante efetivas contra a maioria dos patógenos periodontais (SUTTER et al., 1983; WALKER et al., 1985). O tratamento de 8 pacientes com periodontite agressiva com uma dose diária de 750 mg de amoxicilina combinado com ácido clavulânico, provocou a redução de parâmetros clínicos como profundidade de bolsa, sangramento à sondagem e número de bactérias

anaeróbias viáveis subgengivais (HULL et al., 1989). A amoxicilina associada à RAR também reduziu os níveis das 3 espécies do complexo vermelho. No entanto, aos 360 dias pós-terapia foi observada recolonização especialmente pelas espécies *T. forsythia* e *T. denticola* (FERES et al., 2001).

Como auxiliar no tratamento da periodontite crônica destaca-se o metronidazol por tratar-se de um agente antimicrobiano 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 do metronidazol quando associado à raspagem e alisamento radiculares, oferecendo maiores benefícios clínicos e microbiológicos (FERES et al., 2001; FERES et al., 2002; CARVALHO et al., 2004; CARVALHO et al., 2005). Em pacientes fumantes, no entanto, a administração de metronidazol associado ao tratamento periodontal provocou uma menor redução na profundidade de bolsa do que em pacientes não fumantes (PALMER et al., 1999).

A associação entre o metronidazol e a amoxicilina tem sido usada com sucesso no tratamento da periodontite (LÓPEZ e GAMONAL, 1998; LÓPEZ, 2000; WINKEL et al., 2001; LÓPEZ et al., 2006). A avaliação do efeito do tratamento periodontal mecânico associado à terapêutica antibiótica com metronidazol e amoxicilina administrados isoladamente ou em conjunto em pacientes portadores de periodontite crônica, demonstrou que o segundo grupo apresentou melhores resultados clínicos e diferenças na prevalência de espécies patogênicas após terapia (WINKEL et al., 1998).

Existem evidências de que a diversidade fenotípica e genotípica de *P. gingivalis* tem reflexo no potencial de virulência e conseqüentemente na sua capacidade de destruição periodontal (GRIFFEN et al., 1999; AMANO et al., 2001). Entre os métodos empregados para diferenciar organismos desta espécie destaca-se a tipagem baseada na sequência de nucleotídeos do gene *fimA* (AMANO et al., 2004).

As fímbrias são componentes filamentosos distribuídos sobre a superfície celular de *P. gingivalis* (SUGANO et al., 2004) e são consideradas potentes fatores de virulência por participarem da adesão da bactéria aos tecidos periodontais e da modulação da resposta imune do hospedeiro

(HIRAMINE et al., 2003). A fímbria principal de *P. gingivalis* é codificada pelo gene *fimA*.

Estudos relacionados ao potencial patogênico apontam variações entre os diferentes genótipos *fimA*. Entre os seis tipos identificados (tipos I, Ib, II, III, IV e V), o genótipo *fimA* II é o mais prevalente entre isolados de pacientes com periodontite (AMANO et al., 2004; MISSAILIDIS et al., 2004; EICK et al., 2002). Por outro lado, o tipo IV é o segundo mais associado a casos de periodontite no Japão, mas foi raramente encontrado no Brasil. A alta prevalência do genótipo *fimA* II apresentada nestes estudos incluindo o realizado no Brasil, contrasta com os dados obtidos por Griffen et al. (1999), que analisaram cepas de *P. gingivalis* isoladas nos EUA, por análise do polimorfismo do espaço interribossomal. Estes autores demonstraram que a cepa W83, correspondendo à fímbria tipo IV, foi mais associada aos casos de periodontite que as demais.

Existem algumas evidências de que os genótipos exibem características uniformes quanto a certos fatores considerados importantes para a virulência da bactéria. Estudos com fímbrias purificadas de cada um dos seis tipos descritos mostraram maior capacidade de adesão às células epiteliais Hep-2 pelas fímbrias do tipo II (NAGAKAWA et al., 2002). Por outro lado, em estudo realizado no Brasil, Umeda et al. (2006) relataram que as capacidades de adesão e a invasão de *P. gingivalis* a células KB não são homogêneas entre amostras do mesmo genótipo, sugerindo que outros fatores além do polimorfismo de *fimA* estão envolvidos nestes processos.

