



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de



Joseane Maria Dias Bosco

*Estudo longitudinal da terapia antibiótica
local de bolsas periodontais residuais.
Análise clínica e microbiológica*

ARARAQUARA

2007



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de



Joseane Maria Dias Bosco

*Estudo longitudinal da terapia antibiótica
local de bolsas periodontais residuais.
Análise clínica e microbiológica*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de **DOUTOR** em Periodontia.

Orientadora:

Prof^ª Dr^ª Rosemary Adriana C. Marcantonio

Co-Orientadora:

Prof^ª Dr^ª Denise M. Palomari Spolidorio

ARARAQUARA

2007

JOSEANE MARIA DIAS BOSCO

ESTUDO LONGITUDINAL DA TERAPIA ANTIBIÓTICA LOCAL DE
BOLSAS PERIODONTAIS RESIDUAIS. ANÁLISE CLÍNICA E
MICROBIOLÓGICA

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de Doutor:

Presidente e orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana C.Marcantonio

2º examinador: Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana

3º examinador: Prof. Dr. José Roberto Cortelli

4º examinador: Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador

5º examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Peres Orrico

Araraquara, 12 de fevereiro de 2007.

(data da defesa)

Dados Curriculares

Joseane Maria Dias Bosco

Nascimento	30 de novembro de 1978- Bauru- SP
Filiação	Alvaro Francisco Bosco Thereza Fátima Dias Bosco
1997-2000	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP
2001-2003	Pós-graduação em Periodontia- Nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP
2003-2007	Pós-graduação em Periodontia- Nível de Doutorado Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP

Dedicatória

Ao meu marido Milton

Meu amor,

Você apareceu num momento muito especial durante esta fase da minha vida e tornou tudo mais leve e feliz!

Obrigada por todo o imenso amor que tem por mim, pelo carinho quando eu brigava comigo mesma... e só você pra entender, me dando muito apoio, sempre enxergando uma saída e fazendo tudo se tornar mais fácil!

Te amo muito!!!

Aos meus pais Alvaro e Thereza

Vocês são os eternos orientadores da minha formação pessoal e profissional! Obrigada por todo amor, compreensão e incentivo, não medindo esforços em todas as etapas da minha vida! Por enxergarem muito antes este momento e por acreditarem e confiarem em mim!

Amo vocês!!!

Aos meus irmãos Alvaro Alexandre e Juliane

Aos meus avós Antônio e Joeliza

Maria Helena e Otávio (“in memorian”)

Aos meus tios e primos, especialmente Cida, Ana Laura,

Guilherme e Gustavo

Mesmo com a distância, vocês estiveram presentes em todas as minhas conquistas, torcendo muito e fazendo a minha vida mais feliz!!!

Obrigada pelas orações, pelo carinho e pelo apoio...

À minha nova família: Milton, Íris, Rafael, Valdir e Ivani

Por todo o carinho com que me receberam em sua família, pelo apoio, incentivo, compreensão e convivência!

Agradecimentos Especiais

A Deus

Que me proporcionou força e serenidade necessárias em todas as etapas desta pesquisa e por toda a minha vida.

Agradeço pelas oportunidades e privilégios que tenho e por possibilitar-me escolher e alcançar objetivos que qualificam minha profissão num crescente aperfeiçoamento!

Às minhas orientadoras

Rosemary Adriana Chierici Marcantonio e

Denise Madalena Palomari Spolidorio

Pela atenção, confiança e disponibilidade! Cada uma a seu tempo contribuiu de forma especial com o meu crescimento científico, acadêmico e pessoal!

Agradeço a dedicação de vocês como orientadoras e pela maneira compreensiva com a qual sempre me atenderam!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara- Unesp**, na pessoa de sua Diretora, **Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio** e Vice-Diretor, **Dr. José Cláudio Martins Segala**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós- Graduação- área de Periodontia **Dr. Carlos Rossa Junior**, pelo empenho e respeito que conduz suas atividades.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba- Unesp**, na pessoa de seu Diretor, **Dr. Paulo Roberto Botacin** e Vice-Diretor **Dr. Célio Percinoto**, assim como os professores de Periodontia **Dr. Valdir Gouveia Garcia** e **Dr. Alvaro Francisco Bosco**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa no campus de Araçatuba.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- **Fapesp** e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- **CNPq** pelo apoio financeiro.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia e de outras que se dedicaram às disciplinas durante o curso de Doutorado: Dr. Ary dos Santos Pinto, Dr. Benedito Egbert Corrêa de Toledo, Dr. Carlos Rossa Junior, Dr. Carlos Alberto De Souza Costa, Dr. Carlos Benatti Neto, Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, Dr. Elcio Marcantonio Junior, Dra. Glória Maria Thompson Galli, Dr. Joni Augusto Cirelli, Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Dr. José Vanderlei Menani, Dr. Laurival Antonio De Luca Jr., Dr. Luís Carlos Spolidorio, Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli, Dra. Mirian Aparecida

Onofre, Dr. Maurício Tatsuei Sakima, Dra. Mônica Da Costa Serra, Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, Dra. Silvana Regina Perez Orrico. Pela excelente formação e extrema competência, pela disponibilidade e convivência tanto nas salas de aula quanto nos corredores e por contribuírem de maneira especial com a minha formação profissional.

