

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**LUCIANA MACHION**

**CIRURGIÃ-DENTISTA**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DO USO LOCAL DA  
DOXICICLINA COMO ADJUNTO À TERAPIA PERIODONTAL EM  
PACIENTES FUMANTES. ESTUDO LONGITUDINAL DE 2 ANOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Clínica Odontológica, Área de Periodontia.

**Piracicaba**

**- 2005 -**

**LUCIANA MACHION**  
CIRURGIÃ DENTISTA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DO USO LOCAL DA  
DOXICICLINA LOCAL COMO ADJUNTO À TERAPIA  
PERIODONTAL EM PACIENTES FUMANTES. ESTUDO  
LONGITUDINAL DE 2 ANOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Clínica Odontológica, Área de Periodontia.

**Orientador:** Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum

**Co-orientador:** Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

**Banca Examinadora:**

Prof.Dr. Joni Augusto Cirelli

Profa. Dra. Magda Feres

Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo

Prof. Dr. Sergio de Toledo

**Piracicaba**

**- 2005 -**

## Ficha Catalográfica

M184a Machion, Luciana.  
Avaliação clínica e microbiológica do uso local da doxiciclina como adjunto à terapia periodontal em pacientes fumantes. estudo longitudinal de 2 anos. / Luciana Machion. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

Orientadores: Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum; Francisco Humberto Nociti Jr.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Doxiciclina. 2. Periodontite. 3. Quimioterapia adjuvante. 4. Análise microbiológica. 5. Tabagismo. I. Sallum, Enilson Antonio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(hmc/fop)

Palavras-chave em inglês (Keywords): 1. Doxycycline. 2. Periodontitis. 3. Chemotherapy, adjuvant. 4. Microbiological analysis. 5. Smoking.

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Joni Augusto Cirelli; Magda Feres; Roberto Fraga Moreira Lotufo; Sergio de Toledo.

Data da defesa: 15 fev. 2005



## DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Pedro e Ana**, a quem devo a história do meu crescimento profissional e moral, dedico este trabalho com todo o meu amor e carinho.

Aos meus irmãos **Daniel e Márcio**, pessoas maravilhosas, ao redor das quais tive a oportunidade de crescer, conviver e aprender muito.

Aos meus **pacientes**, os grandes pilares deste trabalho, a quem dedico a minha busca por respostas.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À querida **Denise**, pelo essencial auxílio na realização deste trabalho, pela paciência, boa vontade e pela agradável companhia durante o período de realização deste trabalho.

À minha querida pupila, amiga e colega de trabalho, **Giovana**, pela oportunidade que me deu de aprender a ensinar, pela amizade e carinho e pela essencial contribuição na parte final deste trabalho.

A **Deus**, pela oportunidade de passar pela divina experiência da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Enilson Antonio Sallum**, por ter acreditado no meu potencial, oferecendo-me a oportunidade de fazer parte da valiosa vida acadêmica e por ter transmitido, ao longo dos anos, seu imenso conhecimento científico, através da invejável tranqüilidade com que trabalha a “ciência da vida”.

Ao Prof. Dr. **Francisco Humberto Nociti Junior**, pelo seu incansável questionamento da ciência, responsável pelo meu inicial interesse pela Periodontia e pela vida acadêmica e por ter sido sempre grande motivador da minha busca por respostas.

Ao Prof. Dr. **Márcio Zaffalon Casati**, pelo auxílio inicial neste trabalho científico e pelo exemplo do jovem e estimulante caráter profissional.

Ao Prof. Dr. **Antonio Wilson Sallum**, por ter transmitido sua enorme experiência de vida profissional e moral, ensinando-nos, não somente o valor da ciência e da saúde, como o grande valor do ser humano.

Ao Prof. Dr. **Sérgio de Toledo**, pelo exemplo de vida profissional e ilimitada contribuição para a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Antonio Fernando Martorelli de Lima**, pelo conhecimento clínico e científico transmitido ao longo da minha vida acadêmica e pelo exemplo de excelente profissional.

Ao Prof. Dr. **Clay Walker**, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, na Universidade da Flórida, e adquirir experiência com a pesquisa microbiológica.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro fornecido para a realização deste trabalho durante a fase inicial e à **CAPES** pelo apoio financeiro durante a fase experimental no exterior.

À Universidade Estadual de Campinas (**Unicamp**), nas pessoas do Magnífico Reitor Prof. Dr. **Carlos Henrique de Brito Cruz**, e Vice Reitor Prof. Dr. **José Tadeu Jorge**.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Digníssimo Diretor Prof. Dr. **Thales Rocha de Mattos Filho** e Vice Diretor **Oslei Paes de Almeida**.

Ao Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP e à Profa. Dra. **Roger William Fernandes Moreira**, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Às colegas de trabalho **Sonia Nangó** e **Jennifer Gollwitzer** pelo auxílio na realização dos experimentos microbiológicos no exterior e pela amizade que desenvolvemos neste período.

À Prof. Dra. **Gláucia Maria Bovi Ambrosano** pelo auxílio na realização da parte estatística deste trabalho

Ao querido tutor científico e grande amigo **Getúlio**, por todo o incentivo e auxílio na vida científica desde o segundo ano de graduação, e por ter sido grande motivador da minha carreira acadêmica.

À querida **Eliete**, secretária da Área de Periodontia, pela amizade, agradável convivência, auxílio e imensurável paciência para com todos os alunos da pós-graduação.



Aos grandes companheiros e amigos de mestrado e doutorado **Antonieta, Ângela, Bruno César, Cristina, Fernando, João, Juliana, Patricia, Poliana, Renato, Robert e Suzana**, pelo companheirismo, pela harmoniosa divisão de responsabilidades e pela oportunidade de grande crescimento científico e pessoal através do trabalho em conjunto. Agradeço em especial ao **Renato**, que foi para mim mais que um companheiro acadêmico.

Às queridas **Patrícia, Poliana e Vanessa**, companheiras de moradia, pela paciência, pelo apoio e por todos os ótimos momentos de convivência.

Aos amigos **Bruno e Marcelo**, pelo constante auxílio nas atividades da pós-graduação e nos trabalhos pararelos que desenvolvemos juntos.

Às queridas “**Cida**” e “**Lídia**”, secretárias da clínica de especialização, pela enorme boa vontade e colaboração no manejo e atendimento de pacientes.

A todos os funcionários desta instituição, que possibilitaram meu trabalho e minha convivência em um ambiente sempre muito agradável.

A todos os meus amigos, dentro e fora da faculdade, que estiveram ao meu lado durante esta etapa, tornando nossa jornada muito mais agradável.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho...

**Meus sinceros agradecimentos.**

# SUMÁRIO

---

	<b>Página</b>
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. Antimicrobianos na Terapia Periodontal	8
2.2. Antimicrobianos Sistêmicos x Antimicrobianos Locais	9
2.3. Antimicrobianos Locais	10
2.4. Dispositivos de Liberação Sustentada e Controlada	11
2.5. Doxiciclina	14
2.5.1. Gel de Doxiciclina – Aplicação Local	14
2.5.2. Concentrações da Doxiciclina	15
2.5.3. Aspectos microbiológicos	15
2.6. Estudos Clínicos	17
3 PROSIÇÃO	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Seleção da Amostra	22
4.2. Preparo Inicial	23
4.3. Parâmetros Clínicos e Períodos de Observação	23
4.4. Sondagem Eletrônica Computadorizada	24
4.5. Tratamentos	25
4.6. Análise Microbiológica	28
4.6.1. Coleta de Placa	28
4.6.2. Análise de PCR (Polimerase Chain Reaction)	29
4.6.3. Análise de “Checkerboard DNA-DNA Hybridization”	32
4.7. Forma de Análise dos Resultados	37

---

---

5 RESULTADOS	38
5.1. Resultados Clínicos	38
5.1.1. Índice de Placa	39
5.1.2. Sangramento à Sondagem	40
5.1.3. Recessão Gengival	41
5.1.4. Profundidade de Sondagem	42
5.1.5. Nível de Inserção Clínica Relativo	45
5.2. Resultados Microbiológicos	48
5.2.1. PCR	48
5.2.2. Checkerboard	51
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	75

---

## **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade a longo prazo da associação de liberação local de doxiciclina (ATRIDOX\*) à raspagem e alisamento radicular quanto à resposta clínica e microbiológica no tratamento periodontal de fumantes. Foram selecionados 43 pacientes fumantes, portadores da doença periodontal crônica, apresentando mínimo de 4 bolsas periodontais ( $\geq 5\text{mm}$ ) com sangramento à sondagem em dentes anteriores. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: RAR = Raspagem e alisamento radicular; e RAR-D = raspagem e alisamento radicular seguida de aplicação de doxiciclina. Esses tratamentos foram realizados nos períodos inicial e aos 12 meses. Avaliações do índice de placa (IPL), sangramento à sondagem (SS), recessão gengival (RG), nível de inserção clínica relativo (NICr) e profundidade de sondagem (PS) foram realizadas nos períodos inicial, 45 dias, 3, 6 e 12 meses, 45 dias após o retratamento e novamente aos 15, 18 e 24 meses. Além disso, coleta de placa subgengival foi realizada nos mesmos períodos, até os 15 meses e análise de PCR e “Checkerboard DNA-DNA hybridization” foram realizadas. O teste *t* de Student demonstrou valores iniciais similares para ambos os grupos em todos os parâmetros ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros IPL, SS e RG em nenhum dos períodos ( $p > 0,05$ ). As maiores diferenças entre os grupos se deu nas bolsas inicialmente profundas ( $\geq 7\text{mm}$ ). Para essas bolsas, o grupo RAR-D mostrou maiores ganhos em PS aos 6 e aos 18 meses (diferenças entre os grupos de 1,18 e 1,73mm, respectivamente,  $p < 0,05$ ). O ganho em NICr também foi maior para RAR-D aos 6, 18 e 24 meses (diferença de 1,16, 1,99 e 1,78mm, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Além disso, a proporção de sítios que apresentaram redução em PS  $\geq 2\text{mm}$  foi maior para RAR-D aos 6 meses (81,2 x 50,8%,  $p < 0,001$ ) e aos 24 meses (65,5 x 46,5% para RAR-D e RAR respectivamente,  $p = 0,01$ ). Quanto ao ganho em NIC, esta proporção foi de 34,4% para RAR-D e 18,1% para RAR ( $p = 0,008$ ). A análise microbiológica detectou reduções significantes nas proporções de *Tannerella forsythensis* e

*Porphyromonas gingivalis* em ambos os grupos, porém esta ocorreu a partir dos 3 meses para o grupo RAR-D e a partir dos 6 meses para RAR e a diferença entre os grupos somente se deu aos 3 meses pós-tratamentos inicial e de manutenção para proporções de sítios com *Pg* (58 x 25% e 47 x 8%, respectivamente). Em vista dos resultados obtidos, pode-se concluir que a utilização da liberação local de doxiciclina associada à raspagem e alisamento radicular pode trazer benefícios adicionais para o tratamento periodontal de pacientes fumantes.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the long term clinical and microbiological responses to the association of locally delivered doxycycline with scaling and root planing in the periodontal treatment of smokers. Forty-three chronic periodontitis patients, presenting a minimum of 4 pockets ( $\geq 5\text{mm}$ ) that bled on probing on anterior teeth were selected. Patients were randomly assigned to receive one of the following treatments: scaling and root planing (SRP) and scaling and root planing followed by local application of doxycycline (SRP-D). Assigned treatments were performed at baseline and 12 months. Plaque, bleeding on probing, gingival recession, relative attachment level (RAL) and probing depth (PD) were recorded at baseline, 45 days, 3, 6 and 12 months, 45 days following retreatment and at 15, 18 and 24 months. Subgingival plaque samples were also obtained at the same time intervals up to 15 months, for the analysis by PCR and Checkerboard. Student *t* test showed similar baseline values for both groups in all parameters ( $p>0,05$ ). At all time points, plaque, bleeding reduction and gingival recession were similar between groups ( $p>0,05$ ). Most significant differences between groups were found at initially deep pockets ( $\geq 7\text{mm}$ ), where SRP-D showed greater values in PD reduction than SRP at 6 and 18 months (mean difference of 1.18 and 1.73mm, respectively,  $p<0,05$ ) and in RAL gain at 6, 18 and 24 months (mean difference of 1.16, 1.99 and 1.78mm, respectively,  $p<0,05$ ). Also, proportion of sites showing  $\geq 2\text{mm}$  PD reduction was greater for SRP-D at 6 months (81,2 x 50,8%,  $p<0,001$ ) and at 24 months (65,5 x 46,5%, respectively,  $p=0,01$ ). As for RAL gain, this proportion was 34.4 and 18.1% for SRP-D and SRP, respectively ( $p=0,008$ ). The bacterial analysis detected significant reductions in the proportions of *T.forsythus* and *P.gingivalis* in both groups, however, this occurred earlier at 3 months for the SRP-D group and later at 6 months for the SRP group ( $p<0.05$ ) and the difference between groups was statistically significant at 3 months for the proportion of sites with *Pg* after first and second application of the drug (58 x 25% and 47 x 8%, respectively). According to the results obtained in

the present investigation, it can be concluded that the use of locally delivered doxycycline associated with scaling and root planing provides additional benefits for the periodontal treatment of smokers.

## **1 INTRODUÇÃO**

O objetivo primordial da terapia periodontal constitui na alteração da microbiota subgengival presente nos sítios comprometidos pela doença periodontal, uma vez que a presença destes microorganismos pode resultar na destruição progressiva do periodonto (Garrett *et al.*, 1999).

Sabe-se que a raspagem e alisamento radicular são mecanismos eficazes no combate à doença periodontal (Kaldahl *et al.*, 1988). Entretanto, a preocupação com a eliminação de patógenos do interior das bolsas periodontais tem conduzido estudos a respeito do uso de antimicrobianos no tratamento da doença periodontal. Assim, métodos auxiliares têm sido estudados objetivando resultados ainda mais satisfatórios ao final da terapia periodontal. Dentre estes métodos, a utilização de agentes antimicrobianos têm sido indicada, tanto sistemicamente quanto localmente, coadjuvando o tratamento mecânico (Wennström, 1987; Ciancio, 1998; Van Steenberghe *et al.*, 1999).

A aplicação local de agentes antimicrobianos no interior de bolsas periodontais tem apresentado resultados satisfatórios, já que a substância permanece em ação no local por maior tempo, em maiores concentrações, e a probabilidade de ocorrência de efeitos colaterais, freqüentemente associados com a medicação sistêmica, diminui (Golub *et al.*, 1994; Wennström, 1997; van Steenberghe *et al.*, 1999).

O hiclato de doxiciclina tem sido utilizado como antimicrobiano local no tratamento da doença periodontal. Este antimicrobiano é utilizado na forma de gel, em um sistema de liberação controlada, o qual mantém a droga no sítio de ação em quantidade acima da concentração inibitória mínima (MIC<sub>90</sub>) para inibição de patógenos periodontais, por um período de 7 a 10 dias (Stoller *et al.*, 1998).

Inicialmente, estudos indicaram a utilização local deste gel antimicrobiano como forma definitiva de tratamento, eliminando o procedimento de raspagem e alisamento radiculares, apresentando resultados efetivos no combate à doença periodontal (Polson *et al.*, 1997; Garrett *et al.*, 1999). No entanto, estudos



recentes, como o de Wennström *et al.* (2001) e Eickholz *et al.* (2002), avaliaram o efeito adjunto deste medicamento local após instrumentação subgengival e verificaram benefícios clínicos adicionais deste tratamento quando comparado à raspagem e alisamento convencional.

Outros trabalhos visaram a análise destas drogas locais no tratamento de pacientes fumantes. Sabe-se que o tratamento periodontal de pacientes fumantes é comprometido por diversas alterações vasculares e celulares que acometem estes hospedeiros (Kaldahl *et al.*, 1996). Estudos como os de Kinane & Radvar (1997) e Palmer *et al.* (1999) avaliaram o efeito do fumo no tratamento da doença periodontal utilizando raspagem e alisamento radicular associada ou não a antimicrobianos locais. Nesses estudos não foi encontrado nenhum benefício adicional das drogas locais ao tratamento desses pacientes. Já o estudo de Ryder *et al.* (1999) demonstrou que pacientes fumantes tratados com doxiciclina local apresentaram resultados similares a pacientes não-fumantes sob o mesmo tratamento, o que indica um possível benefício na utilização desse antimicrobiano local na terapia destes pacientes. Mais recentemente, os estudos de Machion *et al.* (2004) e Tomasi *et al.* (2004) vieram demonstrar o efeito benéfico do tratamento adjunto de doxiciclina local à raspagem e alisamento radicular em fumantes, especificamente no tratamento de bolsas inicialmente profundas (Machion *et al.*, 2004). Outros estudos ainda avaliaram a efetividade destas drogas na microbiota subgengival (Goodson *et al.*, 1985, Jorgensen *et al.*, 2004), porém ainda não está claro o efeito destes agentes sobre a microbiota subgengival.

É ainda recente a investigação sobre esses agentes de liberação controlada no tratamento periodontal na literatura e portanto, outros estudos são necessários para se estabelecer seu real benefício clínico e microbiológico, principalmente em relação à manutenção dos resultados obtidos à longo prazo, para que se possa estabelecer a sua correta indicação.

Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar, clínica e microbiologicamente, a ação de um gel contendo hclato de doxiciclina (ATRIDOX<sup>1</sup>), aplicado subgingivalmente, associado à raspagem e alisamento radicular em comparação à terapia mecânica convencional no tratamento periodontal, inicial e de manutenção à longo prazo, em pacientes fumantes.

---

<sup>1</sup> ATRIDOX, Collagenex, Ft Collins, CO

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Antimicrobianos na Terapia Periodontal**

Clássicos experimentos demonstraram que o acúmulo de biofilme dental nas superfícies dentárias induz uma resposta inflamatória nos tecidos gengivais adjacentes e que a remoção deste biofilme resulta no desaparecimento dos sinais clínicos da inflamação (Loe *et al.*, 1965; Theilade *et al.*, 1966).

A remoção mecânica regular do biofilme das superfícies dentárias é considerada a medida primária para prevenir e estancar a progressão da doença periodontal. O tratamento mecânico da superfície dentária consiste na remoção do biofilme dental, cálculo, cemento contaminado, tecido de granulação e porção coronal do epitélio juncional, removendo dessas superfícies fatores que provocam ou modificam a doença periodontal (Adriaens *et al.*, 1988). Em geral, a doença periodontal pode ser tratada com sucesso através de raspagem e alisamento radicular e os resultados da terapia podem ser mantidos por um período prolongado de tempo por métodos de higiene oral meticulosos e regulares (Kaldhahl *et al.*, 1988; Cobb, 1996).