O genótipo *fimA* II possui capacidade de degradar moléculas sinalizadoras relacionadas a integrina, paxilina e quinase de adesão focal (FAK), prejudicando assim a migração e proliferação celular (AMANO et al., 2004; AMANO, 2007). As fímbrias do tipo II apresentam maior adesão ao receptor celular $\alpha 5\beta 1$ -integrina, e a alteração genética de *fimA* II para *fimA* I resulta em menor capacidade de adesão e invasão. Em modelo de abscesso em ratos, a amostra *fimA* II resultou em maior resposta inflamatória do que os demais genótipos, sugerindo que a fímbria tipo II é um determinante crítico da virulência de *P. gingivalis* (KATO et al., 2007), enquanto em estudo de Grenier et al. (1987) também envolvendo modelos animais experimentais foi demonstrado que a cepa W83, correspondente ao tipo IV, é mais virulenta

devido a indução de abscessos generalizados, enquanto a cepa HW24D-1, correspondente ao tipo II induziu abscessos menores e localizados.

O genótipo *fimA* IV apresentou alta capacidade de hemaglutinação (EICK et al., 2002). A hemaglutinação é considerada um fator de virulência devido à correlação existente entre o processo de adesão da bactéria às células hospedeiras e também à requisição metabólica de ferro. O ferro é um sinal regulador em muitos organismos que influencia a expressão de uma ampla variedade de proteínas bacterianas, que incluem não somente o sistema de transporte de ferro, necessário para a aquisição de ferro, mas também toxinas e outros fatores de virulência (CUTLER et al., 1995).

A hemaglutinação é uma característica que distingue *P. gingivalis* de outras espécies assacarolíticas e pigmentadas (DU LAURENCE et al., 1997). *P. gingivalis* produzem ao menos cinco moléculas com características de hemaglutininas, que expressas na superfície celular bacteriana, podem também promover colonização mediante a ligação da bactéria aos receptores (normalmente oligossacarídeos) das células humanas (LAMONT e JEKINSON, 1998).

Embora múltiplos genótipos de *P. gingivalis* possam ser detectados em um mesmo sítio periodontal de pacientes com periodontite crônica, quantitativamente *fimA* II predominou nos sítios periodontais multicolonizados, excedendo os outros genótipos na maioria dos sítios em que estava presente, enquanto o genótipo *fimA* IV predominou somente em sítios negativos para o genótipo *fimA* II (VAN DER PLOEG et al., 2004). Estes dados sugerem que os genótipos apresentam diferenças na capacidade de atingir altas contagens de células nos sítios periodontais, possivelmente devido a diferenças na sensibilidade aos mecanismos de defesa do hospedeiro ou a outras vantagens competitivas do genótipo *fimA* II. No entanto, deve ser ressaltado que este estudo (VAN DER PLOEG et al., 2004) tem limitações devido ao pequeno número de pacientes testados e a análise de um *pool* de amostras de sítios distintos, ao invés da análise de amostras obtidas de sítios isolados, dificultando a análise da coexistência de diferentes genótipos *fimA* no mesmo sítio.

Baseados no conhecimento de que *P. gingivalis* apresenta diversidade genética relacionada ao seu potencial de virulência (GRIFFEN et al., 1999;

AMANO et al., 2001) e que os níveis subgengivais deste patógeno associam-se ao risco relativo do desenvolvimento de perda de inserção em pacientes com periodontite (TELES et al., 2006), formulamos a hipótese de que a colonização por diferentes genótipos da bactéria resultaria em diferenças no prognóstico da doença periodontal do portador. Para tanto foram analisados os níveis subgengivais de *P. gingivalis* e dos genótipos *fimA* II e IV em pacientes fumantes com periodontite crônica, em estudo longitudinal, tratados com a terapia mecânica convencional (RAR) e com a associação desta com antibióticos de uso sistêmico.

6 Conclusão

Baseados nas condições empregadas no presente estudo, os dados obtidos sugerem que:

- o tratamento periodontal mecânico associado a terapia antimicrobiana sistêmica é mais eficiente na melhora clínica e na redução dos níveis subgengivais de *P. gingivalis* em pacientes fumantes do que apenas o tratamento periodontal mecânico.