Ao **Dr. José Vanderlei Menani** pelo carinho que me recebeu, pela colaboração e direcionamento na fase inicial de metodologia deste trabalho.

À **Dra. Glória Maria Thompson Galli**, pelo respeito, profissionalismo e atenção dedicados no laboratório.

À **Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga** por ceder seu espaço no Laboratório de Genética Molecular para que eu pudesse finalizar as análises microbiológicas.

Aos meus amigos de turma de Doutorado: **Carla Fontana, Ana Emília Pontes e Carlos Nassar (Cacá)** pela convivência harmoniosa, pela amizade sincera, pelo apoio e carinho. A nossa pequena turma foi especial!!!

Aos amigos de Mestrado, Doutorado e Estagiários: **Milton, Gabriela, Rafael Sartori, Rafael Faeda, Dani Zandim, Maurício, Débora, Denise, Rafaela, Fábio, Dani Spirandelli, Eduardo Ishi, Fernanda Bello, Andréa, Fernando, Juliana Moraes, Juliana Rico, Patrícia, Vanessa, Terezinha, Andréa Marcacini, Rubens, Emileine**, o convívio com cada um de vocês me fez uma pessoa mais feliz!

À amiga **Beatriz Lopes** que me recebeu em Araraquara, sempre com muita atenção e principalmente carinho. Obrigada pela sua disponibilidade em me ajudar em todas as fases desta pesquisa: clínica, laboratório e estatística!

À amiga **Juliana Rico** que me ajudou sempre, arrumando um tempinho pra todas as minhas dúvidas no laboratório e nos intermináveis relatórios! Obrigada de coração!

Aos grandes amigos especiais: **Milton** (meu marido lindo), **Rafael Sartori** (meu padrinho querido), **Rafael Faeda**, **Maurício**, **Carla**, **Gabi** (minha madrinha querida) e **Emileine**, por ficarem muitas vezes me ajudando, ou principalmente, me fazendo companhia na clínica enquanto eu atendia ou esperava tantos pacientes... Obrigada pelas risadas, vocês não imaginam como me faziam bem...

Aos funcionários e amigos da Disciplina de Periodontia e do Laboratório de Microbiologia, especialmente: **Carina**, **Cláudia**, **Maria do Rosário**, **Maria José**, **Regina Lúcia** e **Teresinha** pelo imenso carinho durante a nossa convivência, pela dedicação, paciência e atenção com os pacientes e principalmente pelos sorrisos!

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação: **Mara**, **Rosângela**, **José Alexandre e Flávia**, pela gentileza com que sempre me receberam, paciência, competência e por resolverem tantas dúvidas!

A todos os funcionários desta faculdade, em especial aos funcionários da Biblioteca **Maria Helena**, **Marley**, **Eliane**, **Odete**, **Adriano**, **Eliane**, **Maria Inês**, **Silvia Helena** e **Ceres**, pela atenção e excelente revisão bibliográfica.

Aos **pacientes** que colaboraram com a pesquisa, disponibilizando seus tempos para coletas e análises e que com carinho compreenderam meu desafio e dividiram esta responsabilidade comigo!

Epigrafe

“Nada de esplêndido jamais foi realizado, exceto por aqueles que ousaram acreditar que algo dentro deles era superior às circunstâncias.”

Bruce Barton

Sumário

Resumo	15
Abstract	17
1 Introdução	19
2 Proposição	22
3 Material e método	23
3.1 Cálculo da amostra.....	23
3.2 Seleção da amostra.....	23
3.3 Delineamento do estudo.....	25
3.3.1 Exame clínico inicial e tratamento.....	25
3.3.2 Reavaliação.....	26
3.3.3 Coleta do fluido crevicular.....	28
3.3.4 Exame clínico (baseline).....	28
3.3.5 Retratamento.....	29
3.3.6 Análise microbiológica.....	32
3.3.6.1 Seleção e síntese dos oligonucleotídeos.....	32
3.3.6.2 Preparo das amostras.....	33
3.3.6.3 Eletroforese.....	35
3.3.7 Análise estatística.....	36

3.3.7.1 Avaliação prospectiva.....	37
3.3.7.2 Avaliação longitudinal.....	37
4 Capítulos.....	39
4.1 Capítulo 1.....	39
4.2 Capítulo 2.....	68
5 Considerações finais.....	99
6 Conclusão.....	105
7 Referências.....	106
8 Anexos.....	115
8.1 Aprovação do Comitê de Ética.....	115
8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido I.....	116
8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido II.....	118

Bosco JMD. Estudo longitudinal da terapia antibiótica local de bolsas periodontais residuais. Análise clínica e microbiológica [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Resumo

Objetivos: Dois estudos controlados cegos aleatórios foram realizados para avaliar os resultados clínicos e microbiológicos iniciais e a longo prazo, da tetraciclina aplicada com o microbrush no tratamento de sítios com bolsa periodontal persistente ≥ 5 mm e sangramento à sondagem, tratados previamente por raspagem e alisamento radicular (RAR).