No entanto, estudos longitudinais têm indicado que alguns indivíduos que passaram por tratamento periodontal não-cirúrgico (raspagem e alisamento radicular) e que se encontravam sob tratamento periodontal de suporte apresentavam doença recorrente ou refratária em alguns sítios (Lang *et al.*, 1996, Serino *et al.*, 2001). As razões que explicam esta recorrência da doença ou não resposta efetiva de alguns sítios não são claras, porém pode-se sugerir a inclusão de alguns fatores como controle de placa não-adequado, neoformação de placa subgengival e incompleta remoção da microbiota subgengival durante a fase inicial de tratamento (Rosling *et al.*, 2001).

A terapia mecânica periodontal reduz a quantidade total de bactérias supra e subgengivais encontradas nos sítios comprometidos, porém observações feitas em diversos estudos demonstram que a completa remoção do biofilme e de depósitos de cálculo subgengivais é rara e que depósitos residuais são

freqüentes, principalmente em sítios profundos (Walker & Ash, 1976, Caffesse *et al.*, 1986). Além disso, certos patógenos permanecem nos sítios tratados devido a sua habilidade de invadir os tecidos periodontais (Christersson *et al.*, 1987) ou devido à sua localização em sítios inacessíveis pela instrumentação periodontal não-cirúrgica. A permanência de certas bactérias, como o *A. actinomycetemcomitans*, após terapia periodontal mecânica, tem sido relatada (Mombelli *et al.*, 1994b, 1994a), principalmente em bolsas profundas sangrantes. Presença de *T.denticola* (Simonson *et al.*, 1992), *P.gingivalis* e *P.intermedia* (Sato *et al.*, 1993; Haffajee *et al.*, 1997; Chaves *et al.*, 2000; Mombelli *et al.*, 2000) *F.nucleatum* (Sato *et al.*, 1993) e *T.forsythensis* (Listgarten *et al.*, 1993; Haffajee *et al.*, 1997) também foram encontradas em sítios que não responderam ao tratamento mecânico inicial.

Estes achados têm suportado o uso de agentes antimicrobianos, tanto locais quanto sistêmicos, na terapia periodontal, associado à instrumentação mecânica, podendo suprimir ou reduzir significativamente a quantidade de patógenos periodontais e dessa forma, trazer benefícios adicionais à terapia mecânica convencional (Rams & Slots, 1996).

## **2.2 Antimicrobianos sistêmicos x Antimicrobianos Locais**

O uso de antibióticos sistêmicos foi preconizado como forma de terapia adjunta à raspagem e alisamento radicular. Entretanto, algumas desvantagens são observadas na sua utilização. Em uma revisão sobre a utilização de antibióticos sistêmicos e locais, Slots & Rams (1990) relataram como desvantagens da via sistêmica: efeitos colaterais adversos geralmente associados ao uso de medicamentos sistêmicos; a aplicação de drogas sistêmicas requer a cooperação do paciente; a via local de aplicação permite o alcance de concentrações subgingivais de drogas antimicrobianas até 100 vezes maiores do que as atingidas com drogas via sistêmica (Stoller *et al.*, 1998; Goodson *et al.*, 1985); e a

via local permite a utilização de alguns antimicrobianos que não podem ser utilizados sistemicamente. Assim, o interesse pelo conhecimento e avaliação da efetividade de drogas locais vem conduzindo estudos envolvendo diferentes dispositivos de aplicação e agentes antimicrobianos.

### **2.3 Antimicrobianos Locais**

As substâncias antimicrobianas locais têm sido preconizadas no tratamento da doença periodontal com o intuito de combater os efeitos indesejáveis dos agentes sistêmicos e promover ação antibacteriana em concentrações desejáveis nos sítios comprometidos pela doença.

Inicialmente, estas substâncias foram utilizadas como irrigantes subgingivais, aplicadas tanto pelo profissional como pelo próprio paciente. A clorexidina foi uma das substâncias estudadas como adjunto à terapia periodontal, administrada em dose única ou em repetidas doses pós-terapia mecânica (Macalpine *et al.*, 1985; Wennstrom *et al.*, 1987). Embora Rosling *et al.* (2001) tenham encontrado efeitos benéficos no uso adjunto do iodo-povidine, os irrigantes, em geral, não têm demonstrado benefícios adicionais significantes à terapia mecânica convencional. Este fato pode ser atribuído à incapacidade destes agentes em manter concentrações efetivas da droga no local de ação por tempo suficiente. Esta redução na concentração dos agentes irrigantes no ambiente subgingival é atribuída à constante renovação do fluido crevicular. Goodson *et al.* (1989) demonstrou que, numa bolsa periodontal de aproximadamente 5mm de profundidade, a troca de fluido crevicular é feita cerca de 40 vezes por hora. Estes autores estimaram que a meia vida de um agente farmacológico no sulco gengival é de aproximadamente 1 minuto. Assim, um importante fator a ser considerado no tratamento com drogas locais é o tempo de contato da droga com a microbiota subgingival (Solskone *et al.*, 1997). Portanto, para atividade efetiva de uma droga aplicada localmente, é necessário um sistema de liberação lenta da mesma,

proporcionando concentrações acima da concentração inibitória mínima para a inativação de patógenos periodontais, por adequado período de tempo.

#### **2.4 Dispositivos de liberação local sustentada e controlada**

Os dispositivos de liberação local de drogas estão classificados na literatura como sistemas de liberação sustentada e controlada. O sistema de liberação sustentada promove a liberação do fármaco por um período de menos de 24 horas, enquanto que o sistema de liberação controlada o faz por um período maior que 24 horas (Langer & Peppas, 1981; Langer, 1990).

Goodson *et al.*, em 1979, foram os primeiros a avaliar a efetividade da tetraciclina em dispositivo de liberação local e controlada. Estes autores utilizaram fibras ocas não reabsorvíveis e preenchidas com tetraciclina, aplicadas subgingivalmente, e verificaram efeitos sobre a microbiota subgingival e nos sinais clínicos da doença com uma dose 1/1000 da dose sistêmica usual. Em estudo posterior (Goodson *et al.*, 1985), com o aperfeiçoamento do dispositivo utilizado (fibras de acetato de vinil-etileno contendo 25% de tetraciclina), os autores observaram uma concentração de 643  $\mu\text{m/ml}$  por um período de 10 dias e uma maior redução na contagem de espiroquetas e bastonetes do que no grupo controle (raspagem e alisamento radicular). Estudos multi-cêntricos vieram então confirmar a efetividade deste sistema de liberação controlada através de redução nos níveis de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e ganhos em inserção clínica superiores aos obtidos no grupo de raspagem e alisamento radicular (Goodson *et al.*, 1991, Newman *et al.*, 1994).

Goodson *et al.* (1985) então definiram as características que um sistema de liberação local deve possuir para ser efetivo e clinicamente útil na terapia periodontal: (1) o dispositivo deve liberar a droga na base da bolsa periodontal; (2) o dispositivo deve liberar a droga em concentrações microbiologicamente efetivas; e (3) o dispositivo deve manter uma concentração efetiva da droga no interior da

bolsa periodontal por um período de tempo suficiente. Greenstein & Polson, em 1998, adicionaram ainda outras características desejáveis para estes dispositivos: facilidade de aplicação, retenção pós-aplicação e biodegradabilidade, além do custo do produto, que também deve ser considerado.

Após os estudos iniciais com tetraciclina e a verificação da efetividade do sistema de liberação lenta e controlada, outros agentes antimicrobianos foram pesquisados em diferentes sistemas de liberação lenta e local.

Em 1984, Addy & Langeroudi estudaram o metronidazol e a clorexidina em tiras de metilmetacrilato e verificaram a efetividade deste dispositivo, marcadamente com o uso do metronidazol, na redução da microbiota subgingival; Stoltze (1992) demonstrou a efetividade desta droga em gel a 25%, hoje comercialmente disponível no mercado Europeu (Elysol<sup>2</sup>). Estes autores demonstraram liberação de altas concentrações da droga em questão nas primeiras 24-36 horas. Sua efetividade clínica como monoterapia foi demonstrada por Ainamo *et al.*, em 1992. Já outros autores (Stelzel & Flores-de-Jacoby, 1997) reportaram benefícios adicionais à raspagem e alisamento radicular quando do uso adjunto deste gel.

Outro agente antimicrobiano de ação local largamente estudado é a clorexidina. Sob forma de liberação controlada, através de um chip (Periochip<sup>3</sup>), tem demonstrado alguns resultados benéficos como terapia adjunta à raspagem e alisamento radicular (Jeffcoat *et al.*, 1998).

A minociclina também tem sido estudada como agente antimicrobiano local e tem apresentado resultados satisfatórios em dispositivo de liberação sustentada, sob forma de gel (Dentomycine<sup>4</sup>), e mais recentemente controlada, através de microesferas (Arestin<sup>5</sup>). Os primeiros estudos com a minociclina foram desenvolvidos no Japão, ao final da década de 80 e demonstraram que a aplicação da pomada de minociclina proporcionava diminuição no número de

---

<sup>2</sup> Elysol<sup>TM</sup>, Dumex, Copenhagen, Denmark

<sup>3</sup> Periochip<sup>TM</sup>, Peno Products Ltd., Jerusalem, Israel

<sup>4</sup> Dentomycine<sup>TM</sup>, Lederle, UK.

<sup>5</sup> Arestin<sup>TM</sup>, Orapharma, Inc., PA, USA

bactérias e mudanças favoráveis na composição bacteriana subgengival, associadas a melhores condições clínicas (Isoshima *et al.*, 1987). No entanto, o que se seguiu foram resultados controversos na literatura com o uso dessa droga. Trabalhos como o de Jones *et al.* (1994) demonstram superioridade do tratamento adjunto com minociclina somente no primeiro mês pós-operatório. Já em outros estudos (Graça *et al.*, 1997; van Steenberghe *et al.*, 1999), verifica-se um benefício adicional da terapia adjunta de minociclina, seja esta sob a forma de gel, pomada ou microesferas. As esferas de minociclina, medicamento recentemente aprovado pela FDA (Food and Drug Administration), e hoje comercialmente disponível nos Estados Unidos e Canadá, é o agente antibiótico mais recentemente estudado no tratamento adjunto a RAR. As microesferas, compostas de polímero bioabsorvível e bioadesivo, contém 1mg de minociclina, e uma vez no interior da bolsa periodontal, são hidrolisadas pelo fluido crevicular, liberando o antibiótico em concentrações efetivas contra patógenos periodontais por um período de até 14 dias. Williams *et al.* (2001) analisaram a efetividade deste dispositivo associado a RAR no tratamento de 748 pacientes com periodontite crônica e verificaram melhores reduções de profundidade de sondagem e ganho em nível de inserção clínica quando comparado aos tratamentos de RAR ou RAR associado a placebo. Oringer *et al.*, em 2002, observaram que o tratamento adjunto com essa droga proporcionou maior diminuição em níveis de IL-1 no fluido crevicular a curto prazo, quando comparado ao tratamento convencional. Já no tratamento de manutenção, Meinberg *et al.* (2002) também verificaram benefícios adicionais no uso das microesferas tanto em parâmetros clínicos convencionais quanto na porcentagem de pacientes apresentando perda óssea no período de 1 ano (12,5% para minociclina versus 16,7% para RAR). Outros autores verificaram maior redução de bastonetes móveis em 4 e 6 semanas após aplicação de minociclina local quando comparado ao tratamento de RAR (Yeom *et al.*, 1997). Portanto, o sistema de liberação controlada de antimicrobianos no interior da bolsa periodontal parece trazer benefícios adicionais no tratamento não cirúrgico da doença periodontal.



## 2.5 Doxiciclina

A doxiciclina é um antibiótico derivado da tetraciclina, e como esta, apresenta algumas vantagens em relação a outros antibióticos.

As tetraciclinas possuem ação efetiva contra patógenos anaeróbios associados à doença periodontal (Listgarten *et al.*, 1978); apresentam substantividade às superfícies de dentina e cimento (Baker *et al.*, 1983; MORRISON *et al.*, 1992), sendo liberadas, após sua absorção, em concentrações bacteriostáticas (Baker *et al.*, 1983; Christersson *et al.*, 1993); dificultam a aderência da película adquirida e a conseqüente formação do biofilme subgengival (Bjorvatan *et al.*, 1985); e removem a smear layer, causando desmineralização da superfície radicular (Morrison *et al.*, 1992). Recentemente, Golub *et al.* (1994) demonstraram que a doxiciclina, aplicada via sistêmica e em baixas concentrações, possui propriedades não-antibacterianas, porém têm a capacidade de inibir metaloproteinases em tecido gengival humano inflamado. Em estudo clínico, quando associada ao tratamento mecânico convencional, demonstrou efetividade na redução dos parâmetros clínicos avaliados e na inibição da atividade colagenolítica (Crout *et al.*, 1996).

### 2.5.1 Gel de Doxiciclina – aplicação local

O hclato de doxiciclina tem sido recentemente utilizado no tratamento da doença periodontal, como terapia local, e tem apresentado resultados satisfatórios (Garrett *et al.*, 1999, 2000, Wennstrom *et al.*, 2001). Este medicamento foi aprovado pela FDA em 1998 e se encontra comercialmente disponível nos Estados Unidos (Atridox<sup>6</sup>).

A aplicação local da doxiciclina é feita através de um dispositivo de liberação controlada, composto por duas seringas: uma delas, contendo o hclato de doxiciclina a 8,5% e a outra, veículo, contendo 37% de poli-DL-lactídeo,

dissolvido em 63% de NMP (N-metil-2-pirrolidona)<sup>5</sup>. As duas seringas são acopladas e seus conteúdos misturados, de forma a obter-se um gel homogêneo, de coloração amarelada. O gel, em contato com o fluido crevicular, se solidifica e é reabsorvido, liberando o medicamento no sítio de ação, por um período de 7 a 10 dias (Polson *et al.*, 1997).

### **2.5.2 Concentrações da Doxíciclina**

Para que a droga local exerça sua ação, é necessária uma concentração inibitória mínima para que atinja os patógenos periodontais, e que esta se mantenha por um período adequado no sítio de ação. Patógenos periodontais apresentam susceptibilidade a concentrações de 0,1 a 2.0 µg/ml de doxíciclina (Slots & Rams, 1990). Stoller *et al.*, em 1998, estudaram as concentrações encontradas no fluido crevicular, após aplicação local de doxíciclina a 8,5%. Os autores encontraram uma concentração de 1493µg/ml (700 vezes maior que a concentração inibitória mínima) no fluido crevicular em 2 horas. Esta concentração permanecia alta (acima de 1000µg/ml) após 18 horas, e caía para 309µg/ml ao sétimo dia, sendo esta última concentração ainda 150 vezes maior que a concentração inibitória mínima. A concentração mais alta deste medicamento encontrada na saliva foi de 8,78µg/ml em 2 horas e caiu para menos de 2µg/ml ao final do dia. As concentrações séricas não excederam 0,1µg/ml. Além disso, Ciancio *et al.*, em 1992, detectaram concentrações de tetraciclina de 1 a 20µm no interior da parede mole de papila excisionada após 8 dias da aplicação local de fibras.

### **2.5.3 Aspectos microbiológicos**

É bem conhecido hoje o papel das bactérias subgingivais na doença periodontal. Especula-se mais de 500 espécies bacterianas associadas ao

---

<sup>6</sup> Atridox™, Collagenex, Ft Collings, CO

ambiente subgengival (Moore *et al.*, 1982). Essas bactérias se organizam em uma matriz de glicocalix, que consiste em uma bio-comunidade organizada e complexa chamada biofilme (Socransky & Haffajee, 2002). Nessa comunidade estruturada, existe o transporte e a troca de nutrientes e o crescimento e desenvolvimento gradual de espécies bacterianas. Para a utilização de agentes antimicrobianos no ambiente subgengival, é necessário saber algumas propriedades do biofilme bacteriano. Como uma comunidade, o biofilme confere proteção e resistência de algumas espécies bacterianas contra agentes antimicrobianos. Sabe-se que a resistência de bactérias organizadas dentro de um biofilme é maior do a resistência de bactérias planctônicas. A concentração de tetraciclina, por exemplo, precisa ser 256 vezes maior para atingir algumas espécies bacterianas presentes em um biofilme (Walker *et al.*, em 2002). Assim, a remoção ou desorganização desse complexo altamente organizado deve ser realizada previamente tanto a utilização de substâncias antimicrobianas ou antibióticas, no intuito de viabilizar maior efetividade destas drogas subgengivalmente.

Sabe-se que a liberação local e controlada de agentes antimicrobianos proporciona supressão significativa de patógenos periodontais, sem contudo eliminá-los completamente. Goodson *et al.*, 1985, em um estudo com liberação local e controlada de tetraciclina, demonstraram que 85% dos sítios tratados apresentavam contagem de menos de 10.000 espiroquetas, o que é considerado similar a zero. Estes resultados se mantiveram por nove meses.

Apesar de 12% da microbiota normal apresentar resistência às tetraciclinas (Lacroix & Walker, 1995), essa resistência parece ser menor contra seus derivados, doxiciclina e minociclina, devido a sua propriedade mais lipofílica. Foi comprovado que a terapia local com doxiciclina reduz significativamente os níveis de bactérias subgengivais anaeróbias e proporciona aumentos transitórios na proporção de microorganismos resistentes, porém não em número total de microorganismos (Walker *et al.*, 2000, Larsen *et al.*, 1991).

Salvi *et al.* (2002) avaliaram o efeito de diferentes drogas locais (doxiciclina, metronidazole e clorexidina) no tratamento de bolsas residuais pós- tratamento

convencional e não encontraram diferenças na redução da microbiota subgengival em 4 e 18 semanas após o uso da doxicilina apesar dos benefícios encontrados nos parâmetros clínicos. Um estudo recentemente publicado por Jorgensen *et al.* (2004) avaliou a microbiota subgengival após 2 e 4 semanas do tratamento com uso adjunto de doxiciclina local e também não encontrou diferenças quanto à contagem de periodontopatógenos quando comparado ao tratamento de raspagem e alisamento radicular. Entretanto, Machion *et al.* (2004, *in press*) encontraram maiores reduções nas proporções de sítios apresentando *T.forsythensis* e *P.gingivalis* nos sítios de pacientes fumantes tratados com este medicamento quando comparados aos sítios tratados convencionalmente aos três meses pós-terapia.

## **2.6 Estudos clínicos**

Estudos recentes têm indicado a utilização local do gel de doxiciclina como forma isolada de tratamento, sem estar associado ao procedimento de raspagem e alisamento radicular, apresentando resultados efetivos no combate à doença periodontal.

O primeiro estudo que demonstrou a efetividade e biocompatibilidade do dispositivo de liberação local de doxiciclina foi o estudo em animais de Polson *et al.*, em 1996. Estes autores avaliaram o efeito do gel contendo hclato de doxiciclina a 8,5%, como terapia isolada, em periodontite experimental em cães. Foram encontradas reduções médias de 2.5mm para profundidade de sondagem e 2mm em ganho de inserção clínica ao final de 4 meses de avaliação. Este estudo foi o precursor para os estudos clínicos conseguintes.