- não foram detectadas diferenças na resposta ao tratamento periodontal convencional ou associado a terapia antimicrobiana em relação a presença e níveis dos genótipos *fimA* II ou IV.

Referências Bibliográficas

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v. 25, p.229-235, 1975.

AKIYAMA, S.; AMANO, A.; KATO, T.; TAKADA, Y.; KIMURA, K.R.; MORISAKI, I. Relationship of periodontal bacteria and *Porphyromonas gingivalis* *fimA* variations with phenytoin-induced gingival overgrowth. **Oral Dis.**, v.12, n.1, p.51-56, 2006.

AMANO, A.; NAKAGAWA, I.; KATAOKA, K.; MORISAKI, I.; HAMADA S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains *fimA* genotypes in periodontitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.1426-1430, 1999.

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.**, v.79, p.1664-1668, 2000.

AMANO, A.; PREMARAJ, T.; KUBONIWA, M.; NAKAGAWA, I.; SHIZUKUISHI, S.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Altered antigenicity in periodontitis patients and decreased adhesion of *Porphyromonas gingivalis* by environmental temperature stress. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.16, p.124-128, 2001.

AMANO, A.; NAKAGAWA, I.; OKAHASHI, N.; HAMADA, N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. **J. Periodont. Res.**, v. 39, p.136–142, 2004.

AMANO, A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. **Front. Biosci.**, v.1, n.12, p.3965-3974, 2007.

AMMENHEUSER, M.M.; HASTINGS, D.A.; WHORTON, E.B. JR.; WARD, J.B. JR. Frequencies of hrpt mutant lymphocytes in smokers, non-smokers and former smokers. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.30, p.131-138, 1997.

ANZAI D. **Genotipagem de *Porphyromonas gingivalis* baseado na presença do gene ragB e através de REP PCR.** 91 f .Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

APATZIDOU, D.A. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 9, p. 973-983, 2005.

ASANO, H.; ISHIHARA, K.; NAKAGAWA, T.; YAMADA, S. ; OKUDA, K. Relationship between transmission of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* type in spouses. **J. Periodontol.**, v.74, p.1355-1360, 2003.

ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque

of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 11, p. 266-273, 1996.

BERGLUNDH, T.; KROK, L.; LILJENBERG, B.; WESTFELT, E.; SERINO, G.; LINDHE, J. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, p. 354-362, 1998.

BERGSTROM J.; PREBER H. Tobacco use as a risk factor. **J. Periodontol.**, v. 65, p. 545-550, 1994.

BERGSTROM, J. Tobacco smoking and subgingival dental calculus. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 1, p.81-88, 2005.

BORRELL, L.N.; PAPAPANOU, P.N. Analytical epidemiology of periodontitis. **J Clin Periodontol.**, v. 32, n. 6, p.132-158, 2005.

BOSTRÖM, L.; BERGSTRÖM, J.; DAHLÉN, G.; LINDER, L.E. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 212-219, 2001.

BOUTAGA, K.; VAN WINKELHOFF, A.J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; SAVELKOUL, P.H. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4950-4954, 2003.

BROCHUT, P.F.; MARIN, I.; BAEHNI, P.; MOMBELLI, A. Predictive value of clinical and microbiological parameters for the treatment outcome of scaling and root planing. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p.695-701, 2005.

CALSINA, G.; RAMÓN, J-M.; ECHEVERRÍA, J-J. Effects of smoking on periodontal tissues. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, p. 771-776, 2002.

CARVALHO, L.H.; D'AVILA, G.B.; LEÃO, A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; 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.**, v. 31, p.1070-1076, 2004.

CARVALHO, L.H.; D'AVILA, G.B.; LEAO, A.; GONCALVES, C.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; FERES, M. Scaling and root planning, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II - microbiological results. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p.406-411, 2005.

CHEN, Y.H.; CHEN, S.H.; JONG, A.; ZHOU, Z.Y.; WEI, L.; SUZUKI, K.; HUANG, S.H. Enhanced *Escherichia coli* invasion of human brain microvascular endothelial cells is associated with alternations in cytoskeleton induced by nicotine. **Cell.Microbiol.** v. 4, n. 8, p. 503-514, 2002.