Material e método: Quarenta e dois pacientes com pelo menos 4 dentes com bolsas periodontais ≥ 5 mm e sangramento à sondagem foram divididos em 2 grandes grupos: tetraciclina e controle. Nos grupos tetraciclina, dois dentes receberam aplicação de solução de cloridrato de tetraciclina (100mg/mL) com microbrush uma vez por semana por 4 semanas (grupo T) e os outros dois dentes receberam o mesmo tratamento associado a uma sessão de RAR na primeira consulta (grupo RAR+T). Nos grupos controle, dois dentes receberam uma sessão de RAR (grupo RAR) e outros dois dentes receberam aplicação de solução salina com microbrush uma vez por semana por 4 semanas associada a uma sessão de RAR na primeira consulta (grupo RAR+S). Medidas clínicas de índice de placa visível (IP), índice de sangramento gengival

(IG), sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC), recessão gengival (RG), e coletas microbiológicas para identificação das bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivais*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, e *Treponema denticola* foram tomadas no baseline, 30, 90 e 180 dias após o tratamento. Amostras de biofilme subgengival foram analisadas por reação de polimerase em cadeia. **Resultados:** Todas as terapias resultaram em melhora na PS, NIC e SS, embora as diferenças clínicas entre os grupos não tenham alcançado significância estatística. Aos 30 dias após a terapia, a prevalência de *P. gingivalis* foi significativamente reduzida nos grupos que receberam RAR somada à terapia adicional (soro ou tetraciclina) e apenas nos grupos tetraciclina *T. forsythia* foi significativamente reduzido. Aos 6 meses *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* foram significativamente reduzidos apenas nos grupos tetraciclina. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo sugerem que a solução de tetraciclina aplicada com o microbrush pode ser uma alternativa para o tratamento de bolsas periodontais persistentes com benefícios microbiológicos adicionais.

Palavras-chave: Doença periodontal/ microbiologia; quimioterapia; tetraciclina/ uso terapêutico.

Bosco JMD. Longitudinal study of local antibiotic therapy for persistent periodontal pockets. A clinical and microbiological analysis. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Abstract

Objectives: Two randomized controlled single-blind studies were carried out to evaluate the initial and the long term clinical and microbiological results of tetracycline applied with a microbrush in treatment of sites with persistent periodontal pockets ≥ 5 mm and bleeding on probing previous treated by scaling and root planning (SRP). **Methods:** For each patient in the test groups, two teeth received 4 applications of tetracycline solution (100mg/ml) with a microbrush once a week (T group) while the other two teeth received the same treatment plus one session of SRP at the first appointment (SRP+T group). For each patient in the control groups, two teeth received one session of SRP (SRP group) and the other two received 4 applications of saline with a microbrush once a week plus one session of SRP (SRP+S group). Clinical measurements were taken at baseline, 30, 90 and 180 days after last treatment. Subgingival biofilme samples were analyzed by polymerase chain reaction for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivais*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, e *Treponema denticola* identification. **Results:** All

therapies provided significant improvement in probing depth, clinical attachment level and bleeding on probing, although the clinical difference did not reach statistical significance. At 1 month post-therapy the prevalence of *P. gingivalis* was significantly reduced in groups that received SRP plus additional therapy and *T. forsythia* was significantly reduced in only test groups. Until 6 months *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, and *A. actinomycetemcomitans* significantly decrease in prevalence only for tetracycline groups. **Conclusion:** The results of the present study suggest that tetracycline solution applied with a microbrush may be an alternative in management of persistent periodontal pockets with further microbiologic benefits.

Keywords: Periodontal disease/ microbiology; quimiotherapy; tetracycline/ therapeutic use.

1 Introdução

Pesquisas clínicas consagraram a raspagem e o alisamento radicular (RAR), em conjunto com o controle de biofilme realizado pelo paciente como tratamento de escolha para a maioria dos tipos de doença periodontal. Este procedimento tem mostrado bons resultados na melhora dos parâmetros clínicos, seguintes à diminuição na presença de microrganismos patogênicos, especialmente *P. gingivalis* e *T. forsythia*^{12,13,23,28,29,32,42,48} Alguns estudos, no entanto, sugerem que a instrumentação mecânica resulta em uma mudança modesta e transitória na composição da microbiota patogênica periodontal,^{10,34,44,48,50,52} especialmente em sítios profundos.^{17,48,52}

A contagem das bolsas periodontais residuais, ou persistentes, após a fase de tratamento periodontal ativo de RAR, representa, até certo ponto, o grau de sucesso alcançado após o tratamento e deve ser avaliada antes do paciente entrar na fase de terapia de suporte ou manutenção. A presença de bolsas periodontais residuais refletirá a existência de nichos ecológicos nos quais reinfecções poderão ocorrer. Foi demonstrado que a persistência de bactérias subgingivais específicas como *P. gingivalis*, *T. denticola* e *A. actinomycetemcomitans* está associada à resposta insuficiente ao tratamento de RAR.^{10,17,24,25} De acordo com o estudo de Renvert, Persson⁴³ (2002) bolsas periodontais residuais são preditivas para a progressão da doença periodontal,

portanto medidas adicionais para o tratamento de bolsas periodontais residuais devem ser avaliadas.^{23,41,53}

A percepção da doença periodontal como sítio-específica levou ao desenvolvimento de meios para distribuir antimicrobianos aos sítios com infecção, direto e localmente, o que poderia superar as deficiências da terapia mecânica. No entanto, poucos estudos têm avaliado os sistemas de liberação local de drogas em sítios que responderam insuficientemente ou que mostraram recorrência da doença após RAR, uma área potencialmente valiosa de aplicação desses sistemas.^{1,11,31,27,38,39,41,45,53}