Polson *et al.*, em 1997, realizaram assim, o primeiro estudo clínico em humanos com este sistema de liberação local. Neste estudo, os autores verificaram maior efetividade do gel de doxicilina quando comparado à sanguinarina 5% ou veículo controle (50% DL-lactídeo e 50% NMP), aplicados

isoladamente, quanto à profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. Este estudo demonstrou a efetividade clínica na aplicação deste gel, o que trouxe o interesse sobre sua utilização.

Comparando esta mesma terapia local com a raspagem e alisamento radicular, Garrett *et al.*, em 1999, em estudo multi-cêntrico, verificaram que o gel de doxiciclina, aplicado isoladamente, apresentou resultados similares à terapia mecânica convencional e superiores ao veículo controle e higiene oral, quanto aos ganhos em profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. Estes resultados seguiram um acompanhamento de nove meses e a aplicação do gel, bem como a instrumentação periodontal, foram feitas inicialmente e após 4 meses. Os pacientes tratados neste estudo não receberam terapia mecânica inicial.

Já em estudo subsequente destes mesmos autores (Garrett *et al.*, 2000) verificou-se a ação do gel de doxiciclina em pacientes sob terapia de manutenção, portadores da doença periodontal refratária. O mesmo protocolo do estudo de 1999 foi utilizado. Os resultados demonstraram que a terapia isolada com o gel de doxiciclina foi novamente similar à terapia mecânica convencional e estes resultados se mantiveram por 9 meses.

O efeito de antimicrobianos locais no tratamento periodontal de pacientes fumantes tem sido pouco estudado, embora vários estudos tenham reportado respostas desfavoráveis destes pacientes frente ao tratamento periodontal não-cirúrgico (Ah *et al.*, 1994; Kaldahl *et al.*, 1996).

Kinane & Radvar (1997) avaliaram o efeito do fumo no tratamento da doença periodontal utilizando raspagem e alisamento radicular associada ou não a três antimicrobianos locais (fibras de tetraciclina, gel de minociclina e gel de metronidazol). Foi constatado neste estudo que, independente do tratamento proposto, os pacientes fumantes apresentaram piores resultados. Uma comparação detalhada dos tratamentos propostos entre estes grupos foi feita previamente por Radvar *et al.* (1996), os quais encontraram melhores resultados com o tratamento local e adjunto com fibras de tetraciclina.

Palmer *et al.*, em 1999, também avaliaram o efeito de metronidazol sistêmico e local como adjuntos ao tratamento periodontal de pacientes fumantes e não-fumantes em comparação com o tratamento mecânico convencional e não encontraram diferenças entre os tratamentos em ambos os grupos, apenas diferenças entre os grupos de fumantes e não-fumantes em alguns parâmetros.

Ryder *et al.*, em 1999 dividiram os pacientes de um estudo prévio (Garrett *et al.*, 1999) em três grupos: pacientes fumantes, ex-fumantes e não-fumantes. Os resultados demonstraram que, dos pacientes que receberam tratamento mecânico convencional, os não-fumantes apresentaram os melhores resultados quanto ao ganho de inserção clínica e diminuição da profundidade de sondagem. Porém, dos pacientes que receberam aplicação local de doxiciclina, não houve diferença entre os três grupos. Pode-se concluir, através deste estudo, que os pacientes fumantes responderam de maneira similar a pacientes não-fumantes sob tratamento local com doxiciclina.

Wennstrom *et al.* (2001), em outro estudo multi-cêntrico, avaliaram a ação desta terapia local associada à raspagem e alisamento radicular ou associada ao debridamento mecânico por meio de ultra-som. Estes autores encontraram reduções nos parâmetros clínicos significativamente maiores para o grupo debridamento+doxiciclina aos 3 meses. Porém, aos 6 meses, foi encontrada somente maior redução em sangramento à sondagem para este mesmo grupo. Os autores concluíram que a forma simplificada de tratamento mecânico (debridamento com ultra-som) associada à terapia local com doxiciclina pode ser considerada uma abordagem terapêutica mais prática, já que o tempo clínico para a conclusão da mesma é menor.

Recentemente, Tomasi *et al.* (2004) demonstraram que o uso da doxiciclina local associado ao tratamento mecânico convencional promove efeito positivo na resposta de pacientes fumantes, mascarando o efeito deletério do fumo na resposta periodontal. Além disso, Machion *et al.* (2004) também demonstraram efetividade deste tratamento em pacientes fumantes, apresentando maiores reduções em profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, quando

comparado a raspagem e alisamento radicular, principalmente com a aplicação da droga em sítios inicialmente profundos.

A literatura vem recentemente indicando que o método de liberação local de antibióticos parece ser efetivo no combate à doença periodontal, uma vez que proporciona concentrações efetivas da droga no sítio de ação por maior período de tempo; é efetivo quanto à supressão de microorganismos subgengivais; e promove ganhos nos níveis de inserção e redução da profundidade de sondagem em estudos clínicos. Entretanto, ainda não está claro na literatura o papel desses agentes na terapia periodontal e a efetividade a longo prazo desses agentes, sobretudo em pacientes que não respondem de maneira favorável à terapia convencional inicial e de manutenção.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade a longo prazo do uso local do gel de doxiciclina, associado à raspagem e alisamento radicular, no tratamento periodontal de pacientes fumantes.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar, clínica e microbiologicamente, a efetividade da associação da raspagem e alisamento radicular ao gel contendo hclato de doxiciclina (ATRIDOX<sup>®</sup>) em comparação à raspagem isoladamente, no tratamento periodontal de pacientes fumantes.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Seleção da Amostra**

Dentre os pacientes que procuraram tratamento nas clínicas de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, foram selecionados inicialmente 59 pacientes, utilizando-se dos seguintes critérios de inclusão:

- Pacientes portadores de periodontite crônica verificada pela presença de bolsas periodontais verdadeiras e perda óssea detectada por exame radiográfico;
- Presença mínima de 4 de bolsas periodontais com profundidade de sondagem igual ou maior que 5mm e perda de inserção mínima de 4mm, com sangramento à sondagem, situadas em dentes anteriores superiores ou inferiores;
- Ausência de alteração periapical ou pulpar, detectada através de exame radiográfico e teste de vitalidade;
- Ausência de alterações sistêmicas que pudessem influenciar a resposta ao tratamento periodontal;
- Não usuários de medicamentos que possam influenciar a resposta ao tratamento periodontal; não usuários de antibióticos nos últimos 6 meses.
- Ausência de tratamento periodontal incluindo instrumentação subgingival nos 6 meses anteriores ao estudo;
- Pacientes fumantes, definidos pelo fumo de 10 ou mais cigarros por dia por um período mínimo de 5 anos;
- Consentimento formal para a participação na pesquisa, após a explicação dos riscos e benefícios por indivíduo não envolvido na mesma. (Resolução nº 196 de outubro de 1996 e o Código de Ética Profissional Odontológico (C.F.O.) 179/93).

Este trabalho foi previamente aprovado pelo comitê Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, sob protocolo de número 028/2001.

## **4.2 Preparo Inicial**

Todos os pacientes foram instruídos sobre as causas e conseqüências da doença periodontal bem como sobre técnicas de prevenção, incluindo técnica de escovação sulcular e uso de fio dental. Os fatores de retenção de placa supragengivais foram removidos nas visitas iniciais. Para tanto, instrumento ultrassônico foi utilizado para remoção de cálculo supragengival e o fechamento de cavidades foi feito através de material restaurador provisório.

Após preparo inicial, os pacientes foram submetidos às avaliações clínicas e subseqüente tratamento.

## **4.3 Parâmetros Clínicos e Períodos de Observação**

Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados por dois examinadores, previamente calibrados:

- Índice de Placa (IP) (Ainamo & Bay, 1975): avaliação da presença ou ausência de placa visível, em seis sítios por dente em boca toda;
- Sangramento à sondagem (SS) (Mühlemann & Son, 1971): avaliação da presença ou ausência de sangramento até 15 segundos após a sondagem, em seis sítios por dente, nos sítios selecionados para a pesquisa;
- Profundidade de Sondagem (PS): realizada com sondagem eletrônica computadorizada - ver tópico 4.4;
- Recessão Gengival (RG): realizada com sondagem eletrônica computadorizada - ver tópico 4.4;
- Nível de Inserção Clínica relativa (NICr): relativo a um guia de sondagem (ver tópico 4.4).

Os parâmetros foram analisados nos períodos inicial (1 semana após preparo inicial), 45 dias, 3, 6 e 12 meses após o tratamento. Aos 12 meses foi feito

o retratamento dos sítios (ver tópico 4.5), 45 dias após retratamento (45 dias-2), 15, 18 e 24 meses.

Todos os pacientes foram acompanhados mensalmente para controle de placa nos primeiros 6 meses e após este período, nos períodos de avaliações.

#### **4.4 Sondagem Eletrônica Computadorizada (PS, RG e NICr)**

Todos os parâmetros clínicos foram armazenados em programa computadorizado (Florida Probe<sup>7</sup>). Os parâmetros PS, RG e NICr foram obtidos com o uso de sondas eletrônicas, conectadas a um microcomputador. Os parâmetros PS e RG foram obtidos através da sonda “*pocket*” (Florida pocket probe<sup>®</sup>) (figura 1a e 1b). Dados de sangramento à sondagem e placa, quando detectados visualmente, eram armazenados na ficha periodontal do programa Florida Probe, em computador.

A mensuração do parâmetro NICr foi feita com o auxílio de um guia de sondagem e com a sonda “*stent*” (Florida stent probe<sup>®</sup>). Para a confecção deste guia, todos os pacientes foram submetidos à moldagem do sextante selecionado para a pesquisa, através de moldeiras parciais e alginato. Assim, o moldelo em gesso pedra da região anterior foi obtido e sobre este foi pressionada uma placa circunferencial de poliéster tereftalato (PET-G)<sup>8</sup>, de 1.5mm de espessura, sob aquecimento, através de um plastificador à vácuo. Após o resfriamento da placa sobre o modelo, esta foi cortada e desgastada a fim de se obter uma cobertura de 2/3 da coroa dentária por vestibular e palatina, de canino a canino. Sobre o guia, foram confeccionados nichos para o posicionamento da sonda “*stent*”, através de desgaste com a broca diamantada 1035 (KG Sorensen), como mostram as figuras 2a e 2b.

---

<sup>7</sup> Florida Probe<sup>®</sup>, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL

<sup>8</sup> Placas Cristal<sup>®</sup>, Bioart, São Carlos, SP

A avaliação dos parâmetros clínicos foi realizada por dois examinadores, os quais foram previamente calibrados para o uso das sondas (*pocket e stent*) através de medições repetidas de PS, RG e NICr e obtenção de valores de correlação de Pearson e teste *t* de Student entre estas (calibração intra e interexaminadores).

#### 4.5 Tratamentos

Os pacientes foram aleatoriamente sorteados para compor um dos dois grupos de tratamento:

- **Grupo Teste (RAR-D):** Instrumentação periodontal não cirúrgica seguida de aplicação do sistema de liberação local de doxiciclina (Atridox<sup>9</sup>).
- **Grupo Controle (RAR):** Instrumentação periodontal não cirúrgica seguida de irrigação com soro fisiológico.

Os tratamentos teste e controle foram sempre realizados pelo mesmo operador, diferente do avaliador de parâmetros clínicos. Os grupos foram sorteados aleatoriamente após a realização da instrumentação periodontal. Os tratamentos dos sítios selecionados foram:

- **Instrumentação Periodontal** (grupo RAR-D e RAR): A instrumentação foi realizada através de curetas de Gracey (5-6) (figura 4a) até a obtenção de uma superfície lisa ao explorador, de acordo com o critério do operador.
- **Aplicação do gel** (grupo RAR-D): Fez-se de acordo com o preconizado pelo fabricante: acoplamento das duas seringas, uma contendo 50mg de hiclato de doxiciclina e a outra contendo 450 mg do gel de liberação (37% de poli-DL-lactídeo dissolvido em 63% de N-metil-2-pirrolidona); os conteúdos são misturados até a obtenção de uma mistura homogênea (figura 3); inserção da agulha até o fundo da bolsa; aplicação do gel até extravasamento do mesmo (figura 4b); inserção do material excedente através de espátula (figura 4c). Os

pacientes pertencentes a ambos os grupos foram instruídos a não realizar higiene interdental nos sítios tratados com o gel por um período de 7 dias para evitar sua remoção (Polson *et al.*, 1997; Garrett *et al.*, 1999,2000).

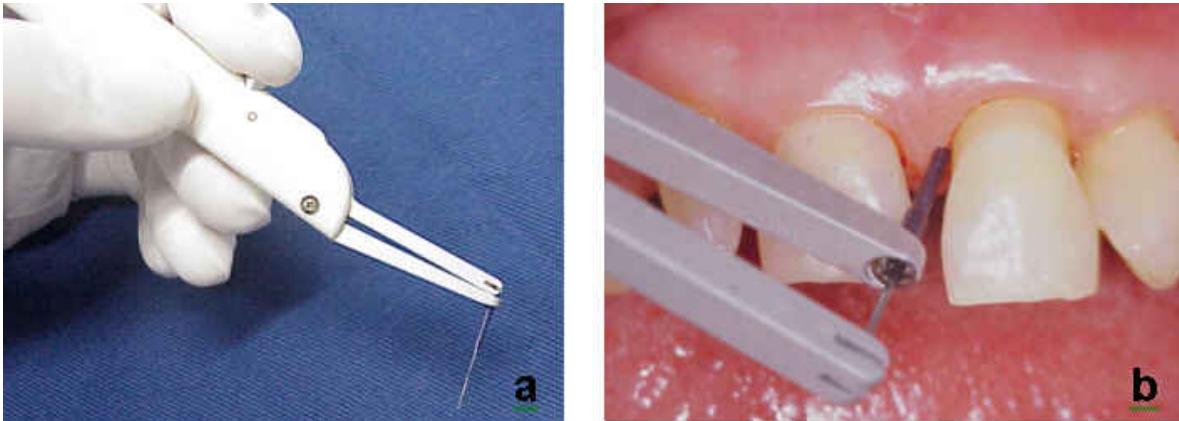


Figura 1: Sonda Pocket (Florida pocket probe<sup>®</sup>) (fig a); mensuração de PS (fig b).

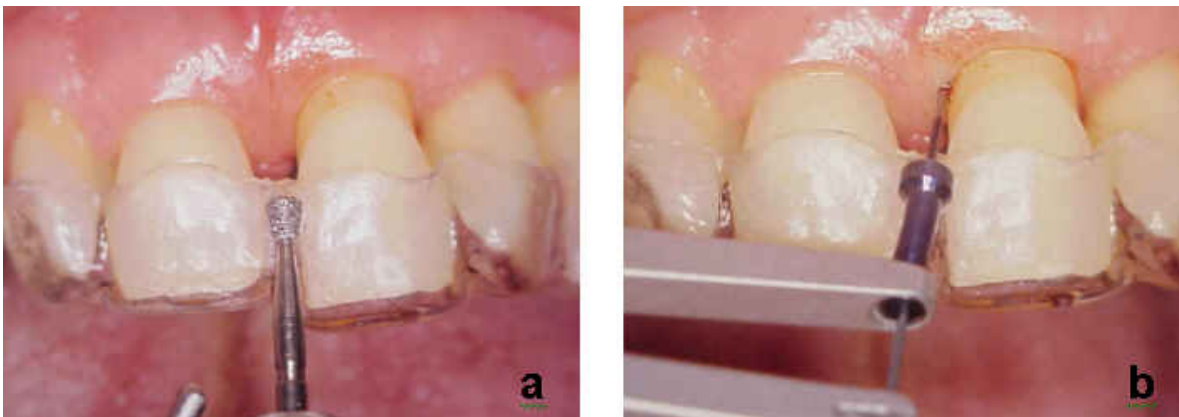


Figura 2 - Confeção do nicho no guia de sondagem (fig a) e mensurações de NICr com a sonda Stent (Florida stent probe<sup>®</sup>) em posição (fig b).

---

<sup>9 9</sup> Atridox<sup>™</sup>, Collagenex, Ft Collins, CO



Figura 3 - Mistura dos conteúdos das duas seringas, uma contendo o sistema de liberação (esquerda) e a outra contendo hclato de doxiciclina (direita).



Figura 4 - Grupo RAR-D: raspagem e alisamento radicular (fig a); aplicação do gel de doxiciclina até seu extravasamento (fig b); colocação do gel excedente com espátula 1 (fig c)

Após os tratamentos, todos os pacientes foram instruídos a não realizar higiene interdental na região instrumentada por uma semana e utilizar digluconato de clorexidina 0,12%, 2 vezes ao dia, por duas semanas.

Os tratamentos foram realizados no período inicial e aos 12 meses, em sítios apresentando bolsas remanescentes de 5mm ou mais de profundidade e sangramento à sondagem. Os sítios que apresentaram progressão na perda de inserção superior a 2mm, em quaisquer dos períodos avaliados, foram excluídos do experimento e receberam novo procedimento de raspagem e alisamento radicular. Em todos os períodos, após a avaliação dos parâmetros clínicos, os pacientes receberam debridamento radicular através do uso de instrumento ultrasônico em toda boca.

O delineamento do estudo foi paralelo, ao acaso, cego, permitindo a obtenção de dois grupos, 22 pacientes no grupo RAR-D e 21 no grupo RAR.

## **4.6 Análise Microbiológica**

### **4.6.1 Coleta de Placa**

A coleta de placa foi realizada num total de 16 pacientes (9 do grupo RAR-D e 7 do grupo RAR) de forma aleatória. A coleta foi feita em cada paciente em 1 ou dois sítios selecionados para a pesquisa ( $PS \geq 5\text{mm}$  com sangramento à sondagem), de forma aleatória, nos períodos inicial, 3, 6, 12 meses, 45 dias-2 e 15 meses. Previamente à coleta, o local foi isolado com rolo de algodão, a área seca e a placa supragengival do sítio a ser coletado foi removida. Um cone de papel de número 45<sup>10</sup> foi inserido no interior da bolsa periodontal, ai permanecendo por 30 segundos. O cone foi então inserido em um tubo de eppendorf de 1,5ml contendo 300µl solução TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8). Os eppendorfs foram congelados a -20°C até a realização da análise microbiológica.

#### **4.6.2 Análise de PCR (Polimerase Chain Reaction)**

As análises microbiológicas foram realizadas no centro de pesquisas de doença periodontal, no departamento de Biologia Oral da faculdade de Odontologia, Universidade da Flórida (Gainesville, Fl, USA) no período de janeiro a Outubro de 2004.

##### **- Extração de DNA**

Previamente à realização de extração de DNA, o protocolo utilizado foi testado, extraíndo-se DNA de amostras de sítios-teste e realizando reação de PCR para que a presença de DNA bacteriano fosse detectada (ver subtópico reação de PCR).