COLOMBO, A.P.; TELES, R.P.; TORRES, M.C.; ROSALÉM, W.; MENDES, M.C.; SOUTO, R.M.; UZEDA, M. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. **J. Periodontol.**, v. 76, p.778-784, 2005.

CORTELLI, J.R.; CORTELLI, S.C.; JORDAN, S.; HARASZTHY, V.I.; ZAMBON, J.J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p. 860-866, 2005.

CUGINI, M.A.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, C.; KENT, JR R.L.; SOCRANSKY, S.S. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, p. 30-36, 2000.

CUTLER, C.W.; KALMAR, J.R.; GENCO, C.A. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. **Trends Microbiol.**, v. 3, n. 2, p. 45-51, 1995.

DARVEAU, R.P.; BELTON, C.M.; REIFE, R.A.; LAMONT, R.J. Local chemokine paralysis: a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1660-1665, 1998.

DERDILOPOULOU, F.V. Microbiological findings after periodontal therapy using curettes, Er:YAG laser, sonic, and ultrasonic scalers. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 7, p. 588-598, 2007.

DEWHIRST FE. The diversity of periodontal spirochetes by 16SrRNA analysis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, p. 196-202, 2000.

DIETRICH, T.; BERNIMOULIN, J.P.; GLYNN, R.J. The effect of cigarette smoking on gingival bleeding. **J. Periodontol.**, v. 75, p. 16-22, 2004.

DOUNGUDOMDACHA, S.; RAWLINSON, A.; WALSH, T.F.; DOUGLAS, C.W.I. 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.**, v. 28, p. 437-445, 2001.

DU LAURENCE; MUSSI-PELLEN, P.; CHANDAD, F.; MOUTON, C.; BONNAURE-MALLET, M. Fimbriae and the hemagglutinating adhesion HA-Ag2 mediate adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 3875-3881, 1997.

EHMKE, B.; MOTER, A.; BEIKLER, T.; MILIAN, E.; FLEMMIG, T.F. Adjunctive antimicrobial therapy of periodontitis: long-term effects on disease progression and oral colonization. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 5, p. 749-759, 2005.

EICK, S.; RODEL, J.; EINAX, J. W.; PFISTER, W. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, p. 201-208, 2002.

FERES, M.; HAFFAJEE, A.D.; ALLARD, K.; SOM, S.; SOCRANSKY, S.S. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 7, p. 597-609, 2001.

FERES, M.; HAFFAJEE, A.D.; ALLARD, K.; SOM, S.; GOODSON, S.; SOCRANSKY, S.S. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, p.724-735, 2002.

GENCO, C.A.; CUTLER, C.W.; KAPCZYNSKI, D.; MALONEY, K.; ARNOLD, R.R. A novel mouse model to study the virulence of and host response to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. **Infect. Immun.**, v.59, p.255-263, 1991.

GOMES, S.G.; PICCININ, F.B.; OPPERMAN, R.V.; SUSIN, C.; NONNENMACHER, C.I.; MUTTERS, R. Periodontal status in smokers and never-smokers: Clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. **J. Periodontol.**, n. 77, p. 1483-1490, 2006.

GRENIER, D.; MAYRAND, D. Selected Characteristics of Pathogenic and Nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p.738-740, 1987.

[GRENIER, D.; GOULET, V.; MAYRAND, D. The capacity of *Porphyromonas gingivalis* to multiply under iron-limiting conditions correlates with its pathogenicity in an animal model. **J. Dent. Res.**, v. 80, n. 7, p.1678-1682, 2001.](#)

GRIFFEN, A.L.; LYONS, S.R.; BECKER, M.R.; MOESCHBERGER, M.L.; LEYS, E.J. *Porphyromonas gingivalis* strain variability and periodontitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 4028-4033, 1999.

GROSSI, S.G.; SKREPCINSKI, F.B.; DECARO, T.; ZAMBON, J.J.; CUMMINS, D.; GENCO, R.J. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. **J. Periodontol.**, 1996; 67:1094-102.