A tetraciclina é uma das drogas mais utilizadas em Odontologia, especialmente na área da periodontia, principalmente pela sua atividade sobre bactérias Gram negativas.⁴⁷ Esta droga tem sido tipicamente usada como antibiótico de amplo espectro, entretanto foram encontradas aplicações “não-antibióticas” de interesse para a área odontológica, que incluem ação antiinflamatória,^{16,18} inibição de colagenases,⁴⁷ inibição da reabsorção óssea^{20,21} e promoção da adesão de fibroblastos e tecido conjuntivo às superfícies radiculares.⁵¹

O modo de aplicação deste antibiótico localmente, no entanto, tem gerado controvérsias. A tetraciclina impregnada em fibras tem demonstrado atividade antimicrobiana contra a microbiota subgengival^{40,54} assim como habilidade em melhorar resultados clínicos^{31,54} e reduzir a recorrência da doença periodontal.³⁵ Contudo,

este tipo de aplicação apresenta dificuldades técnicas, maior tempo de trabalho, risco das fibras se deslocarem, além do alto custo. Já a aplicação em forma de irrigação de solução de cloridrato de tetraciclina tem mostrado, *in vitro*, remover a smear layer, causar uma desmineralização superficial, adsorver à dentina e ser liberada lentamente em uma concentração bacteriostática para a maioria dos periodontopatógenos.^{5,54,55} Portanto, a superfície radicular pode vir a constituir um verdadeiro sistema de liberação lenta da droga, aumentando sua biodisponibilidade por semanas.¹¹ Entretanto, o rápido fluxo do fluido crevicular em sítios inflamados diminui a eficiência deste método.

A utilização do microbrush é uma alternativa de aplicação da solução de tetraciclina por toda a bolsa periodontal por ser um sistema capaz de debridar a superfície subgingival sem remover o cemento periodontalmente envolvido e ao mesmo tempo levar o antibiótico até o fundo da bolsa periodontal.⁷

2 Proposição

O objetivo do presente estudo controlado, cego e aleatório foi avaliar, longitudinalmente, a terapia antibiótica local com solução de cloridrato de tetraciclina (100mg/mL) aplicada com microbrush, em bolsas periodontais residuais de pacientes portadores de periodontite crônica, por meio de parâmetros clínicos e microbiológicos.

3 Material e método

3.1 Cálculo da amostra

O cálculo da amostra foi baseado nos dados publicados em estudo prévio recente com fibras de tetraciclina.¹ Foi determinada uma diferença clínica relevante, para a redução na variável profundidade de sondagem antes e após os tratamentos, de 1,2 mm. Portanto, a diferença padronizada em 0,8 ($1-\beta=0,8$) e $\alpha=0,05$ determinou uma amostra de pelo menos 15 pacientes para receber cada tratamento.

3.2 Seleção da amostra

Aproximadamente 200 indivíduos foram examinados para compor a amostra do presente estudo. Foram selecionados, inicialmente, 60 pacientes que procuraram a Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP e a Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP (entre maio de 2003 e julho de 2005) para tratamento de periodontite crônica avançada³ e que se enquadraram nos seguintes critérios de inclusão:

- idade entre 25 e 60 anos;
- boas condições de saúde geral;
- ausência de qualquer alteração sistêmica que interferisse

com a progressão da doença periodontal ou que necessitassem de antibioticoterapia profilática;

- história negativa de antibioticoterapia nos três meses antecedentes ao estudo, ou durante o mesmo;
- história negativa de alergia à tetraciclina;
- história negativa de terapia com antiinflamatórios esteróides ou não-esteróides nos três meses antecedentes ao estudo, ou durante o mesmo;
- história negativa de gestação;
- história negativa de fumo;
- presença de, no mínimo, quatro sítios periodontais com profundidade de sondagem maior que 6 mm e perda de inserção maior que 4 mm com sangramento à sondagem, em dentes livres de cáries ou próteses (Figura 1).



FIGURA 1- Diagnóstico de periodontite crônica.

Foram respeitados também os seguintes critérios de exclusão:

- pacientes que houvessem recebido tratamento periodontal há menos de um ano;
- pacientes ex-fumantes;
- pacientes que necessitaram de prescrição de antibióticos ou antiinflamatórios, hormônios ou quaisquer outros medicamentos que interferissem no resultado da pesquisa, durante o período do estudo;
- pacientes que não puderam comparecer aos retornos.

3.3 Delineamento do estudo

Esse estudo foi desenvolvido como um ensaio clínico aleatório cego controlado.

3.3.1 Exame clínico inicial e tratamento

As medidas de profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS) foram realizadas por um único examinador, previamente treinado, utilizando-se uma sonda periodontal computadorizada de pressão controlada (Florida Probe[®]). O sangramento à sondagem foi determinado pela presença (1) ou ausência (0) de sangramento observado durante 30 segundos após a inserção da sonda na bolsa periodontal.