O método de extração de DNA seguiu o protocolo fornecido pelo Kit de extração utilizado<sup>11</sup>. Os eppendorfs foram colocados em banho maria à 37°C por 10 minutos e colocados em sonificador por 10 segundos para que as bactérias presas ao cone fossem dispersas. A seguir, as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi removido e 480µl de EDTA 50 mM foi adicionado. Adicionou-se então 60µl de solução contendo 10mg/ml de lisozima para facilitar a lise das células. As amostras foram então colocadas em banho maria à 37°C por 45 minutos. Após o banho, as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 3 minutos. Discartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600µl de solução de lise celular. As amostras foram novamente para o banho de 80°C por 5 minutos e esfriadas à temperatura ambiente (cerca de 10 minutos) Adicionou-se assim 3µl de solução de RNAase à amostra de células lisadas e estas foram colocadas em banho maria à 37°C por 45 minutos novamente e esfriadas à temperatura ambiente após o mesmo. Após a adição de 200µl solução de precipitação de proteína, as amostras foram vortexadas vigorosamente por 20 segundos e colocadas em gelo por 5 minutos. Seguiu-se a centrifugação das

---

<sup>10</sup> Tanari, Tanarian Industrial Ltda, Macapuru - Amazonas

<sup>11</sup> Promega, Madison, WI, USA



mesmas à 14000 rpm por 3 minutos, transferiu-se o sobrenadante contendo DNA para outro tubo de eppendorf, contendo 600µl de isopropanol em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas novamente à 14000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e 200µl de etanol foi adicionado e misturado por inversão do tubo para que o DNA precipitado fosse lavado. Centrifugou-se as amostras novamente à 14000 rpm por 3 minutos, descartou-se o sobrenadante e as amostras foram deixadas por sobre a bancada por 15 minutos para permitir a secagem do precipitado. Adicionou-se 40µl de solução de rehidratação do DNA e as amostras foram armazenadas à 4°C até o dia seguinte para serem utilizadas.

#### **- Reação de PCR**

O objetivo das análises de PCR foi detectar a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *T.forsythensis* e *P. Gingivalis* nas amostras de placa dos períodos inicial, 3, 6, 12 meses e 15 meses para todos os pacientes e nos períodos 12 meses, 45 dias-2 e 15 meses para os pacientes em retratamento.

As análises de PCR foram realizadas com o kit de PCR BD Biosciences<sup>12</sup>. Para cada reação, adicionou-se 3µl da solução de DNA extraído da amostra em um volume de 22µl da mistura de reação de PCR contendo 1,5µl de cada primer bacteriano, 2,5µl de tampão de reação (10X Advantage PCR buffer), 0,5µl de mistura contendo Taq polimerase (50X BD advantage 2 polumerase mix), 0,5µl de dNTP (Advantage Ultra pure dNTP mix) e água destilada q.s.p.. DNA purificado extraído de culturas puras de cada bactéria foi utilizado como controle positivo em cada reação (*B. Forsythus* - ATCC 43037, *P.gingivalis* - ATCC 33277 e *A. actinomycetemcomitans* - ATCC 29522). Água destilada foi utilizada como controle negativo em cada reação.

Uma reação inicial de PCR foi realizada para detectar a presença de eubacteria através do uso de primers universal do gene 16S (tabela 1). A seguir as reações para detecção de cada bactéria foram realizadas através da máquina

GeneAmp PCR System 2400<sup>13</sup>. As seguintes condições foram utilizadas para cada reação:

- *Universal 16S* para detecção de eubacteria (Weisburg *et al.* 1991): primeiramente um passo de desnaturação à 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos, e extensão à 72°C por 2 minutos, e um passo final de alongamento à 72°C por 10 minutos.
- *B. forsythus* (Slots *et al.*, 1995): primeiramente um passo de desnaturação à 95°C por 2 minutos, seguido de 36 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, anelamento à 59°C por 1 minuto, e extensão à 72°C por 1 minuto, e um passo final de alongamento à 72°C por 2 minutos.
- *P. gingivalis* (Benkirane *et al.*, 1995): primeiramente um passo de desnaturação à 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento à 55°C por 1 minuto, e extensão à 72°C por 1 minuto, e um passo final de alongamento à 72°C por 2 minutos.
- *A. actinomycetemcomitans* (Ashimoto *et al.*, 1996): primeiramente um passo de desnaturação à 95°C por 2 minutos, seguido de 36 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 49°C por 1 minuto, e extensão à 72°C por 2 minutos, e um passo final de alongamento à 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em um gel de agarose à 1%<sup>14</sup> usando tampão de Tris-borato-EDTA. Uma escala de peso molecular de 1 Kb foi incluída em cada gel. O DNA foi então corado com solução de brometo de etídio e visualizado em uma câmara de fluorescência acoplada a um software de imagens<sup>15</sup>.

---

<sup>12</sup> BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA.

<sup>13</sup> Perkin Elmer, Applied Biosystems, Syngapore

<sup>14</sup> Fisher Laboratories, Fair Lawn, NJ, USA

<sup>15</sup> Quantity one, 4.4.1, Bio-Rad Laboratories, Inc. - Life Science Group - Hercules, CA

Tabela 1  
 Primeros de PCR usados para cada uma das espécies analisadas

Espécies	Sequência	Posição de bases Comprimento (pb)
<i>Eubacteria</i> (16S) (Weisburg <i>et al.</i> , 1991)	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	~1500
	5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'	
<i>B. forsythus</i> (Slots <i>et al.</i> , 1995)	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3'	641
	5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	
<i>P. gingivalis</i> (Benkerine <i>et al.</i> , 1995)	5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3'	593
	5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'	
<i>A.actinomycetemcomitans</i> (Ashimoto <i>et al.</i> , 1996)	5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3'	557
	5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3'	

#### 4.6.3 Análise de “Checkerboard DNA-DNA Hybridization”

O objetivo das análises através da técnica de checkerboard foi detectar a presença de diversas espécies bacterianas dos sítios que necessitaram de retratamento aos 12 meses: no período prévio ao retratamento (12 meses), 45 dias (45 dias-2) e 3 meses (15 meses) pós retratamento. Foram analisadas as seguintes espécies bacterianas: *A. actinomycetemcomitans*, *T.forsythensis*, *P. Gingivalis*, *P.intermedia*, *C.rectus*, *F.nucleatum*, *A.naeslundii*, *S.intermedia* e *S.sanguis*.

O seguinte protocolo foi utilizado:

1. **Preparação das amostras:** adicionou-se 100µl de NaOH 0,5M às amostras, que foram então vortexadas vigorosamente por 20 segundos, fervidas por 5 minutos e

colocadas em gelo brevemente. Adicionou-se então 800µl de Acetato de Amonio a 5M<sup>16</sup> para neutralizar as amostras.

**2. Preparação da membrana e carregamento das amostras:** Um filtro de papel de 15x14cm<sup>17</sup> umidecido com água destilada foi posicionado por sobre o mini-slot<sup>18</sup>. Uma membrana de nylon the 15x14cm<sup>17</sup> foi utilizada e posicionada por sobre o filtro de papel. O mini-slot foi fechado e o total conteúdo das amostras (1ml) foi disperso em cada uma das canaletas do mini-slot (horizontalmente), como mostra a figura 5a. Controles positivos para cada espécie bacteriana foi também utilizado (solução de DNA de cada espécie bacteriana com contagem padronizada de 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> células de cada espécie). Foi acoplado ao mini-slot uma camera de vácuo para que a solução das amostras fosse absorvida pela membrana (figura 5b). O mini-slot foi então aberto e a membrana retirada e colocada em um dipositivo de luz ultravioleta<sup>19</sup> de 120000µJ em luz de 254nm por 10 segundos para que o DNA fosse aderido à membrana. Após esse procedimento a membrana foi colocada em uma embalagem de plástico<sup>20</sup> contendo 10ml de tampão de hibridização e então colocada em forno à 42°C por 2h30min. Retirou-se a membrana do forno, o tampão de hibridização foi removido e a membrana colocada no mini-blotter<sup>18</sup> para receber as sondas de DNA.

**3. Preparação das sondas de DNA:** primeiramente extrai-se DNA (ver tópico 4.6.2 – extração de DNA) de cultura pura de cada espécie bacteriana a ser analisada. Após extração, dilui-se uma quantidade padronizada de DNA de 100ng/µl com solução TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8). A quantificação de DNA foi realizada através de espectofotômetro<sup>21</sup>. Dessa solução, utilizou-se 5µl de cada espécie para ser marcado com Psoralen-biotin<sup>22</sup> em tubos de PCR. Adicionou-se então 5µl de TE e a mistura foi aquecida em máquina de

---

<sup>16</sup> Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA

<sup>17</sup> Bright-Star, Ambion Inc., Austin, TX, USA

<sup>18</sup> Immunetics Inc, Boston, MA, USA

<sup>19</sup> UV stratalinker 1800, Stratagene, La Golla, CA

<sup>20</sup> Kapak Bag 502 Heavy Duty, Kapak Corporation, Minneapolis, MN, USA

<sup>21</sup> SmartSpec Plus – BioRad laboratories, Hercules, CA, USA

<sup>22</sup> Bright-Star, Ambion Inc, Austin, TX, USA

PCR a 99°C por 10 minutos. Os tubos foram então colocados em gelo brevemente. O conteúdo dos tubos foi transferido para uma placa de 96 poços e, em ambiente escuro, adicionou-se 1,5µl de psoralen-biotin em cada amostra (figura 6). A placa foi então diretamente irradiada com luz ultra-violeta (UV) por 45 minutos. Adicionou-se 88,5µl de TE em cada poço e transferiu-se o conteúdo total de 100µl para um novo tubo de eppendorf. Adicionou-se então 200µl de n-Butanol. Os tubos foram vortexados e centrifugados por 1 min a 7000 rpm. A camada superior do butanol foi removida e o procedimento de centrifugação repetido. As sondas marcadas foram armazenadas em freezer a -20°C.

**4. Carregamento da membrana com as sondas:** Após a preparação e marcação das sondas, estas são fervidas por 5 minutos, colocadas em gelo brevemente. Assim, 5µl das sondas são adicionados à solução de tampão de hibridização q.s.p.150ul e distribuídas nas canaletas do mini-blotter (verticalmente, perpendicularmente à direção das amostras de placa, figura 7). O miniblotter é então vedado com fita isolante e colocado dentro de uma embalagem plástica para o não-resssecamento da membrana. O conjunto é então levado ao forno a 37°C durante a noite.

**5. Lavagem da membrana:** Retira-se o conjunto do forno, retira-se a membrana coloca-se em uma travessa contendo 100ml de tampão de lavagem<sup>23</sup>. Faz-se a lavagem em constante agitação (agitador), permitindo o fluxo da solução sempre em contato com a membrana (figura 8). Essa lavagem é feita 2x por 5 minutos, trocando-se a solução entre estas. Após esses procedimentos, a membrana é embebida em 100ml de tampão bloqueador e lavada 2x por 5 minutos. Após as lavagens, a membrana é incubada em nova solução de tampão bloqueador por 30 minutos. Prepara-se então uma solução de fosfatase alcalina (10ml de tampão bloqueador e 1µl de fosfatase alcalina<sup>23</sup>) e lava-se a membrana com esta por 30 minutos. A membrana é incubada em 50ml de tampão bloqueador por 15min e então lavada 3x de 5 minutos em 100ml de solução tampão de lavagem. Faz-se então duas incubações da membrana de 2 minutos cada com 50ml de tampão de

ensaio e uma por 5 minutos em 8ml de CDP-Star<sup>23</sup>. O excesso desta solução é então removido, sem deixar que a membrana perca sua umidade, e a membrana é colocada em embalagem plástica selada.

6. **Análise dos resultados:** A membrana embalada é exposta a filme radiográfico<sup>24</sup> por 3 a 4 horas, ou mesmo deixando-se exposta durante a noite. Revela-se o filme radiográfico e conta-se os pontos positivos de acordo com os padrões utilizados ( $10 \times 10^5$ ,  $10 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^7$  células de amostras de cultura pura).

Todas as sondas de DNA utilizadas no experimento foram testadas previamente com amostras de DNA de culturas bacterianas puras para cada espécie.

---

<sup>23</sup> Bright-Star, Biodetect, Ambion Inc, Austin, TX, USA

<sup>24</sup> Kodak Biomax MR film, Kodak Co, Rochester, NY, USA



Figura 5a: Carregamento das amostras por sobre a membrana de nylon no mini-slot.



Figura 5b - Ativação do vácuo para a absorção das amostras pela membrana.



Figura 6 - Marcação das sondas com psoralen-biotin.



Figura 7 - Carregamento das sondas no miniblotter



Figura 8 - lavagem da membrana em agitador.

#### 4.7 Forma de análise dos resultados

Foram calculadas médias para os valores obtidos de cada parâmetro para cada paciente nos diferentes períodos de avaliação e posteriormente a média para o grupo. O teste *t* de Student não-pareado foi utilizado para verificar as diferenças inter-grupos, nas médias iniciais e nas médias de redução (diferenças entre períodos inicial e demais períodos) para os parâmetros RG, PS e NICr e para os dados de SS e IPL, usou-se o teste de Mann-Whitney. Já as diferenças intra-grupos, entre os diversos períodos de avaliação, foi verificada através do teste repetidas medidas de ANOVA e múltiplas comparações entre períodos foram analisadas pelo teste Holm-Sidak. As diferenças entre os grupos também foram avaliadas considerando um subgrupo de bolsas moderadas (5 a 6mm) e profundas ( $\geq 7$ mm). Além disso, foram calculadas as porcentagens de sítios que apresentaram ganho em PS e NICr maior que 2mm e de 1 a 2mm para os dois grupos. Estes valores foram submetidos ao teste *z* de proporções para detectar as diferenças entre os grupos. Para a análise dos dados microbiológicos, foi calculada a porcentagem de sítios positivos para cada bactéria nos diferentes períodos e o teste de Friedman e Wilcoxon Rank Sum foram usados para análises intra-grupos (entre períodos no mesmo grupo) e o teste de Mann-Whitney para análises inter-grupos (entre mesmos períodos nos diferentes grupos). Além disso, porcentagens de redução na proporção de sítios positivos também foram calculadas e comparadas entre grupos pelo teste *z*. Para todas as análises estatísticas, foi-se considerado o  $\alpha = 0,05$ .



## **5 RESULTADOS**

### **5.1 RESULTADOS CLÍNICOS**

Foram tratados um total de 43 pacientes ao final de seis meses, sendo 22 pertencentes ao grupo teste (RAR-D) e 21 ao grupo controle (RAR). Ao final de 1 ano 35 pacientes se encontravam em manutenção (19 e 16 respectivamente) e aos 2 anos, 30 pacientes (17 e 13 respectivamente). Cinco pacientes foram excluídos da pesquisa pois pararam de fumar definitivamente ou por algum período durante o experimento. Um total de 19 homens e 24 mulheres participaram do estudo, distribuídos de forma homogênea entre os grupos. A média de idade destes pacientes foi de  $40,45 \pm 4,47$  anos para o grupo RAR-D e de  $42,00 \pm 4,38$  anos para o grupo RAR.

No grupo controle foram tratados um total de 189 sítios, sendo 152 de profundidade moderada (5 a 6mm) e 33 sítios profundos ( $\geq 7$ mm). No grupo teste, foram tratados 110 sítios, sendo 87 de profundidade moderada e 25 profundos. Alguns sítios foram excluídos durante o experimento, ou por apresentarem perda de inserção superior a 2mm, os quais receberam novos procedimentos de raspagem e alisamento radicular, ou por motivos protéticos.

A calibração prévia dos examinadores através de teste *t* de Student demonstrou valores similares ( $p > 0,05$ ) e correlação de Pearson significativa ( $p < 0,0001$ ) para as mensurações duplicadas de RG, PS e NICr ( $r = 0,61$ ,  $0,75$  e  $0,91$ , respectivamente para o examinador 1 e  $0,71$ ,  $0,81$  e  $0,89$  para o examinador 2). Não houve diferença entre as medidas dos dois examinadores ( $p < 0,05$ ).

O teste *t* de Student demonstrou que não houve diferenças entre os grupos RAR e RAR-D quanto aos parâmetros PS, RG, IPL e SS no período inicial ( $p > 0,05$ ). Os níveis de inserção iniciais não foram comparados entre os grupos, por serem relativos a um guia de sondagem, de dimensões diferentes para cada paciente.

As análises intra e inter-grupos, pelo teste repetidas medidas de ANOVA e teste t serão feitas separadamente, de acordo com cada parâmetro analisado.

### 5.1.1 Índice de placa (IPL)

Ambos os grupos apresentaram redução significativa nos índices de placa em todos os períodos ( $p < 0,001$ ). O grupo RAR-D apresentou uma redução média de 23% entre todos os períodos, enquanto que no grupo RAR, esta redução foi de 18%. O teste *de* Mann-Whitney não demonstrou diferença significativa nas médias de redução em placa entre grupos em nenhum dos períodos avaliados ( $p > 0,05$ ). O gráfico 1 apresenta os valores médios de porcentagem nos índices de placa dos pacientes de ambos os grupos nos diversos períodos de avaliação.

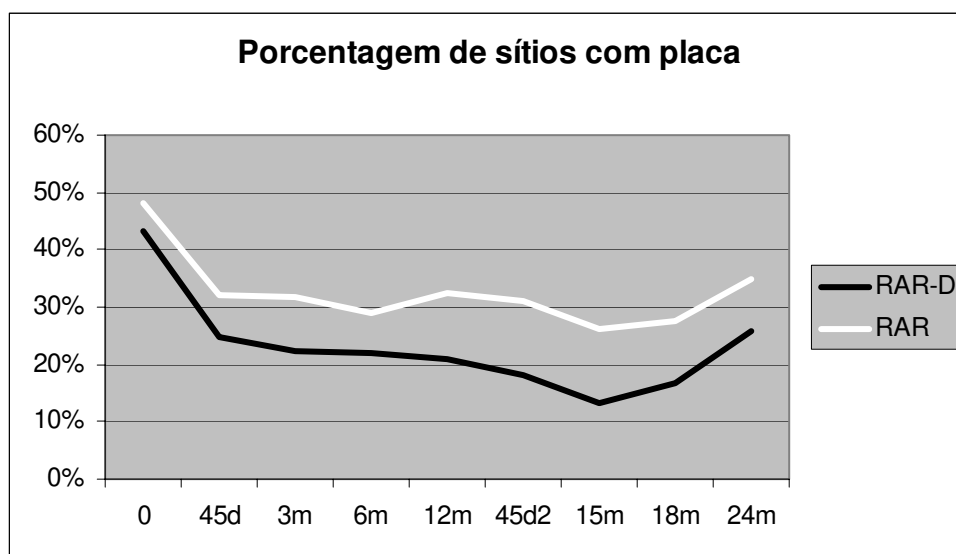
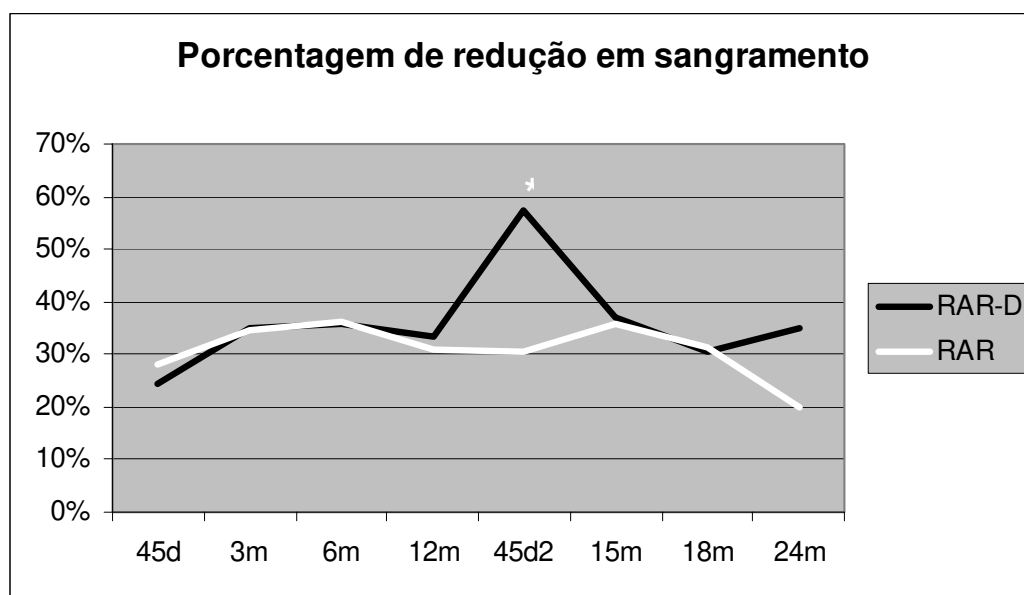


Gráfico 1 - Porcentagem de placa presente nos diversos períodos avaliados para os grupos teste (RAR-D) e controle (RAR).