GURSKY, L.C.; FAVERI, M.; FIGUEREDO, L.C.; FERES, M.; ARAUJO, M.W.B. Reprodutibilidade de parâmetros clínicos periodontais: erro intra- e inter-examinadores. **Rev. Paul. Odontol.**, No prelo 2005

HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; DIBART, S.; SMITH, C.; KENT JR, R.L.; SOCRANSKY, S.S. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, p.324-334, 1997.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 377-388, 2001.

HAFFAJEE, AD.; BOGREN, A.; HASTURK, H.; FERES, M.; LÓPEZ, N.J.; SOCRANSKY, S.S. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, p. 996-1002, 2004.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbiology of periodontal diseases: introduction. **Periodontology**, v. 38, p. 9-12, 2005.

HAFFAJEE, A.D.; TELES, R.P.; SOCRANSKY, S.S. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. **Periodontology**, v. 42, p. 219–258, 2006.

HELLSTROM, M.K.; RAMBERG, P.; KROK, L.; LINDHE, J. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microflora in human periodontitis. **J. Clin. Periodontol.** v. 23, p. 934-940, 1996.

HENGARTNER, M.O.; BRYANT, J.A. Apoptotic cell death: from worms to wombats ... but what about the weeds? **Symp. Soc. Exp. Biol.** v. 52, p.1-12, 2000.

HIRAMINE, H.; WATANABE, K.; HAMADA, N.; UMEMOTO, T. *Porphyromonas gingivalis* 67-kDa fimbriae induced cytokine production and osteoclast differentiation utilizing TLR2. **FEMS Microbiol. Lett.** V. 229, p. 49-55, 2003.

HOLT, S.C.; KESAVALU, L.; WALKER, S.; GENCO, C.A. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontology**, v. 20, p.168-238, 1999.

HULL, P.S.; ABU, F.S.; DRUCKER, D.B. Evaluation of two antibacterial agents in the management of rapidly progressive periodontitis. **J. Dent. Res.** v. 68, p. 564, 1989.

JERVØE-STORM, P.M.; ALAHDAB, H.; SEMAAN, E.; FIMMERS, R.; JEPSEN, S. Microbiological outcomes of quadrant versus full-mouth root planing as monitored by real-time PCR. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 2, p.156-163, 2007.

KATO, T.; KAWAI, S.; NAKANO, K.; INABA, H.; KUBONIWA, M.; NAKAGAWA, I.; TSUDA, K.; OMORI, H.; OOSHIMA, T.; YOSHIMORI, T.; AMANO, A. Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. **Cell Microbiol.**, v. 9, n. 3, p.753-765, 2007.

KAWADA, M.; YOSHIDA, A.; SUZUKI, N.; NAKANO, Y.; SAITO, T.; OHO, T.; KOGA, T. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 289-292, 2004.

KINANE, D.F.; RADVAR, M. The effect of smoking on mechanical and antimicrobial periodontal therapy. **J. Periodontol.** v. 68, p.467-472, 1997.

LAMONT, R.J.; JEKINSON, H.F. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol **Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 1244-1263, 1998.

LANG, N.P.; ADLER, R.; JOSS, A.; NYMAN, S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. **J. Clin. Periodontol.**, v. 17, p. 714-721, 1990.

LO BUE, A.M.; ROSSETTI, B.; CALI, G.; NICOLETTI, G.; CONDORELLI, F. Antimicrobial interference of a subinhibitory concentration of azithromycin on fimbrial production of *Porphyromonas gingivalis* **J. Antimicrob. Chemother.**, v.40, p. 653-657, 1997.

LÓPEZ, N.J.; GAMONAL, J.A. Effects of metronidazole plus amoxicillin in progressive untreated adult periodontitis: results of a single 1-week course after 2 and 4 months. **J. Periodontol.**, v.69, n. 11, p.1291-1298, 1998.

LÓPEZ, N.J.; GAMONAL, J.A.; MARTINEZ, B. Repeated metronidazole and amoxicillin treatment of periodontitis. A follow-up study. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 1, p.79-89, 2000.

LÓPEZ, N.J.; SOCRANSKY, S.S.; DA SILVA, I.; JAPLIT, M.R.; HAFFAJEE, A.D. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, n.9, p.648-660, 2006.