Os pacientes foram submetidos aos procedimentos de raspagem supra e subgingival de toda a arcada dentária, sendo um quadrante por semana, sob anestesia local e instrumentação manual com curetas, com duração de 45 a 60 minutos por quadrante. Os pacientes também foram instruídos e motivados quanto à higienização bucal correta por meio de ensino da técnica de escovação (método de Bass) e fio dental. O tratamento foi realizado pelo examinador, profissional especialista em Periodontia, e estava completo em aproximadamente 4 semanas. Foi realizado ainda o controle de biofilme supragengival (fase de manutenção) semanalmente durante o primeiro mês e, nos 5 meses seguintes, o controle passou a ser realizado mensalmente, pelo mesmo profissional.

3.3.2 Reavaliação

Após três meses dos procedimentos de raspagem e controle de biofilme supragengival, os pacientes foram reavaliados quanto à presença de pelo menos 4 dentes com bolsas periodontais residuais caracterizadas como possuindo PS \geq 5 mm e SS.^{1,27,31,41,45} Dos 60 pacientes previamente atendidos, 18 foram excluídos do estudo pelos seguintes motivos: desinteresse ou não possibilidade de comparecer aos retornos, doença sistêmica posterior ao início da pesquisa com

prescrição de antiinflamatório ou antibiótico e não necessidade de retratamento.

Os 42 pacientes selecionados para o estudo confirmaram sua aceitação mediante a assinatura de um dos Termos de Consentimento (Anexos 2 e 3), previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP (Processo n.33/03-Anexo 1).

Identificados os 4 dentes com bolsas periodontais residuais, foram determinados os sítios mais profundos de cada dente para serem avaliados durante o tratamento. Exames clínicos e microbiológicos das bolsas periodontais residuais foram realizados pelo mesmo examinador, como descritos nos itens seguintes.

Foram realizadas moldagens das arcadas dentais em alginato que incluíram os sítios selecionados para o estudo. Essas moldagens foram, então, vazadas em gesso-pedra e sobre esses modelos, foram confeccionados guias, utilizando-se biofilmes de polipropileno de 1,0 mm de espessura, prensadas em aparelho a vácuo*. Estes guias tiveram por objetivo padronizar o posicionamento da sonda periodontal computadorizada durante a realização dos exames de profundidade de sondagem.

* Bio-Art® Equipamentos Odontológicos, São Paulo/SP – Brasil

3.3.3 Coleta do fluido crevicular

Primeiramente, foram realizados os exames clínicos de IP e IS (conforme descritos no item 3.3.4) e posteriormente a coleta de fluido crevicular para o exame microbiológico. Cada sítio foi, então, isolado com rolos de algodão estéreis e gentilmente secos com jato de ar. Caso houvesse biofilme supragengival visível, este era removido com curetas. Um cone de papel absorvente estéril* (nº 35) foi introduzido na base da bolsa periodontal até que certa resistência fosse sentida, permanecendo no local por 30 segundos.²⁶ Após a remoção, o cone de papel absorvente foi colocado em tubos *ependorf* estéreis contendo 500 µl de solução de Ringer⁴⁹ (Quadro 1) e imediatamente congelados em freezer à -20°C.

Quadro 1 – Composição da solução de Ringer

Água destilada	1000mL
Cloreto de sódio	8,6 g
Cloreto de potássio	0,3 g
Cloreto de cálcio diidratado	0,33 g

3.3.4 Exame clínico (baseline)

Todos os exames foram realizados pelo examinador previamente treinado. Foram determinados: índice de biofilme visível (IP)², índice de sangramento gengival (IG)², profundidade de sondagem (PS) e recessão gengival (RG), utilizando-se a Florida Probe[®] (Figura 2), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS) o qual foi determinado

* EndoPoint, Paraíba do Sul, RJ

pela presença (1) ou ausência (0) de sangramento observado durante 30 segundos, após a inserção da sonda na bolsa periodontal. As medidas foram anotadas em ficha própria e guardadas em banco de dados para posterior análise.



FIGURA 2- Exame de profundidade de sondagem padronizado.

3.3.5 Retratamento

Os sítios mais profundos dos 4 dentes com bolsas periodontais residuais dos 42 pacientes foram, então, tratados por 2 profissionais especialistas, diferentes do examinador, através de 4 tratamentos (resumidos na Tabela 1), divididos entre 2 grupos (tetraciclina e controle) compostos por 21 pacientes, sorteados aleatoriamente:

- **Grupo Tetraciclina:** em dois sítios foi aplicada uma solução de 100 mg/mL de cloridrato de tetraciclina* (cápsula de 500 mg de cloridrato de tetraciclina dissolvida em 5 mL de soro fisiológico e filtrada por filtro Millipore® 0,22 µm) embebida em um aplicador microbrush autoclavado, friccionando-o de encontro à raiz do dente (Figura 3), até o

fundo da bolsa, por dois minutos, sendo trocadas a cada 30 segundos⁷. Foram realizadas 4 aplicações, uma por semana (**T**). Em outros dois sítios, foi realizada uma única sessão de raspagem subgengival (**RAR**) com curetas periodontais apropriadas na primeira consulta (Figura 4) e 4 aplicações de tetraciclina da mesma forma já descrita (**RAR+T**). Foi realizado o controle de biofilme supragengival durante quatro semanas consecutivas.

- **Grupo Controle:** em dois sítios, foi realizada uma única sessão de RAR com curetas periodontais apropriadas (**RAR**); e em outros dois sítios, foi realizada uma única sessão de RAR na primeira consulta associada a 4 aplicações semanais de soro fisiológico com microbrush como descrito para grupos anteriores (**RAR+S**). Foi realizado o controle de biofilme supragengival durante quatro semanas consecutivas.