### 5.1.2 Sangramento à sondagem

Ambos os grupos apresentaram redução significativa de sangramento à sondagem em todos os períodos ( $p < 0,001$ ). O grupo RAR-D apresentou uma redução média de sangramento de 36%, enquanto que para o grupo RAR, esta redução foi de 31%. O teste de Mann-Whitney demonstrou diferença significativa dos valores entre os grupos somente no período de 45 dias<sup>2</sup> (pós retratamento) ( $p = 0,03$ ). O gráfico 2 apresenta os valores médios de porcentagem de sangramento à sondagem dos pacientes de ambos os grupos nos diversos períodos de avaliação.



\* Valor estatisticamente significativo entre grupos pelo teste de Mann-Whitney ( $p = 0,03$ )

Gráfico 2 - Porcentagem de sangramento à sondagem presente nos diversos períodos avaliados para os grupos teste (RAR-D) e controle (RAR).

### 5.1.3 Recessão Gengival

Ambos os grupos avaliados apresentaram aumento no grau de recessão gengival significativos ( $p < 0,001$ ). Porém, para o grupo teste o aumento na recessão foi somente significativo nos primeiros 6 meses e aos 24 meses quando comparados ao período inicial. Já no grupo controle, esse aumento foi significativo até os seis meses e nos períodos 18 e 24 meses. A avaliação entre grupos não demonstrou diferenças entre as médias de aumento em recessão em nenhum dos períodos avaliados, que foram de  $0,59 \pm 0,56$  mm para o grupo RAR-D e  $0,43 \pm 0,58$  mm para o grupo RAR, ao final de 24 meses ( $p = 0,464$ ). As médias para este parâmetro para ambos os grupos estão expressas no gráfico 3.

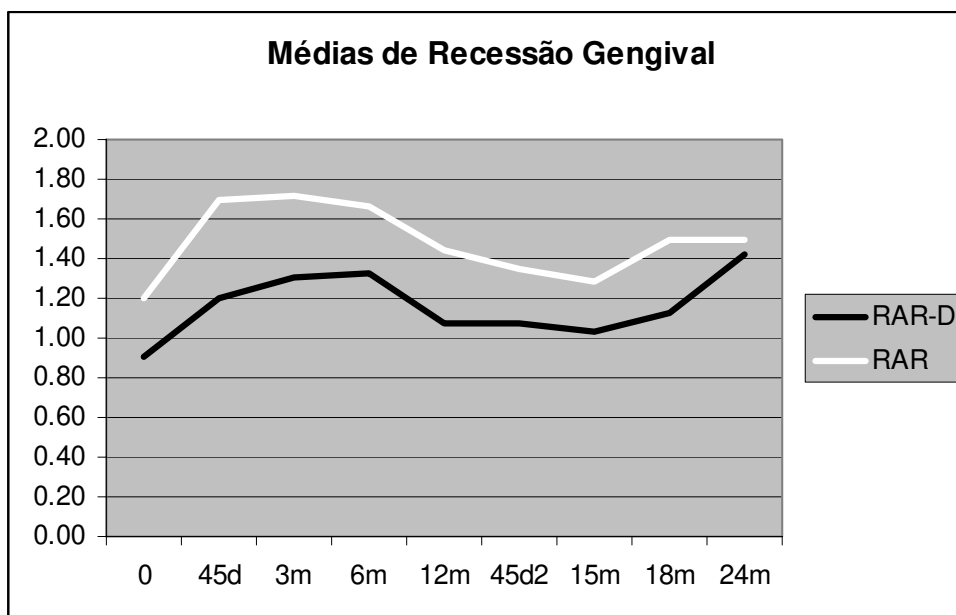


Gráfico 3 - Médias (em mm) de recessão gengival nos diversos períodos avaliados para os grupos teste (RAR-D) e controle (RAR).

#### 5.1.4 Profundidade de Sondagem (PS)

Ambos os grupos apresentaram reduções significativas em PS, em todos os períodos avaliados ( $p < 0,001$ ). As médias de redução para este parâmetro de ambos os grupos e nos diferentes períodos estão presentes na tabela 2. A análise estatística pelo teste *t* de Student detectou diferença estatisticamente significativa entre os grupos somente aos 3 meses ( $p = 0,049$ ).

Tabela 2

Médias de redução de PS em mm nos diversos períodos avaliados para os grupos teste (RAR-D) e controle (RAR). O valor de *p* é referente às comparações entre grupos.

n.pacientes RAR- D/RAR	Períodos	Teste-RAR-D		Controle-RAR		valor de p
		Média	dp	Média	dp	Teste t
23/21	45d	1.63	1.16	1.50	0.55	0.643
23/21	3m	2.02	0.79	1.62	0.45	0.049*
23/21	6m	2.08	0.92	1.76	0.63	0.19
19/16	12m	1.63	1.09	1.61	0.58	0.948
11/8	45d2	2.23	1.00	2.08	0.74	0.725
17/13	15m	1.84	1.10	2.15	0.94	0.423
14/14	18m	2.27	0.90	1.85	0.57	0.152
17/13	24m	2.29	1.14	2.19	0.76	0.787

Dp=desvio-padrão; \* valor estatisticamente significante

Em relação às bolsas moderadas, houve uma redução média de  $1,90 \pm 1,07$ mm para o grupo RAR-D e de  $2,05 \pm 0,76$ mm para o grupo RAR ( $p = 0,672$ ) ao final dos 24 meses. Não houve diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos períodos para estas bolsas. O gráfico 4 demonstra as médias em redução de bolsas para bolsas moderadas. A figura 5 (a-b) mostra redução de bolsa moderada do grupo teste. Já para as bolsas profundas, foram encontradas diferenças significativas entre as médias de  $3,78 \pm 1,41$ mm e  $2,60 \pm 1,36$ mm

( $p=0,049$ ) aos 6 meses e entre  $3,81 \pm 1,17\text{mm}$  e  $2,08 \pm 1,41\text{mm}$  ( $p=0,018$ ) aos 18 meses, para RAR-D e RAR, respectivamente (gráfico 5). As figuras 9 (a-c) são ilustrativas da redução clínica de bolsa profunda no grupo teste.



Figuras 9(a-c) - Ilustração do tratamento no grupo teste: PS no período inicial (a), PS aos 6 meses (b) e aos 12 meses (c).

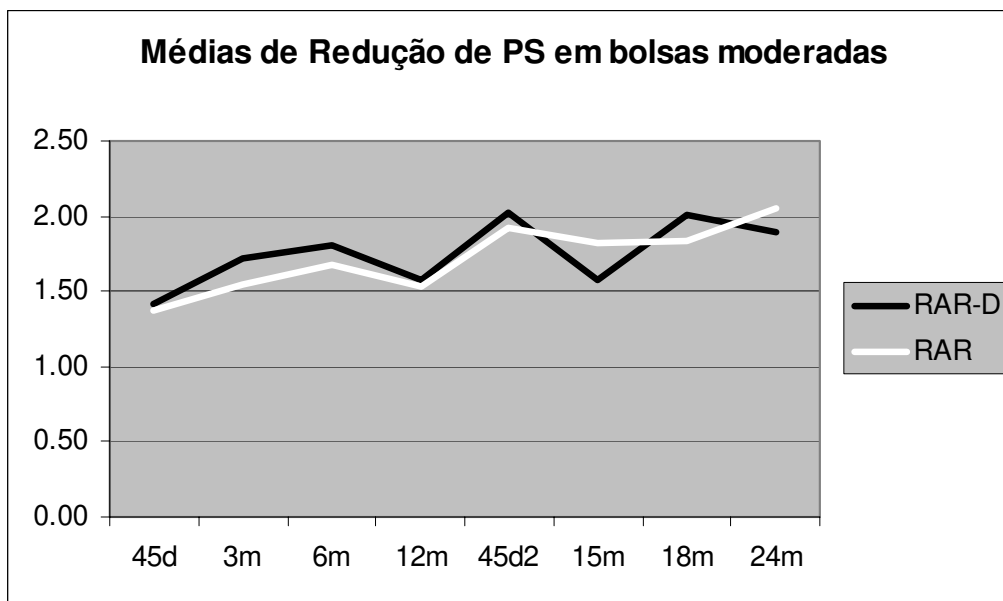
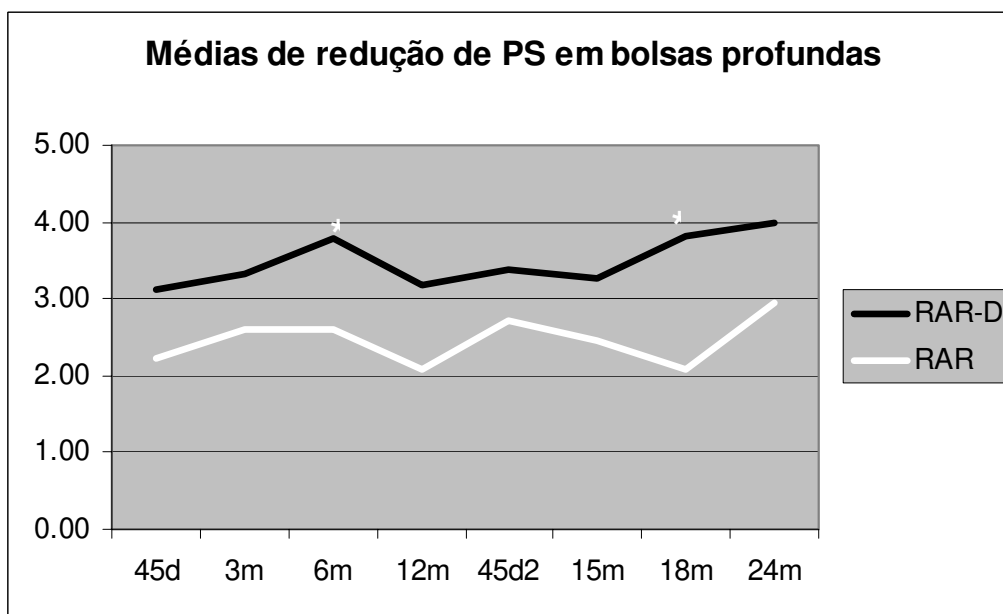


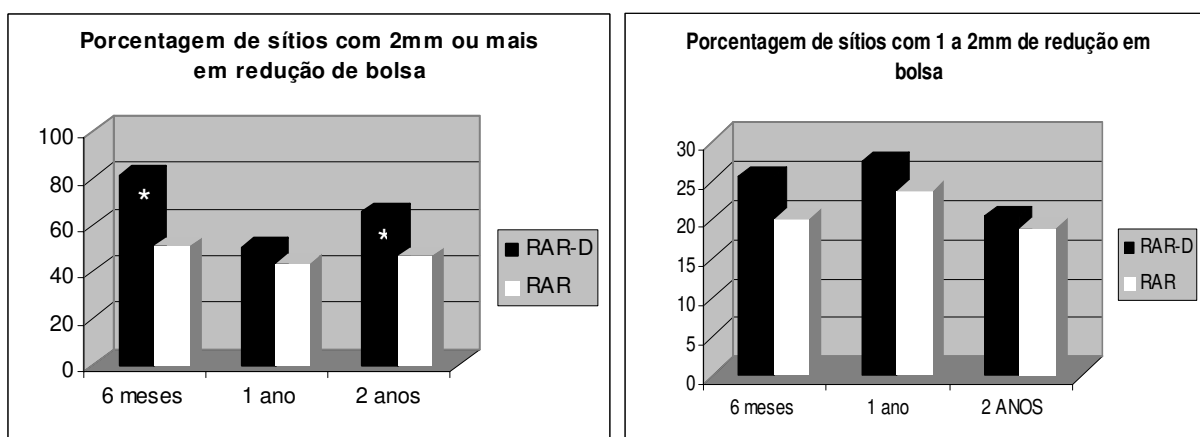
Gráfico 4 - Médias de redução de PS (em mm) de bolsas com profundidade inicial moderada (5 a 6mm) para os grupos teste (RAR-D) e controle (RAR).



\* Valor estatisticamente significante entre grupos pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ )

Gráfico 5 - Médias de redução de PS (em mm) de bolsas com profundidade inicial profunda (7mm ou mais) para os grupos teste (RAR-D) e controle (RAR).

O teste z para proporções detectou diferença estatisticamente significativa favorecendo o grupo teste para a distribuição de sítios que ganharam mais que 2mm, de 1 a 2mm em PS, nos períodos de 6 e 24 meses ( $p < 0,05$ ). Ver gráficos 6 e 7 para mudanças em PS e NICr respectivamente.



Gráficos 6 e 7 - Distribuição dos sítios, em porcentagens, que ganharam mais que 2mm e de 1 a 2mm em PS em ambos os grupos.

### 5.1.5 Nível de Inserção Clínica relativo (NICr)

Ambos os grupos apresentaram ganhos significativos em NICr, em todos os períodos avaliados ( $p < 0.001$ ). As médias de ganho para o parâmetro NICr de ambos os grupos e nos diferentes períodos estão descritas na tabela 3. A análise estatística pelo teste *t* de Student detectou diferença estatisticamente significativa entre os grupos aos 6 e aos 24 meses ( $p < 0.05$ ).



Tabela 3

Médias de ganho e desvio padrão em NICr em mm nos diversos períodos avaliados. O valor de  $p$  é referente às comparações entre grupos nos diversos períodos.

n.pacientes RAR-D/RAR	períodos	RAR-D		RAR		valor de p
		médias	dp	médias	dp	
23/21	<b>45d</b>	0.99	0.84	0.99	0.88	1
23/21	<b>3m</b>	1.40	0.66	1.11	0.65	0.15
23/21	<b>6m</b>	1.64	0.91	1.04	0.70	0.019*
19/16	<b>12m</b>	1.31	0.95	0.99	0.85	0.305
10/8	<b>45d2</b>	1.69	0.90	1.19	0.74	0.224
16/13	<b>15m</b>	1.20	0.82	1.07	0.74	0.661
11/14	<b>18m</b>	1.46	0.80	0.87	0.87	0.095
14/12	<b>24m</b>	1.58	0.73	0.70	0.94	0.013*

\* Valor estatisticamente significante ( $p < 0,05$ )

Em relação às bolsas moderadas, houve um ganho de  $1.30 \pm 1.00$ mm para o grupo RAR-D e de  $0.65 \pm 0.99$  para o grupo RAR ( $p=0.096$ ) ao final de 24 meses (gráfico 8). Já para as bolsas profundas, houve diferença estatisticamente significante entre os ganhos de  $2.54 \pm 1.27$ mm e  $1.38 \pm 1.00$ mm ( $p < 0.021$ ), aos 6 meses, entre  $2.83 \pm 1.27$  e  $0.83 \pm 1.43$ mm ( $p < 0.016$ ) aos 18 meses e entre  $2.40 \pm 1.41$  e  $0.62 \pm 0.63$ mm aos 24 meses ( $p < 0.014$ ) para RAR-D e RAR, respectivamente (gráfico 9).