MAO, S.; PARK, Y.; HASEGAWA, Y.; TRIBBLE, G.D.; JAMES, C.E.; HANDFIELD, M.; STAVROPOULOS, M.F.; YILMAZ, O.; LAMONT, R.J. Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. **Cell Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 1997-2007, 2007.

MASCARENHAS, P.; GAPSKI, R.; AL-SHAMMARI, K.; HILL, R.; SOHREN, S.; FENNO, J.C. Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. **J. Periodont.**, v. 76, p. 426-436, 2005.

MIRBOD, S.M.; AHING, S.I.; PRUTHI, V.K. Immunohistochemical study of vestibular gingival blood vessels density and internal circumference in smokers and non-smokers. **J. Periodontol.**, v. 72, p. 1318-1323, 2001.

MISSAILIDIS, C.G.; UMEDA, J.E.; OTA-TSUZUKI, C.; ANZAI, D.; MAYER, M.P.A. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with different periodontal conditions. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 224-229, 2004.

MOMBELLI, A.; SCHMID, B.; RUTAR, A.; LANG, N.P. Persistence of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 14-21, 2000.

NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; KUBONIWA, M.; NAKAMURA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Functional differences among *fimA* variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion and invasion of human epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 277-285, 2002.

NAKHJIRI, S.F.; PARK, Y.; YILMAZ, O.; CHUNG, W.O.; WATANABE, K.; EL-SABAENY, A.; PARK, K.; LAMONT, R.J. Inhibition of epithelial cell apoptosis by *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 200, n. 2, p. 145-149, 2001.

NATTO, S.; BALJOON, M.; DAHLÉN, G.; BERGSTRÖM, J. Tobacco smoking and periodontal microflora in a Saudi Arabian population. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p. 549-555, 2005.

NOWZARI, H.; LONDON, R.; SLOTS, J. The importance of periodontal pathogens in guided periodontal tissue regeneration and guided bone regeneration. **Compend Contin Educ Dent.**, v. 16, n. 10, p. 1042, 1995.

OHNO, T.; OKAHASHI, N.; KAWAI, S.; KATO, T.; INABA, H.; SHIBATA, Y.; MORISAKI, I.; ABIKO, Y.; AMANO, A. Proinflammatory gene expression in mouse ST2 cell line in response to infection by *Porphyromonas gingivalis*. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 4, p.1025-1034, 2006.

PALMER, R.M.; MATTHEWS, J.P.; WILSON, R.F. Non-surgical periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole in smokers and non-smokers. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, p. 158-163, 1999.

PALMER, R.M.; WILSON, R.F.; HASAN, A.S.; SCOTT, D.A. Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 6, p. 180-195, 2005.

PAWLOWSKI, A.P.; CHEN, A.; HACKER, B.M.; MANCL, L.A.; PAGE, R.C.; ROBERTS, F.A. Clinical effects of scaling and root planing on untreated teeth. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p.21-28, 2005.

POGGI, P.; ROTA, M.; BORATTO, R.; Volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast skeleton. **J. Periodont. Res.**, v. 37, p. 230-225, 2002.

RAMS, T.E.; LISTGARTEN, M.A.; SLOTS, J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. **J. Clin. Periodontol.**, v. 23, p. 346-354, 1996.

RIGGIO, M.P.; MACFARLANE T.W.; MACKENZIE, D.; LENNON, A.; SMITH, A.J.; KINANE, D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J. Periodontal. Res.**, v.31, n. 7, p. 496-501, 1996.

ROONEY, J.; WADE, W.G.; SPRAGUE, S.V.; NEWCOMBE, R.G.; ADDY, M. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic

metronidazole and amoxycillin alone and combined. A placebo controlled study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, n. 4, p.342-350, 2002.

SAKAMOTO, M.; TAKEUCHI, Y.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I.; BENNO, Y. Rapid Detection and Qualification of five periodontopathic bacteria by real-time pcr. **Microbiol. Immunol.** v. 45, n. 1, p.39-44, 2001.

SAKAMOTO, M.; HUANG, Y.; OHNISHI, M.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I.; BENNO, Y. Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. **J Med. Microbiol.**, v. 53, p. 563-571, 2004.