Tabela 1 - Resumo dos tratamentos realizados nos sítios residuais

Grupo	Tratamento	
Tetraciclina	T	Tetraciclina com minibrush
	RAR+T	RAR + Tetraciclina com minibrush
Controle	RAR	RAR
	RAR+S	RAR + Soro com minibrush

* Tetracilin® (Cloridrato de tetraciclina)- Teuto



FIGURA 3- Tratamento com mini-brush.

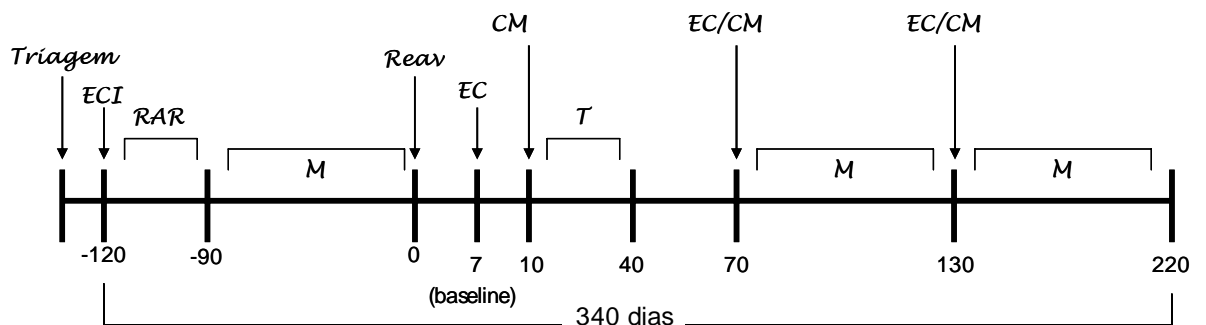


FIGURA 4- Tratamento com RAR.

Após 30, 90 e 180 dias da aplicação inicial do final do tratamento, foram realizados novamente os exames clínicos e as coletas de fluido crevicular, conforme apresentados no fluxograma do estudo (Quadro 2).

Nesse período, até 180 dias, o controle de biofilme supragengival passou a ser realizado mensalmente, ou de acordo com as necessidades do paciente, ou seja, quando apresentavam IP alto. As coletas e manutenções, assim como as análises microbiológicas e imunológicas foram realizadas pelo examinador, cego para os tratamentos.

Quadro 2 – Fluxograma da metodologia aplicada



Legenda: ECI= exame clínico inicial; RAR= raspagem e alisamento radicular (boca toda); M= manutenções mensais; Reav= reavaliação; EC= exame clínico; CM= coleta microbiológica; T= tratamento (T, RAR+T, RAR ou RAR+S).

3.3.6 Análise microbiológica

Para análise microbiológica foi utilizada a reação de polimerase em cadeia (PCR), pela qual se identificou a presença das seguintes bactérias: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*).

Essa técnica baseia-se em reações enzimáticas cíclicas de desnaturação pelo calor, hibridização dos oligonucleotídeos e síntese enzimática de DNA, resultando na amplificação exponencial da seqüência do DNA desejado, permitindo a identificação de seqüências de genes específicos, tais como genes de espécies bacterianas.

3.3.6.1 Seleção e síntese dos oligonucleotídeos

Os pares de oligonucleotídeos (5'- 3'), ou seja, os primers específicos para cada bactéria, foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo- SP. As seqüências utilizadas para as bactérias estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Seqüência de primers utilizados na análise por PCR

Bactéria	Seqüência do primer	Referência
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (593 pb)	5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'	Benkirane et al. ⁶ (1995)
<i>Prevotella intermedia</i> (575 pb)	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TAC ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3'	Ashimoto et al. ⁶ (1996)
<i>Prevotella nigrescens</i> (1100 pb)	5' TTA TGT TAC CCG TTA TGA TGG AAG 3' 5' ATG GCC AAA TAG GAA TGA AAG TTA 3	Guillot, Mouton ²² (1997)
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (557 pb)	5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3' 5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3'	Ashimoto et al. ⁴ (1996)
<i>Tannerella forsythia</i> (641 pb)	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	Ashimoto et al. ⁴ (1996)
<i>Treponema denticola</i> (316 pb)	5' TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T 3' 5' TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA 3'	Ashimoto et al. ⁴ (1996)

Os oligonucleotídeos foram dissolvidos em uma solução de T.E. estéril (10mM Tris HCl- pH 7,6; 1mM EDTA- pH 8,0) em volume calculado para a concentração de 25µM.

3.3.6.2 Preparo das amostras

As amostras contidas nos tubos *ependorf** foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas ao *vortex* por um minuto. Na seqüência, o cone de papel absorvente foi removido com auxílio de uma pinça clínica estéril, comprimindo entre a tampa e o tubo. As amostras

* Fisher Scientific

foram submetidas a banho de fervura por 10 minutos para a extração de DNA bacteriano e, posteriormente, centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. Foram utilizados 100 µL do sobrenadante final.