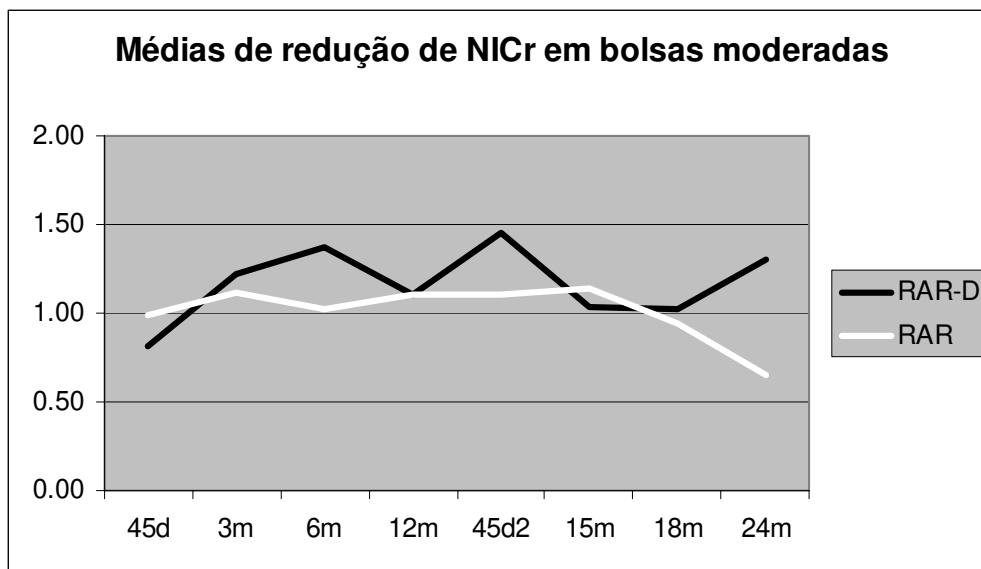
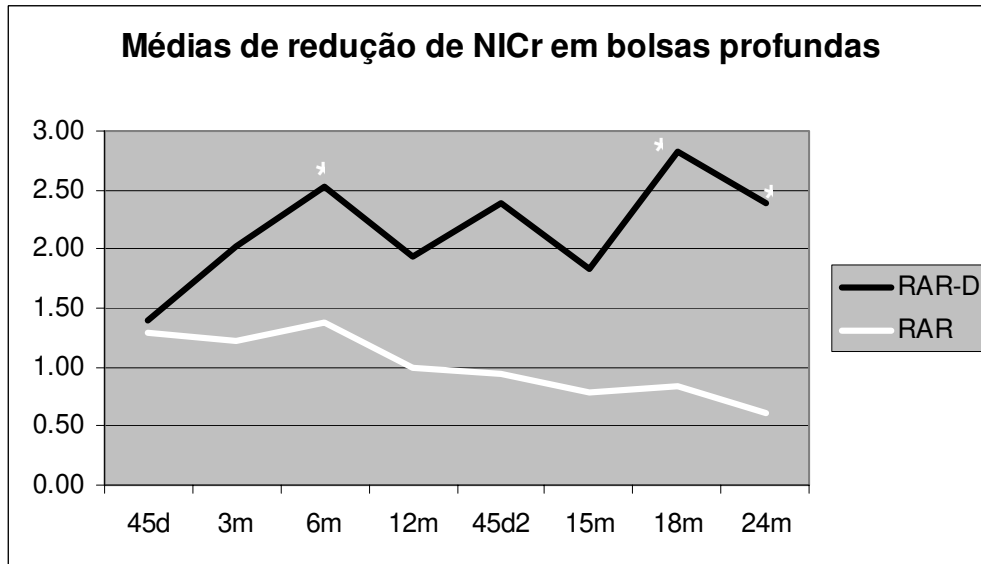


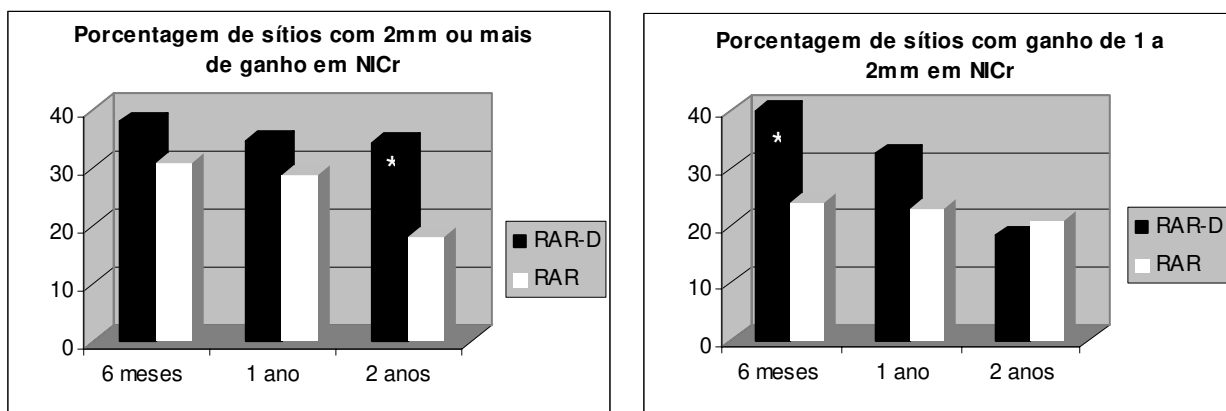
Gráfico 8 - Médias de ganho em NICr (em mm) em sítios de profundidade inicial moderada (5 a 6mm) para os grupos teste (RAR-D) e controle (RAR).



\* Valor estatisticamente significante ( $p < 0,05$ )

Gráfico 9 - Médias de ganho em NICr (em mm) em sítios de profundidade inicial profunda (7 mm ou mais) para os grupos teste (RAR-D) e controle (RAR).

O teste z para proporções detectou diferença estatisticamente significativa favorecendo o grupo RAR-D para a distribuição de sítios apresentaram ganho em NICr de mais de 2mm em 2 anos ( $p<0.008$ ) e de 1 a 2mm no período de 6 meses ( $p<0.014$ ). Os valores proporções de ganho em NICr estão expressos nos gráficos 10 e 11.



\* Valor estatisticamente significativo ( $p<0,05$ )

Gráficos 10 e 11 - Distribuição dos sítios, em porcentagens, que ganharam mais que 2mm e de 1 a 2mm em NICr em ambos os grupos.

## 5.2 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

### 5.2.1 PCR

Um total de 29 sítios periodontais (16 pacientes) foram analisados para a presença de *Aa*, *Tf* e *Pg* (17 sítios e 9 pacientes do grupo RAR-D e 12 sítios e 7 pacientes do grupo RAR).

A grande maioria dos sítios avaliados foram positivos para a presença de eubacteria, exceto 1 sítio do grupo RAR no período de 1 ano, o qual foi excluído.

A detecção de *Aa* se deu em pequeno número de sítios inicialmente (4 do grupo RAR-D e 5 do RAR). As porcentagens de sítios positivos para essa espécie estão expressas no gráfico 12.

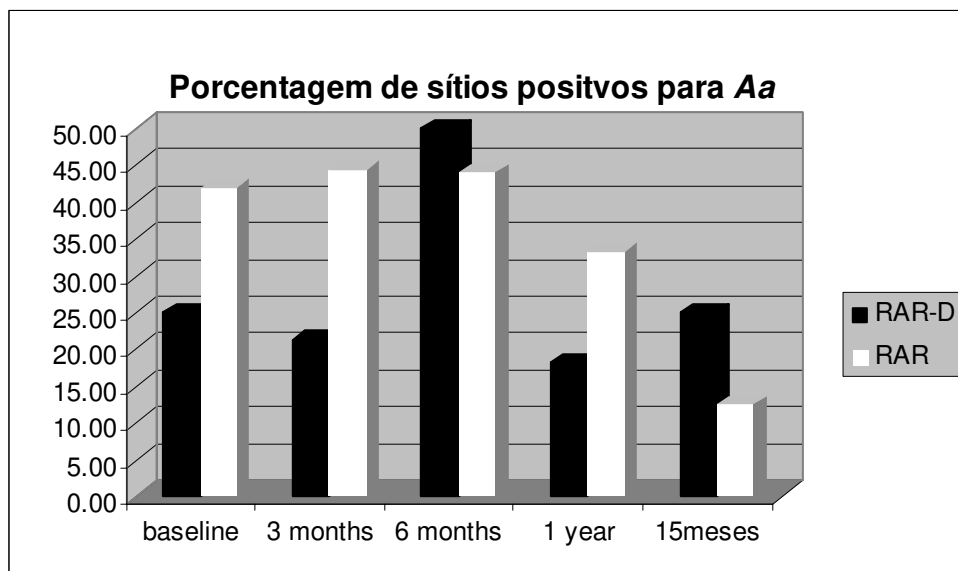


Gráfico 12 - Porcentagem de sítios positivos para *A. actinomycetemcomitans* em ambos os grupos.

Maior número de sítios se apresentaram positivos para *Tf* inicialmente (15 para RAR-D e 9 para RAR). A redução de sítios positivos para esta espécie foi significativa em todos os períodos pós tratamento para RAR-D e a partir dos 6 meses para RAR ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença das médias entre os grupos. O gráfico 13 mostra as porcentagens de sítios positivos para esta espécie em ambos os grupos.

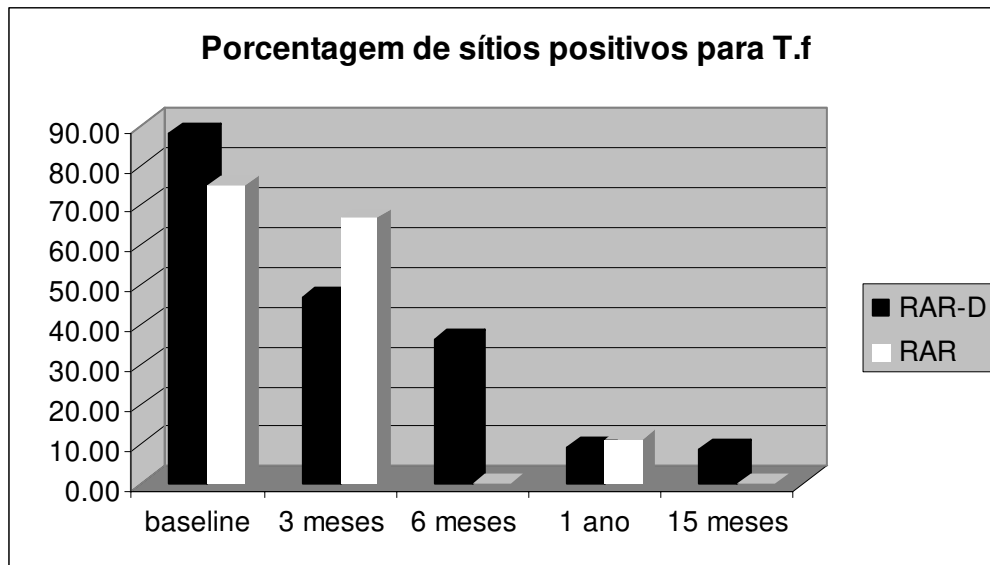
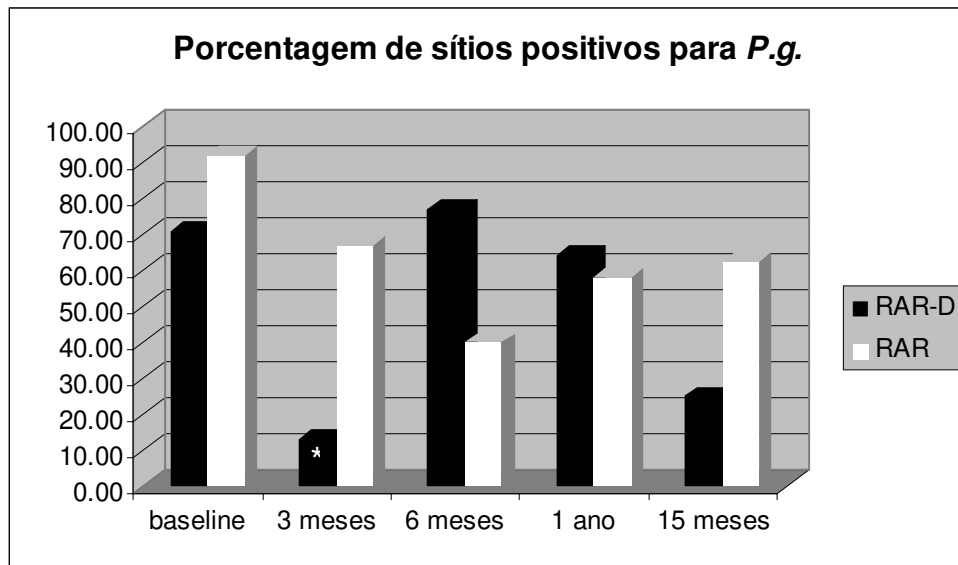


Gráfico 13 - Porcentagem de sítios positivos para *T.forsythensis* em ambos os grupos.

Alta frequência de detecção foi encontrada para a espécie *P.gingivalis* em ambos os grupos (12 para RAR-D e 11 para RAR). A redução de sítios positivos para esta espécie foi significativa nos períodos 3 e 15 meses pós tratamento para RAR-D e aos 6 meses para RAR ( $p < 0,05$ ). Além disso, houve diferença nas porcentagens entre os grupos aos 3 meses ( $p = 0,013$ ). O gráfico 14 mostra as porcentagens de sítios positivos para esta espécie em ambos os grupos.



\* Valor estatisticamente significativo entre grupos ( $p < 0,05$ )

Gráfico 14 - Porcentagem de sítios positivos para *P.gingivalis* em ambos os grupos.

### 5.2.2 CHECKERBOARD

Foram analisados um total de 32 sítios (18 RAR-D e 14 RAR) em 19 pacientes (11 RAR-D e 8 RAR) que necessitaram de retratamento. Em geral, a presença de espécies específicas neste período de retratamento foi baixa, com exceção de *Pg*. As porcentagens de bactérias encontradas no período de retratamento (aos 12 meses) nesses sítios estão expostas no gráfico 16. Não houve diferenças entre os grupos na proporção de sítios neste período ( $p > 0,05$ ).

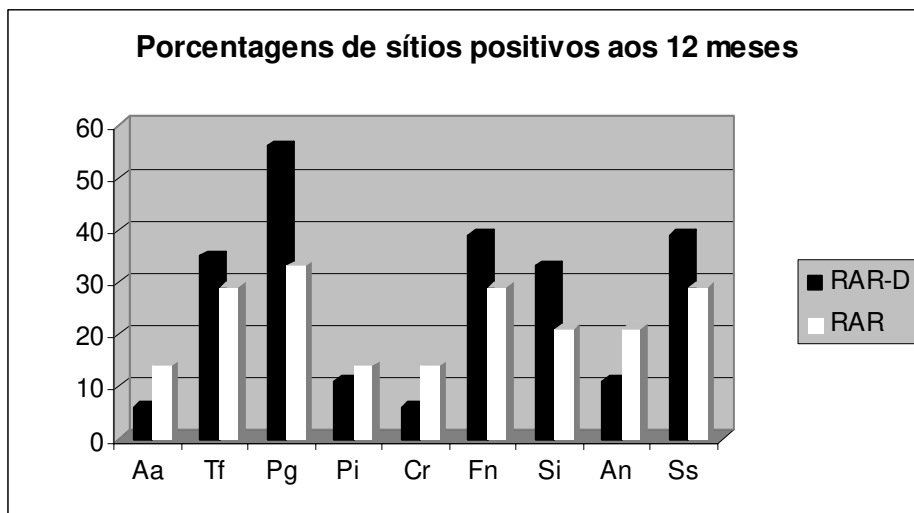


Gráfico 16 - Porcentagem de sítios positivos para as bactérias analisadas no período de retratamento – 12 meses para os grupos RAR-D e RAR.

A presença das espécies *Aa*, *Cr*, *Fn* e *An* não foi detectada em nenhum ou apenas 1 dos sítios analisados nos períodos pós-retratamento. O teste de friedman não detectou diferenças estatísticas entre os períodos avaliados para nenhuma das espécies, em ambos os grupos ( $p > 0,05$ ). Os gráficos 17a e b apresentam as porcentagens de bactérias nos períodos 12 meses, 45 dias-2 e 15 meses para os grupos teste (17a) e controle (17b).

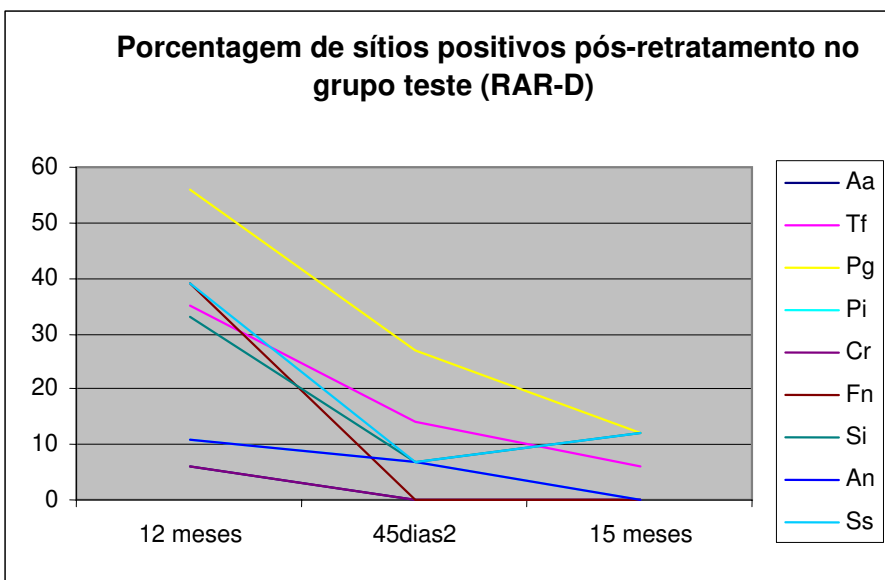


Gráfico 17a - Porcentagem de bactérias presentes nos períodos 12 meses, 45 dias-2 e 15 meses para o grupo teste.

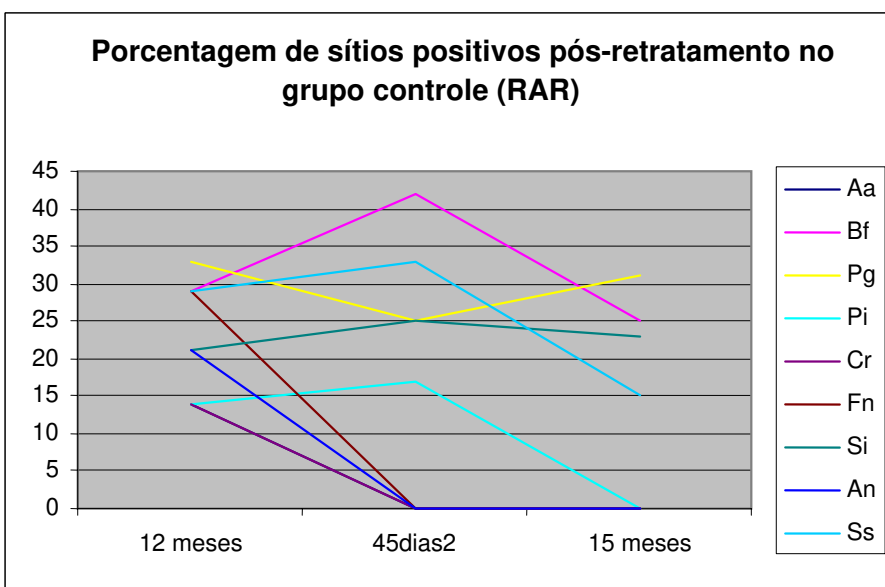
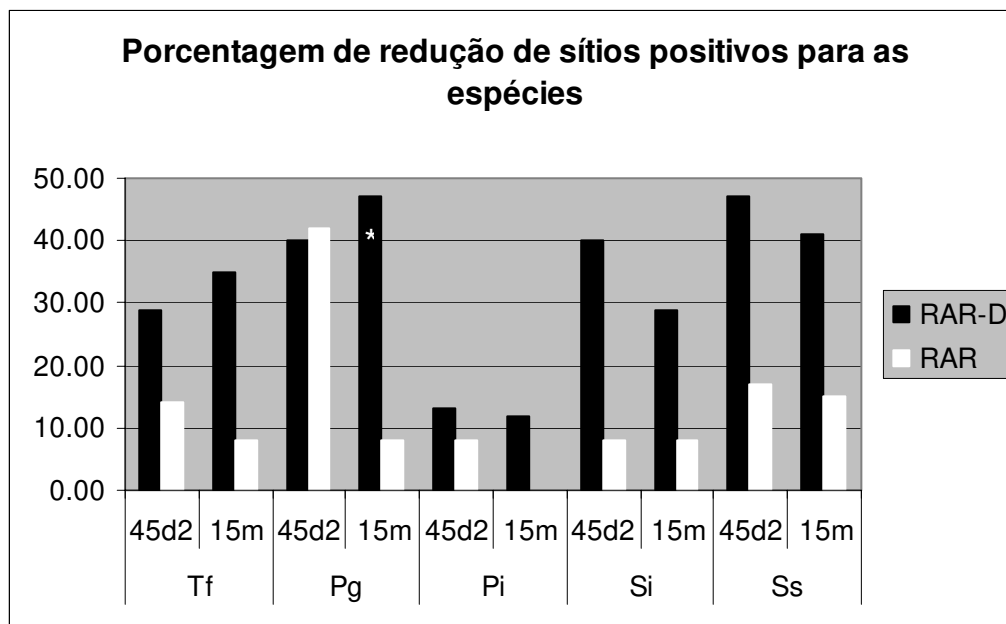


Gráfico 17b - Porcentagem de bactérias presentes nos períodos 12 meses, 45 dias-2 e 15 meses para o grupo controle.