SHIMAZAKI, Y.; TOSHIYUKI, S.; YUTAKA, K.; ISAO, K.; MICHIAKI, K. The influence of current and former smoking on gingival bleeding: the Hisayama study. **J. Periodontol.**, v. 77, p. 1430-1435, 2006.

SILVERSTEIN, P. Smoking and wound healing. **Am. J. Med.** v. 93, n. 1A, p. 22S-24S, 1992.

SLOTS, J. Uptade on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. **J. Int. Acad. Periodontol.**, v.1, p.121-126, 1999.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. **J. Clin. Periodontol.**, v. 18, p. 688-693, 1994.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; DZINK, J.L.. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, p.134-144, 1998.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, C.; DUFF, G.W. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, p. 810-818, 2000.

SÖDER, B.; NEDLICH, U.; JIN, L.J. Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. **J. Periodontol.**, v. 70, n. 7, p. 761-771, 1999.

SUGANO, N.; IKEDA, K.; OSHIKAWA, M.; SAWAMOTO, Y.; TANAKA, H.; ITO, K. Differential cytokine induction by two types of *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p.121-123, 2004.

SUTTER, V.L.; JONES, M.J.; GHONEIM, A.T. Antimicrobial susceptibilities of bacteria associated with periodontal disease. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 23, n. 3, p. 483-486, 1983.

TEANPAISAN, R.; DOUGLAS, C.W.I. Molecular fingerprinting of *Porphyromonas gingivalis* by PCR of repetitive extragenic palindromic (REP) sequences and comparison with other fingerprinting methods. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 741-749, 1999.

TELES, R.P.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbiological goals of periodontal therapy. **Periodontology** 2000, v. 42, p. 180-218, 2006.

TELES, R.P.; BOGREN, A.; PATEL, M.; WENNSTROM, J.L.; SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. A three-year prospective study of adult subjects with gingivitis II: microbiological parameters. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 1, p. 7-17, 2007.

TUAN, M.C.; NOWZARI, H.; SLOTS, J. Clinical and microbiologic study of periodontal surgery by means of apically positioned flaps with and without osseous recontouring. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 20, p.468-475, 2000.

UMEDA, J.E.; MISSAILIDIS, C.; LONGO, P.L.; ANZAI, D.; WIKSTROM, M.; MAYER, M.P.A. Adhesion and invasion to epithelial cells by *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 21, p. 415-419, 2006.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 29, p. 151-159, 2005.

VAN DER PLOEG, J.R.; GIERTSEN, E.; LÜDIN, B.; MÖRGELI, C.; ZINKERNAGEL, A.S.; GMÜR, R. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in dental plaque. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 232, p.31-37, 2004.

VAN DER VELDEN, U.; VAROUFAKI, A.; HUTTER, J.W.; XU, L.; TIMMERMAN, M.F.; VAN WINKELHOFF, A.J. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, n. 7, p. 603-610, 2003.

VERNER, C.; LEMAITRE, P.; DANIEL, A.; GIUMELLI, B.; LAKHSSASSI, N.; SIXOU, M. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 21, n. 6, p.341-346, 2006.

WALKER, C.B.; PAPPAS, J.D.; TYLER, K.Z.; COHEN, S.; GORDON, J.M. Antibiotic susceptibilities of periodontal bacteria. In vitro susceptibilities to eight antimicrobial agents. **J. Periodontol.**, v. 56, p. 67-74, 1985.

WINKEL, E.G.; VAN WINKELHOFF, A.J.; TIMMERMAN, M.F.; VANGSTED, T.; VAN DER VELDEN, U. Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, p. 573-579, 1997.

WINKEL, E.G.; VAN WINKELHOFF, A.J.; VAN DER VELDEN, U. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after periodontal therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, p. 857-864, 1998.

WINKEL, E.G.; VAN WINKELHOFF, A.J.; TIMMERMAN, M.F.; VAN DER VELDEN, U.; VAN DER WEIJDEN, G.A. Amoxicillin plus metronidazole in

the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 4, p. 296-305, 2001.

XIMÉNEZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOM, S.; THOMPSON, M.; TORRESYAP, G.; SOCRANSKY, S.S. The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, p.637-647, 2000.

YILMAZ, O.; VERBEKE, P.; LAMONT, R.J.; OJCIUS. D.M. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 703-710, 2006.