Para a reação de PCR, foram utilizados tubos tipo *ependorf*, onde foi previamente preparada uma mistura de reagentes, com volume final de 25 µL. Para a bactéria *Treponema denticola*, de acordo com protocolo proposto por Ashimoto et al.⁴ (1996), a solução foi composta de, 1,25 µL de solução tampão (Invitrogen Life Technology, São Paulo/SP, Brasil), 1 µL de Cloreto de Magnésio (Life Technology, São Paulo/SP, Brasil), 0,2 µL de DNTp (Life Technology, São Paulo/SP, Brasil), 0,4 µL do primeiro oligonucleotídeo de uma bactéria específica (25 µM de concentração), 0,4 µL do segundo oligonucleotídeo da mesma bactéria (25 µM de concentração) e 0,15U/ µL de Taq DNA polymerase (Life Technology, São Paulo/SP, Brasil). Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi misturada a 15 µL da solução e, então, submetidas ao aparelho termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Minster/Oh, USA) seguindo a seguinte programação: desnaturação a 95°C por trinta segundos, fase de *annealing* dos oligonucleotídeos a 60°C por um minuto e fase de extensão a 72°C por um minuto. Esta seqüência foi seguida por trinta e seis ciclos finalizando-se a reação a 72°C por dois minutos e mantida a 4°C.

Para as demais bactérias, a solução foi baseada no protocolo de Cesco⁹ (1999), também com volume final de 25 µL. Esta solução foi

composta por: 1,25 μL de solução tampão (Invitrogen Life Technology, São Paulo/SP, Brasil), 1,35 μL de Cloreto de Magnésio (Life Technology, São Paulo/SP, Brasil), 0,8 mM de DNTp mix (Life Technology, São Paulo/SP, Brasil), 2,0 μL do primeiro oligonucleotídeo de uma bactéria específica (25 μM de concentração), 2,0 μL do segundo oligonucleotídeo da mesma bactéria (25 μM de concentração) e 1U/ μL de Taq DNA polymerase (Life Technology, São Paulo/SP, Brasil). Foi obtida uma alíquota de 5,0 μL da amostra das demais bactérias que foi adicionada à mistura de reagentes e submetidas ao aparelho termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Minster/Oh, USA) seguindo a seguinte programação: desnaturação a 95°C por trinta segundos, fase de *annealing* dos oligonucleotídeos a 65°C por um minuto e fase de extensão a 72°C por um minuto. Esta seqüência foi seguida por trinta e seis ciclos finalizando-se a reação a 72°C por dois minutos e mantida a 4°C.

3.3.6.3 Eletroforese

A presença do DNA amplificado foi observada em eletroforese em gel de agarose a 1%, preparado com agarose ultrapura em solução tamponante TBE (tampão tri-borato-EDTA- pH 8,5) associado com 1% Syber Safe.

Para a corrida eletroforética, 22 μ L da solução foram acrescentados de 2,0 μ L de solução corante de azul de bromofenol e homogeneizados. Foram então colocados em canaletas no gel, acondicionado em uma cuba para corrida eletroforética horizontal,* conectada a uma fonte de energia.

Para submersão do gel foi utilizada solução tamponante TBE 1X (tampão Tris-borato-EDTA). As corridas foram submetidas a uma corrente contínua de 72 a 80 volts por duas horas. Após o término da corrida as bandas presentes no gel foram observadas imediatamente com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas diretamente com o auxílio de uma máquina digital. Os resultados foram anotados em ficha específica.

3.3.7 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada considerando-se o sítio como unidade experimental. Os dados das variáveis quantitativas (PS, RG e NI) foram submetidos ao teste de Normalidade de D'Agostino para verificar se os mesmos ajustavam-se a distribuição normal de probabilidades. Foram usados testes estatísticos paramétricos (para comparações entre T e RAR+T ou RAR e RAR+S) e não paramétricos (para comparações entre T e RAR , T e RAR+S ou RAR+T e RAR+S) das variáveis avaliadas neste estudo.

* Cuba Horizon 11.14- Life Technology, São Paulo/SP, Brasil

Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5%. Os dados experimentais foram submetidos à análise estatística, utilizando-se os softwares BioEstat 3.0 e GraphPad adequados e específicos para os diferentes testes.

3.3.7.1 Avaliação prospectiva

Para cada grupo de tratamento nos períodos baseline e 1 mês os dados de PS, NIC e RG foram submetidos ao teste T de Student pareado e para analisar as diferenças entre os tratamentos no mesmo período foram usados ambos: teste de T de Student pareado e não-pareado.

Os dados das variáveis qualitativas (IP, IG, SS e bactérias) foram dicotomizados em presente ou ausente e o teste de McNemar foi usado para cada tratamento no mesmo período e o teste de Fisher e McNemar foram usados para comparações intergrupos.

3.3.7.2 Avaliação longitudinal

Para a avaliação de PS, NIC e RG entre os períodos de avaliação clínica, para cada um dos tratamentos, os dados foram analisados aplicando-se o teste de Análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA). Quando foram encontrados resultados estatisticamente significantes, estes foram submetidos ao teste de Tukey. Na realização da comparação entre os diferentes tratamentos, em cada momento da avaliação, os dados foram analisados aplicando-se o teste

paramétrico T de Student, pareado para os grupos dependentes e não-pareado para os grupos independentes.