Considerando as reduções nas proporções de sítios positivos para cada espécie, o teste z detectou diferença na redução de *Pg* aos 15 meses ( $p=0,049$ ). Ver gráfico 18.



Valor estatisticamente significativo entre grupos ( $p<0,05$ )

Gráfico 18 - Porcentagens de redução de sítios positivos para cada espécie analisada nos grupos teste (RAR-D) e controle (RAR).

## **6 DISCUSSÃO**

Vários estudos têm demonstrado a resposta desfavorável de pacientes fumantes frente ao tratamento periodontal não-cirúrgico (Ah *et al.*, 1994; Kaldahl *et al.*, 1996). Entretanto, poucos estudos têm avaliado o tratamento local de drogas antimicrobianas como adjunto ao tratamento destes pacientes. O presente estudo objetivou a avaliação de uma droga local, efetiva contra a doença periodontal, associada ao tratamento convencional de raspagem e alisamento radicular, no tratamento destes pacientes a longo prazo.

Os índices de redução de placa presentes neste estudo caracterizam a realização de medidas preventivas contra a recolonização dos sítios tratados e para o conseqüente sucesso do tratamento proposto e estão de acordo com a literatura. Palmer *et al.* (1999) encontraram uma média de redução nos índices de placa de pacientes fumantes de 21,8% aos 6 meses, enquanto que no presente trabalho, estes índices foram de 21% e 19% para os grupos teste e controle respectivamente, sem diferenças estatisticamente significantes entre estes.

Quanto aos índices de sangramento, Palmer *et al.* (1999) encontraram reduções similares aos 6 meses para o grupo de fumantes que recebeu terapia mecânica associada ou não ao gel de metronidazol (48,4% e 47,4%, respectivamente). No presente estudo, os valores de redução para os índices de sangramento, aos 6 meses, foram de 36% para ambos os grupos RAR-D e RAR, também não estatisticamente diferentes entre si. Embora os valores do estudo prévio tenham sido superiores a este estudo, a terapia adjunta com o gel de metronidazol também não proporcionou maiores valores de redução em SS do que a terapia convencional isoladamente. Já Wennstrom *et al.* (2001), utilizando tratamento adjunto local com doxiciclina, encontrou diferenças estatisticamente significantes neste parâmetro favorecendo o grupo da terapia adjunta ao final de 6 meses. Este resultado não corrobora com os observados no presente estudo. Entretanto, Wennstrom *et al.* incluíram pacientes fumantes e não fumantes em sua amostra, fato este que pode ter influenciado a redução nos índices de

sangramento, já que pacientes fumantes apresentam menores índices de inflamação do que pacientes não fumantes (Nair *et al.* 2003; Dietrich *et al.* 2004). Outro fator observado no presente estudo, foi a maior redução no sangramento à sondagem no grupo RAR-D no período de 45 dias após o retratamento. Essa maior redução pode ser explicada por dois fatores: o primeiro é o número de sítios sangrantes que inicialmente foi maior, o que poderia influenciar na porcentagem de sítios que pararam de sangrar após o tratamento; o segundo fator é dado pela profundidade de bolsas, que inicialmente também é maior. No momento do retratamento, somente 9% dos sítios do grupo RAR-D e 10,4% dos sítios do grupo RAR eram profundos (>6mm). Sabe-se que a descontaminação de bolsas profundas é mais difícil (Caffesse *et al.*, 1986), o que poderia ter influenciado nas diferenças dos dados de sangramento após o primeiro e segundo tratamento, e portanto, a segunda aplicação da droga local adjunta à descontaminação radicular pode ter sido mais efetiva para a redução deste parâmetro em sítios refratários ou recorrentes.

Considerando reduções em profundidade de sondagem do presente estudo, foram encontradas diferenças significativas aos 3 meses em todas as bolsas e aos 6 e 18 meses em bolsas profundas. Uma comparação de três tratamentos antimicrobianos locais foi feita por Radvar *et al.* (1996), os quais observaram maiores valores de redução em PS no tratamento adjunto com fibras de tetraciclina (1,35mm para tetraciclina contra 0,87 e 0,95mm para minociclina e metronidazol respectivamente). Portanto, considerando somente o tratamento adjunto com tetraciclina, observamos superioridade da tetraciclina local como encontrado no presente estudo (redução 2,02mm em PS aos 3 meses). Esta similaridade nos valores pode ser atribuída às mesmas propriedades farmacológicas das drogas utilizadas nestes estudos e da eficiência do dispositivo de liberação controlada, tanto das fibras de tetraciclina, quanto do gel de doxiciclina. Talvez, em um maior tempo de avaliação, os resultados encontrados seriam similares ao do presente estudo aos 6 meses.

O presente estudo procurou avaliar o efeito da doxiciclina local adjunta a longo prazo e por esse motivo, os tratamentos propostos somente foram realizados nos períodos inicial e 12 meses. Os resultados demonstraram que os ganhos são superiores para o tratamento adjunto, principalmente em bolsas profundas em todo o período de avaliação, porém significativa ( $p < 0,05$ ) aos 6 meses (diferenças de 1,18 e 1,16 para PS e NIC respectivamente) e novamente aos 18 meses (6 meses após o retratamento, 1,73 e 1,99 para PS e NIC respectivamente). Poucos trabalhos na literatura procuraram avaliar o efeito a longo prazo desses agentes. Além disso, pela dificuldade de se manter pacientes em pesquisa longitudinal, fica difícil se manter um número significativo de pacientes ao final do período de avaliação. Entretanto, um recente trabalho de Aimmetti *et al.* (2004), acompanhando 19 pacientes por um período de 12 meses, demonstrou superioridade significativa entre tratamento adjunto de fibras de tetraciclina quando comparado ao tratamento convencional aos 6 meses e aos 12 meses (diferenças de 0,70mm e 1,2mm aos 12 meses para PS e NIC respectivamente), o que corrobora em parte com os resultados do presente estudo. Os resultados deste estudo são inferiores aos nossos devido à maior profundidade inicial das bolsas do presente estudo. Além disso, a aplicação da droga se restringiu somente a dois sítios não-respondentes à terapia convencional e os mesmos foram raspados novamente aos 3, 6 e 9 meses, o que pode ter influenciado na manutenção de resultados significantes entre os grupos até os 12 meses.

A terapia de suporte é muito importante para a manutenção dos resultados favoráveis obtidos após terapia inicial. No presente estudo, observou-se a manutenção de resultados superiores para o grupo teste até 6 meses, porém aos 12 meses não observamos mais a superioridade estatística da aplicação da droga local. Isso pode estar relacionado a falta de terapia de suporte entre os períodos de 6 e 12 meses. Embora menos favoráveis em termos estatísticos, os ganhos obtidos em profundidade de sondagem e inserção clínica foram mantidos favoráveis durante todo o período experimental avaliado no presente estudo.

Há poucos dados na literatura considerando o uso das drogas locais em pacientes fumantes. Sabendo-se que o fumo é fator deletério na resposta ao tratamento periodontal (Kaldahl *et al.*, 1996), o presente estudo procurou avaliar se o uso da doxiciclina local como tratamento adjunto nesses pacientes traria algum benefício adicional. Os primeiros trabalhos avaliando antimicrobianos locais em fumantes (Kinane & Radvar *et al.*, 1997, Palmer *et al.*, 1999) não encontraram benefícios adicionais com de diferentes drogas locais. Porém o estudo de Ryder *et al.*, em 1999, demonstrou que pacientes fumantes recebendo doxiciclina local respondiam similarmente à pacientes não fumantes, com a mesma terapia. Neste trabalho, porém, os pacientes fumantes receberam raspagem e alisamento radicular ou gel de doxiciclina isoladamente, e não encontraram diferenças entre os tratamentos local e convencional. A associação do procedimento de raspagem e alisamento radicular à terapia local, realizada no presente estudo, pode ter favorecido uma maior difusão da droga e conseqüentemente, maior efetividade desta contra os patógenos remanescentes, já que o biofilme bacteriano pode impedir a difusão ou mesmo inativar agentes farmacológicos no ambiente subgingival. Isso poderia explicar os resultados superiores do tratamento de doxiciclina local adjunto encontrados no presente estudo.

Outro trabalho mais recente, utilizando tratamento com microesferas de minociclina adjunto à raspagem e alisamento radicular em fumantes (Paquette *et al.*, 2003), demonstrou maiores reduções de PS no grupo da terapia adjunta, bem como maiores porcentagens de sítios com ganho em PS de 2mm ou mais quando comparado ao controle (raspagem e alisamento radicular isoladamente) em acompanhamento de 9 meses, e concluíram que o uso desta terapia pode ser efetiva no tratamento desses pacientes. Os resultados deste estudo são similares aos do presente estudo, porém o efeito a longo prazo não pode ser comparado diretamente, já que esses autores reaplicaram as microesferas aos 3 e 6 meses.

Tomasi *et al.* (2004) também demonstraram que a doxiciclina local associada ao debridamento mecânico influenciou positivamente o tratamento de pacientes fumantes, e que a diferença entre este tratamento e o convencional, era

maior à medida que a profundidade inicial aumentava, o que corrobora com os achados do presente estudo, onde se conseguiu os maiores ganhos em bolsas inicialmente profundas. Este trabalho, no entanto, avaliou os parâmetros clínicos somente aos 3 meses pós-tratamento.

Um dado interessante do presente estudo são os valores de ganho em PS e NIC em bolsas profundas, os quais foram maiores após o tratamento teste. Esta maior diferença nos tratamentos de bolsas profundas pode ser explicada através da maior dificuldade de instrumentação destes sítios e conseqüentemente, maior auxílio terapêutico do agente antimicrobiano local. Além disso, Kinane & Radvar (1997) afirmam que pacientes fumantes respondem de maneira desfavorável, principalmente quando sítios profundos são considerados. Portanto, a terapia local antimicrobiana poderia ser de grande auxílio no tratamento de sítios profundos de pacientes fumantes.

Outro dado importante a ser mencionado no presente estudo é a proporção de sítios apresentando ganhos de PS e NIC  $\geq 2$ mm e de 1 a 2mm. O presente estudo demonstrou maiores proporções de sítios com ganhos  $\geq 2$ mm (em PS aos 6 e 24 meses e em NIC aos 24 meses) e de 1 a 2mm (em NIC aos 6 meses) no grupo teste. O estudo de Wennstrom *et al.*, 2001 também demonstrou maiores ganhos nessas proporções para o grupo que recebeu doxiciclina local adjunta ao debridamento mecânico aos 3 meses. Esse dado seria um dos dados importantes ao se avaliar significância clínica (Killooy, 2002), já que uma redução em profundidade de sondagem pode eventualmente eliminar a necessidade de cirurgia em uma área e, em se tratando de reduções  $\geq 2$ mm, esta mudança pode ser ainda mais provável (Killooy em comments..., 1998). Outro critério importante é a porcentagem de sítios apresentando profundidade de sondagem de 5mm ou menos e que não necessitaram de tratamento adicional ao final da terapia proposta. Williams *et al.* (2001) observaram esse critério em 65% dos sítios, inicialmente profundos, tratados com minociclina local + RAR contra 39% dos sítios tratados com RAR somente. As maiores diferenças entre os tratamentos com relação a critérios de significancia clínica se encontram no tratamento de sítios

inicialmente profundos (6mm ou mais), os quais resultam nos maiores ganhos. Assim, a observação desses dados se tornam importantes nos estudos atuais pois podem nos dar uma idéia de significancia não somente estatística, como também clínica, dos resultados obtidos com o uso de dispositivos locais. Além disso, se o uso de antibióticos locais resultar em ganho ou mesmo estabilidade dos níveis de inserção clínica, isto possibilitaria maior facilidade no controle da doença e conseqüentemente, maiores intervalos nas consultas de manutenção. No presente estudo, a redução em PS e o ganho em NIC foram favorecidos pelo uso do antibiótico local, principalmente em bolsas profundas, e que foram mantidos superiores pelo período de dois anos, o que indica não somente uma diferença estatística entre os tratamentos, como também, uma relevância clínica da terapia antimicrobiana local adjunta à raspagem nestes pacientes.

Com relação aos parâmetros microbiológicos, através da análise de PCR, o presente estudo demonstrou uma redução significativa na porcentagem de sítios positivos para *Pg* e *Tf* aos 3 meses no grupo RAR-D e aos 6 meses no grupo RAR.

A proporção de *Aa* presente no período inicial foi muito pequena (somente em 9 dos 29 sítios analisados) e portanto não houve mudanças significantes após ambos os tratamentos. Essa baixa proporção de *Aa* em pacientes com periodontite crônica já foi previamente reportada (Lowenguth *et al.*, 1995, van Velden *et al.*, 2003).

Não se encontram muitos trabalhos na literatura avaliando a proporção de patógenos subgingivais a longo prazo, especialmente no tratamento de fumantes. Porém, em concordância com o presente estudo, pode-se citar o trabalho de Lowenguth *et al.* (1995), os quais encontraram maiores reduções de *Pg*, entre outros patógenos, após tratamento com fibras de tetraciclina associadas à raspagem do que após raspagem isoladamente após 3 meses. Já outros trabalhos mais recentes (Salvi *et al.*, 2002 e Jorgensen *et al.*, 2004) não reportaram diferenças significantes na redução de periodontopatógenos entre o tratamento adjunto com doxiciclina local e raspagem e alisamento radicular. Porém, o estudo

de Jorgensen *et al.* não avaliou o pós-operatório por mais de 4 semanas e o desenho do estudo foi em boca-dividida, o que pode ter mascarado o efeito da droga local. Já no estudo de Salvi *et al.*, os pacientes receberam raspagem e alisamento radicular 2 a 4 meses previamente ao estudo e não houve remoção do biofilme no momento da aplicação local da droga. Portanto, a reorganização do biofilme entre o período de raspagem e a aplicação do agente local pode ter impedido ou dificultado sua ação subgengivalmente.

No presente estudo, o grupo RAR apresentou redução significativa na proporção de *Tf* e *Pg* somente aos 6 meses. Van Der Velden *et al.*, em 2003, reportou reduções significativas em fumantes somente em *Pg*, porém logo após o tratamento de descontaminação por raspagem. A redução dessas bactérias tardiamente no grupo RAR pode ser explicada pelo próprio mecanismo de defesa do hospedeiro, que tende a ser mais efetivo sob quantidades reduzidas de bactérias e da redução inflamatória dos tecidos, como por exemplo, maior produção de anticorpos sistêmicos após sessão de raspagem (Ebersole *et al.*, 1985, Socransky, 2002). Observou-se também um aumento na proporção de sítios com *Pg* (PCR) após o período de 3 meses para o grupo teste. Isto poderia ser explicado através da recolonização bacteriana após aplicação da droga, proveniente tanto de ambiente supragengival, como de bactérias remanescentes subgengivalmente, já que sabe-se que *Pg* tem a capacidade de penetrar em tecido gengival (Lamont *et al.*, 1992). Entretanto, os dados clínicos, em geral, não se alteram significativamente até o período de 6 meses no presente estudo, e após 3 meses da reaplicação da droga, as proporções de *Pg* voltam a cair, o que poderia indicar que esta reaplicação poderia ser realizada de 3 a 6 meses pós-tratamento inicial.

Deve-se ressaltar que a técnica de PCR é bastante sensível e portanto, reduções da microbiota subgengival após o tratamento não são detectadas, e sim, a presença ou ausência das mesmas. Sabe-se que ambos os tratamentos convencional ou com a droga local reduzem a microbiota subgengival, porém não



a eliminam, portanto, as bactérias remanescentes seriam facilmente detectadas por esta técnica.

Apesar dos efeitos antimicrobianos da droga local, não se deve desconsiderar a possibilidade de um efeito anticolagenolítico da doxiciclina. Embora Ciancio et al (1992) tenham demonstrado que a droga local não atinge profundidade no interior dos tecidos além da membrana basal, ainda pode-se considerar o efeito anti-colagenase da doxiciclina, em especial sobre as metaloproteinases localmente.

Com relação à análise de checkerboard realizada no período de retratamento, não houve redução significativa ( $p > 0,05$ ) de nenhum dos patógenos analisados pós retratamento, com exceção de *Pg* aos 15 meses no grupo teste. Isso deve-se ao fato de que as proporções de sítios positivos para cada espécie, com exceção de *Pg*, foram muito baixas aos 12 meses. Essas baixas proporções podem ser explicadas pelo fato de que esses pacientes já haviam sido tratados previamente e se encontravam sob terapia de manutenção, o que pode ter resultado em taxas de bactérias abaixo do nível de detecção da técnica aos 12 meses. Além disso, outro fator a ser levado em consideração é que no momento do retratamento as bolsas já não eram tão profundas como inicialmente, e sabe-se que nessas bolsas a redução de patógenos periodontais abaixo de valores detectáveis é mais difícil (Haffajee *et al.*, 1997). Além disso, é mais fácil reduzir a quantidade de bactérias quando estas se encontram em altos níveis inicialmente (Socransky & Haffajee, 2002), o que poderia explicar o maior efeito microbiológico da droga local no tratamento inicial. De qualquer maneira, maior redução em *Pg* se repete ao 3 meses pós-retratamento no grupo teste ( $p < 0,05$ ). Além disso, mesmo que não seja significativa, percebe-se uma redução da proporção de todos os patógenos analisados no grupo teste aos 45 dias-2 e aos 15 meses, o que ocorre no grupo controle somente para alguns patógenos (ver gráfico 17a e b). Walker *et al.* (2000) verificaram reduções substanciais de patógenos subgingivais com aplicação de doxiciclina local, porém não associada à raspagem e alisamento radiculares. No presente estudo, utilizamos a droga associada aos procedimentos

de raspagem e alisamento radicular, uma vez que bactérias presentes em biofilme apresentam maior resistência à antibióticos locais do que bactérias plantônicas (Walker *et al.*, em 2002). Assim, a remoção ou desorganização do biofilme deve ser realizada previamente à utilização de drogas locais, no intuito de viabilizar maior efetividade destas subgengivalmente.

Assim, através do presente estudo, podemos afirmar que a terapia antimicrobiana local com doxiciclina, associada à raspagem e alisamento radicular pode trazer benefícios adicionais ao tratamento periodontal de pacientes fumantes, em termos de ganho em profundidade de sondagem e inserção clínica, em especial, de bolsas inicialmente profundas ( $\geq 7$ mm). Entretanto, uma vez que os procedimentos de raspagem e alisamento radicular são eficazes no combate à doença periodontal (Kaldahl *et al.*, 1988; Cobb, 1996), deve-se considerar a relação custo-benefício na utilização destes medicamentos locais. Através deste trabalho, pode-se sugerir o uso deste medicamento na terapia de manutenção, em bolsas remanescentes, e principalmente em bolsas profundas. Ainda outros estudos, no entanto, devem ser realizados para comprovar a eficácia deste medicamento na terapia de manutenção a longo prazo ou ainda em outros pacientes imunocomprometidos, e assim, estabelecer uma base racional para a sua utilização na terapia periodontal.

## **7 CONCLUSÕES**

Dentro dos limites deste estudo, podemos concluir que:

- A associação do gel de doxiciclina aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular traz benefícios adicionais aos resultados da terapia periodontal inicial e de manutenção em fumantes, quando comparada à terapia mecânica isolada, principalmente em bolsas profundas.
- O tratamento adjunto com doxiciclina promove reduções significativas sítios positivos para patógenos periodontais, e oferece benefício adicional nos primeiros 3 meses pós-aplicação, quando comparado à terapia convencional.

## **REFERÊNCIAS\***

1. Addy M, Langeroudi M. Comparison of the immediate effects on the subgingival microbiota of acrylic strips containing 40% chlorhexidine, metronidazole or tetracycline. *J Clin Periodontol* 1984 Jul; 11(6): 379-86.
2. Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 1988 Apr; 59(4): 222-30.
3. Ah MK, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwarf KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1994 Feb; 21(2): 91-7.
4. Aimetti M, Romano F, Torta I, Cirillo D, Caposio P, Romagnolio R. Debridement and local application of tetracycline-loaded fibers in the management of persistent periodontitis: results after 12 months. *J Clin Periodontol* 2004 31: 166-72.
5. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975 Dec; 25(4): 229-35.
6. 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* 1996 Aug; 11(4): 266-73.
7. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ. Tetracyclines and its derivatives strong bind to and are released from tooth surface in active form. *J Periodontol* 1983 Oct; 54(10): 580-5.
8. Benkirane RM, Guillot E, Mouton C. Immunomagnetic PCR and DNA probe for detection and identification of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2908-12.

---

\* De acordo com a norma utilizada na FOP/Unicamp, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. Bjorvatn K, Skaug N, Selvig KA. Tetracycline-impregnated enamel and dentin: Duration of antimicrobial capacity. *Scan J Dent Res* 1985 Jun; 93(3): 192-7.
10. Caffesse RG, Sweeney PL, Smith BA. Scaling and root planning with and without periodontal flap surgery. *J Clin Periodontol* 1986 Mar; 13(3): 205-10.
11. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *P.gingivalis*, *P.intermedia* and *A.actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol* 2000 27: 903-97.
12. Christersson LA, Norderyd OM, Puchalsky CS. Topical application of tetracycline-HCL in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993 Feb; 20(2): 88.
13. Christersson LA, Wikesjo UM, Albin B, Zambon JJ, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. *J Periodontol* 1987 Aug; 58(8): 540-5.
14. Ciancio SG, Ashley R. Safety and efficacy of sub-antimicrobial-dose doxycycline therapy in patients with adult periodontitis. *Adv Dent Res* 1998 Nov; 12(2): 27-31.
15. Ciancio SG, Cobb CM, Leung M. Tissue concentration and localization of tetracycline following site-specific tetracycline fiber therapy. *J Periodontol* 1992 Oct; 63(10): 849-53.
16. Cobb CM. Non surgical pocket therapy: Mechanical. *Ann Periodontol* 1996 Nov 1(1): 443-90.
17. Comments: Local delivery of chemotherapeutic agents in periodontal therapy: has its time arrived? *J Clin Periodontol* 1998; 25: 978-9.
18. Crout RJ, Lee HM, Schroeder K, Crout H *et al.*. The "cyclic" regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol* 1996 May; 67(5): 506-14.

19. Dietrich T, Bernemoulin JP, Glynn RJ. The effect of smoking on gingival bleeding. *J periodontol* 2004 75(1): 16-22.
20. Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ. Effect of subgingival scaling on systemic antibody responses to oral microorganisms. *Infect Immun* 1985 48: 534-9.
21. Eickholz P, Kim TS, Burklin T *et al.*. Non surgical periodontal therapy with adjunctive topical doxycycline: a double-blind randomized controlled multicenter study. (I) Study design and clinical results. *J Clin Periodontol* 2002 29: 108-17.
22. Garrett S, Adams DF, Bogle G, Donly K, Drisko CH, Hallmon WW *et al.*. The effect of locally delivered controlled-release doxycycline or scaling and root planning on periodontal maintenance patients over 9 months. *J Periodontol* 2000 Jan; 71(1): 22-30.
23. Garrett S, Johnson L, Drisko CH, Adams DF, Bandt C, Beiswanger B *et al.*. Two multi center studies evaluating locally delivered doxycycline hyclate, placebo control, oral hygiene, and scaling and root planning in the treatment of periodontitis. *J Periodontol* 1999 May; 70(5): 490-503.
24. Golub LM, Wolff M, Roberts S, Lee HM, Leung M, Payonk GS. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. *JADA* 1994 Feb; 125(2): 163-71.
25. Goodson J. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J Dent Res* 1989 68: 1625-32.
26. Goodson JM, Cugini MA, Kent RL, Armitage GC, Cobb CM *et al.*. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy: II. Clinical response. *J Periodontal Res* 1991 Jul; 26(4): 371-9.
27. Goodson JM, Haffajee A, Socransky SS. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. *J Clin Periodontol* 1979 Apr; 6(2): 83-92.
28. Goodson JM, Offenbacher S, Farr DH, Hogan PE. Periodontal disease treatment by local drug delivery. *J Periodontol* 1985 May; 56(5): 265-72.

29. Graca MA, Watts TL, Wilson RF, Palmer RM. A randomized controlled trial of a 2% minocycline gel as an adjunct to non-surgical periodontal treatment, using a design with multiple matching criteria. *J Clin Periodontol* 1997 Apr; 24(4): 249-53.
30. Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. *J Periodontol* 1998 May; 69(5): 507-20.
31. Grenier D, Plamondon P, Sorsa T, Lee HM, McNamara T, Ramamurthy NS *et al.*. Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives. *J Periodontol* 2002 Jan; 73(1): 79-85.
32. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS *et al.*. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin periodontol* 1997 24: 767-76.
33. Isoshima O, Naora Y, Kurimoto K, Anada T, Kobayashi Y, Kobayashi M *et al.*. Antibiotic therapy in periodontal disease. I. Trial of the topical use with minocycline. *J Japan Assoc Assoc Periodontol* 1987 Jun; 29(2): 472-83.
34. Jeffcoat MK, Bray KS, Ciancio SG, Dentino AR, Fine DH, Gordon JM, *et al.* Adjunctive use of a subgingival controlled-release chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone. *J Periodontol* 1998 Sep; 69(9): 989-97.
35. Jones AA, Kornman KS, Newbold DA, Manwell MA. Clinical and microbiological effects of controlled-release locally delivered minocycline in periodontitis. *J Periodontol* 1994 Nov; 65(11): 1058-66.
36. Jorgensen MG, Safarian A, Daneshman N, Keim RJ, Slots J. Initial antimicrobial effects of controlled-released doxycycline in subgingival sites. *J Periodontal Res* 2004 39: 315-9.

37. Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL.. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol* 1996 Jul; 67(7): 675-81.
38. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Dyer JK, Bates RE Jr.. Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes. *J Periodontol* 1988 Dec; 59(12): 783-93.
39. Killoy WJ. The clinical significance of local chemotherapies. *J Clin Periodontol* 2002 29: Suppl 2: 22-9. Review.
40. Kinane DF, Radvar M. The effect of smoking on mechanical and antimicrobial periodontal therapy. *J Periodontol* 1997 May; 68(5): 467-472.
41. Lacroix JM, Walker CB. Detection and incidence of the tetracycline resistance determinant tet(M) in the microbiota associated with adult periodontitis. *J Periodontol* 1995 Feb; 66(2): 102-8.
42. Lamont RJ, Oda D, Persson RE, Persson GR. Interactions of *P.gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol* 1992 7(6): 364-7.
43. Lang NP, Joss A, Tonetti MS. Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. *Periodontol 2000* 1996 Oct; 12: 44-8.
44. Langer R. New Methods of drug delivery. *Science* 1990 Sep; 249(4976): 1527-33.
45. Langer RS, Peppas NA. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials* 1981 Oct; 2(4): 201-14.
46. Larsen T. Occurrence of doxycycline-resistant bacteria in the oral cavity after local administration of doxycycline in patients with periodontal disease. *Scand J Infect Dis* 1991; 23(1): 89-95.
47. Listgarten MA, Lindhe J, Hellden L. Effects of tetracyclines and/or scaling on human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1978 Nov; 5(4): 246-71.



46. Løe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965 May/Jun; 36(3): 177-87.
47. MacAlpine R, Magnusson I, Kiger R, Crigger M, Garrett S, Egelberg J. Antimicrobial irrigation of deep pockets to supplement oral hygiene instruction and root debridement. I. Bi-weekly irrigation. *J Clin Periodontol* 1985 Aug; 12(7): 568-77.
48. Machion L, Andia DC, Klein MI, Saito D, Gonçalves RB, Casati MZ, Nociti FH, Sallum EA. Microbiological changes with the use of locally delivered doxycycline in the periodontal treatment of smokers. *In press. J Periodontol* 2004 (December issue).
49. Machion L, Andia DC, Nogueira-Filho GR, Casati MZ, Nociti FH, Sallum EA. Locally delivered doxycycline as an adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of smokers. A clinical study. *J Periodontol* 2004 75(3): 464-9.
50. Meinberg TA, Barnes CM, Dunning DG, Reinhardt RA. Comparison of conventional periodontal maintenance versus scaling and root planing with subgingival minocycline. *J Periodontol* 2002 Feb; 73(2): 167-72.
51. Mombelli A, Gmur R, Gobbi C, Lang NP. Actinobacillus actinomycetemcomitans in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. *J Periodontol* 1994 Sep; 65(9): 827-34.
52. Mombelli A, Gmur R, Gobbi C, Lang NP. Actinobacillus actinomycetemcomitans in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment. *J Periodontol* 1994 Sep; 65(9): 820-6.
53. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistent patterns of P.gingivalis, P.intermedia/neigrescens, and A.actinomycetemcomitans after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* 2000 71: 14-21.

54. Morrison SL, Cobb CM, Kazakos GM, Killoy WJ. Root surface characteristics associated with subgingival placement of monolithic tetracycline-impregnated fibers. *J Periodontol* 1992 Feb; 63(2): 137-43.
55. Muhlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding - a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta* 1971 Oct; 15(2): 107-13.
56. Nair P, Sutherland G, Palmer RM, Wilson RF, Scott DA. Gingival bleeding on probing increases after quitting smoking. *J Clin Periodontol* 2003 30(5): 435-7.
57. Newman MG, Kornman KS, Doherty FM. A 6-month multi-center evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planing in maintenance patients: clinical results. *J Periodontol* 1994 Jul; 65(7): 685-91.
58. Oringer RJ, Al-Shammari KF, Aldredge WA, Iacono VJ, Rever RM, Wang H *et al.* Effects of locally delivered minocycline microspheres on markers of bone resorption. *J Periodontol* 2002, 73: 835-42.
59. Palmer RM, Matthews JP, Wilson RF. Non-surgical periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol* 1999 Mar; 26(3): 158-63.
60. Paquette D, Oringer R, Lessem J, Offenbacher S, Genco R, Persson GR *et al.* Locally delivered minocycline microspheres for the treatment of periodontitis in smokers. *J Clin Periodontol.* 2003 Sep; 30(9): 787-94.
61. Polson AM, Garrett S, Stoller NH, Bandt CL, Hanes PJ, Killoy WJ *et al.* Multicenter comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis (I). Study design, procedures, and management. *J Periodontol* 1997 Feb; 68(2): 110-8.
62. Polson AM, Garrett S, Stoller NH, Bandt CL, Hanes PJ, Killoy WJ *et al.* Multicenter comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis (II). Clinical results. *J periodontal* 1997 Feb; 68(2): 119-26.

63. Polson AM, Southard L, Dunn RL, Yewey GL, Godowski KC, Polson AP *et al.* Periodontal pocket treatment in beagle dogs using subgingival doxycycline from a biodegradable system.I.Initial clinical responses. *J Periodontol.* 1996 Nov; 67(11): 1176-84.
64. Radvar M, Pourtaghi N, Kinane DF. Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol* 1996 Sep; 67(9): 860-5.
65. Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000* 1996 Feb; 10: 139-59.
66. Rawal SY, Rawal YB. Non-antimicrobial properties of tetracyclines-dental and medical implications. *West Indian Med* 2001 Jun; 50(2): 105-8.
67. Rosling B, Hellstrom MK, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J. The use of PVP-Iodine as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001 Nov; 28(11): 1023-31.
68. Ryder MI, Fujitaki R, Johnson G, Hyun W. Alterations of neutrophil oxidative burst by in vitro smoking exposure: Implications for oral and systemic diseases. *Ann Periodontol* 1998 Jul; 3(1): 76-87.
69. Ryder MI, Pons B, Adams D, Baiswanger B, Blanco V, Bogle G *et al.*. Effects of smoking on local delivery of controlled-release doxycycline as compared to scaling and root planning. *J Clin Periodontol* 1999 Oct; 26(10): 683-91.
70. Salvi GE, Mombelli A, Mayfield L, Rutar A, Suvan J, Garrett S, Lang NP. Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. *J Clin Periodontol.* 2002 Jun; 29(6): 540-50.
71. Sato K, Yoneyama T, Okamoto H, Dahlén G, Lindhe J. The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 1993 20: 359-65.
72. Serino G, Rosling B, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J *et al.* Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001 Oct; 28(10): 910-6.

73. Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE. *Treponema denticola* and *porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J Periodontol*. 1992 Apr; 63 (4): 270-73.
74. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 304-7.
75. Slots J, Rams TE. Antibiotics in Periodontal Therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol* 1990 Aug; 17(7(Pt 2)): 479-93.
76. Socrasky SS, Haffajee AD. Dental Biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*. 2002 28: 12-55.
77. Solskone WA, Heasman PA, Stabholz M, Newman HN. Sustained local delivery of chlorhexidine in the treatment of periodontitis. A multi-center study. *J Periodontol* 1997 Jan; 68(1): 32-8.
78. Stelzel M, Flores-de-Jacoby L. Topical metronidazole application in recall patients. Long-term results. *J Clin Periodontol* 1997 Dec; 24(12): 914-9.
79. Stoller NH, Johnson LR, Trapnell S, Harrold CQ, Garrett S. The pharmacokinetic profile of a biodegradable controlled-release delivery system containing doxycycline compared to systemically delivered doxycycline in gingival crevicular fluid, saliva and serum. *J Periodontol* 1998 Oct; 69(10): 1085-91.
80. Stoltze K. Concentration of metronidazole in periodontal pockets after application of metronidazole 25% dental gel. *J Clin Periodontol* 1992 Oct; 19(9 Pt 2): 698-701.
81. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res*. 1966; 1: 1-13.
82. Tomasi C, Wennstrom JL. Locally delivered doxycycline improves the healing following non-surgical periodontal therapy in smokers. *J Clin Periodontol* 2004 31: 589-95.

83. van Steenberghe D, Rosling B, Soder PO, Landry RG, van der Velden U, Timmerman MF *et al.*. A 15-month evaluation of the effects of repeated subgingival minocycline in chronic adult periodontitis. *J Periodontol.* 1999 Jun; 70(6): 657-67.
84. Walker CB, Godowski KC, Borden L, Lennon J, Nango S, Stone C, *et al.* The effects of sustained release doxycycline on the anaerobic flora and antibiotic-resistant patterns in subgingival plaque and saliva. *J Periodontol.* 2000 May; 71(5): 768-74
85. Walker CB, Sedlacek M, Nangó S, Gollwitzer J. An in vitro biofilm model of subgingival plaque [abstract 1450]. *J Dent Res* 2002: 81: 90.
86. Walker SL, Ash MM. A study of scaling and root planning by scanning electron microscopy. *Dent Hyg* 1976 Mar; 50(3): 109 -14.
87. Weisburg WG, Barns, SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991. Jan; 173(2): 697-703.
88. Wennstrom JL, Heijl L, Dahlen G, Grondahl K. Periodic subgingival antimicrobial irrigation of periodontal pockets. (I). Clinical observations. *J Clin Periodontol* 1987 Oct; 14(9): 541-50.
89. Wennstrom JL, Newman HN, MacNeill SR, Killoy WJ, Griffiths GS, Gillam DG *et al.* Utilisation of locally delivered doxycycline in non-surgical treatment of chronic periodontitis. A comparative multi-center trial of 2 treatment approaches. *J Clin Periodontol* 2001 Aug; 28(8): 753-61.
90. Wennstrom JL. Rising, Irrigation and sustained local delivery. *In: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> European workshop on periodontology.* Berlin: Quintessence books, 1997. p.131.
91. Williams RC, Paquette DW, Offenbacher S, Adams DF, Armitage GC, Bray K *et al.*. Treatment of periodontitis by local administration of minocycline microspheres: a controlled trial. *J Periodontol.* 2001 Nov; 72(11): 1535-44.
92. Yeom HR, Park YJ, Lee SJ, Rhyu IC, Chung CP, Nisengard RJ. Clinical and microbiological effects of minocycline-loaded microcapsules in adult periodontitis. *J Periodontol* 1997 Nov; 68(11): 1102-9.



UNICAMP



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

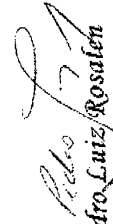
**CERTIFICADO**

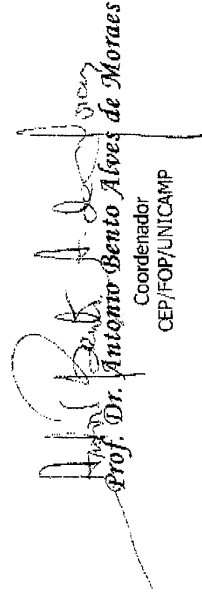
Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação clínica do uso da doxiciclina local como adjuvante à terapia periodontal de suporte em pacientes fumantes. Estudo longitudinal de 2 anos", sob o protocolo nº **028/2001**, da Pesquisadora **LUCIANA MACHION**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **Emilson Antonio Sallum**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - FOP.

Piracicaba, 22 de maio de 2003

We certify that the research project with title "Clinical evaluation of local doxycycline as adjunct to scaling and root planing in periodontal maintenance of smokers. A 2-year follow-up study", protocol nº **028/2001**, by Researcher **LUCIANA MACHION**, responsibility by Prof. Dr. **Emilson Antonio Sallum**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, May 22 2003

  
Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

  
Prof. Dr. **Antonio Bento Alves de Moraes**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