Para as variáveis categóricas dicotômicas, na comparação entre os períodos de avaliação clínica, para cada um dos tratamentos, os dados obtidos foram analisados aplicando-se o teste não-paramétrico Q de Cochran. Quando foi encontrado resultado estatisticamente significativo para esse teste, as amostras foram comparadas, duas a duas, utilizando-se o Teste Exato de McNemar.

Na realização da comparação entre os diferentes tratamentos, em cada momento da avaliação, os dados obtidos para as variáveis categóricas dicotômicas foram analisados aplicando-se o teste exato de McNemar (não-paramétrico) para grupos dependentes e teste exato de Fisher (não-paramétrico) para os grupos independentes.

4 Capítulos

4.1 Capítulo 1 - Avaliação prospectiva

Debridement and local application of tetracycline using a microbrush in the management of persistent periodontal pockets.

A prospective study

Submetido para publicação no periódico: Journal of Periodontology

Debridement and local application of tetracycline using a microbrush in the management of persistent periodontal pockets. A prospective study

Joseane M. D. Bosco*, Beatriz M. V. Lopes*, Alvaro F. Bosco† Denise M. P. Spolidorio‡, Rosemary A. C. Marcantonio*

Background: Topical antibiotics may overcome shortcomings of mechanical therapy for localized persistent periodontal pockets. This randomized controlled single-blind study evaluated the efficacy of tetracycline applied with a microbrush in treatment of sites with pockets previously treated by scaling and root planning (SRP).

Methods: Forty-two patients, each with 4 pockets ≥ 5 mm and bleeding on probing (BOP), were randomized into test or control groups. For each patient in the test groups, two teeth received 4 applications of tetracycline solution (100mg/ml) with a microbrush once a week (T group) while the other two teeth received the same treatment plus one session of SRP at the first appointment (SRP+T group). For each patient in the control groups, two teeth received one session of SRP (SRP group) and the other two received 4 applications of saline with a microbrush once a week plus one session of SRP (SRP+S group). Clinical measurements were taken at baseline and 30 days after last treatment. Subgingival plaque samples were analyzed by polymerase chain reaction.

Results: All therapies provided significant improvement in probing depth, clinical attachment level and BOP although the clinical difference did not reach statistical significance. Prevalence of *P. gingivalis* was significantly reduced in groups that received SRP plus an additional therapy and *T. forsythia* was significantly reduced in only test groups.

Conclusions: Tetracycline solution (100mg/ml) applied with a microbrush associated or not with SRP may be an alternative in management of persistent periodontal pockets of chronic periodontitis. *J Periodontol*

KEY WORDS

Tetracycline/therapeutic use; periodontal disease/drug therapy; periodontal pocket/microbiology; Polymerase Chain Reaction; scaling and root planing.

* Department of Periodontology, School of Dentistry, State University of São Paulo, UNESP, Araraquara, S. P., Brazil.

† Department of Periodontology, School of Dentistry, State University of São Paulo, UNESP, Araçatuba, S. P., Brazil

‡ Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, State University of São Paulo, UNESP, Araraquara, S. P., Brazil.

Clinical trials indicate that meticulous scaling and root planing (SRP) associated with plaque control is the treatment of choice for almost all types of periodontitis.¹⁻⁵ However; it may not predictably and completely eliminate the disease.^{3,6} In some patients who are responsive to plaque focused therapy, some affected sites do not stabilize and present a therapeutic problem.^{7,8}

One of the key elements of periodontal therapy to reduce periodontal pocket depth is to achieve a significant reduction of suspected pathogens such as *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*.^{3,4,9,10} Therefore treated periodontal patients require a supportive maintenance care program to keep counts of pathogens at reduced levels and to insure periodontal stability.^{4,12,13} Moreover, it has been shown that successful long-term treatment for moderate to advanced periodontitis is based on SRP every 3 months.¹³⁻¹⁶

It appears that regular SRP may have some adverse effects such as reduction of tooth structure and tooth sensitivity.¹⁷ This explains current emphasis on mechanical disruption of subgingival microbial deposits to produce a biologically clean root surface rather than removal of periodontally involved cementum.^{18,19} The microbrush applicator is similar in size and shape to the periodontal probe and it may be valuable to debride subgingival root surfaces without removing cementum.¹⁸ It is a disposable flexible, hand-held plastic instrument which secures a fine

nylon brush tip for use in applying resins and disclosants during treatment.¹⁸

The localized nature of periodontal infections has encouraged many investigators to search for means to apply drugs locally for therapy. The effects of combining SRP with a number of non-mechanical therapies therefore have been evaluated in studies.²⁰⁻²⁵ However, local antibiotics should act on the biofilm for prolonged periods^{8,26} without risk of side effects that may accompany systemic administration.

Although untreated sites offer the best opportunity to accompany improvements of clinical indices during study, this is not the main therapeutic motivation for local delivery of antimicrobials. Rather, these devices appear to be more useful for sites that fail to respond to therapy, comparable to the need for surgical intervention.²⁷ According to the systematic review by Renvert & Persson (2002),²⁸ residual probing depth is the most important predictive aspect of further disease progression. Therefore, in management of localized persistent pockets after SRP therapy or in the maintenance phase, the adjunctive delivery of topical antibiotics in periodontal pockets could overcome shortcomings of mechanical therapy.^{21,26,27,29-36}

Local subgingival tetracycline delivery by fibers is under extensive investigation.^{25-27,29,31,37,38} Relatively high concentrations of antibiotic were detected in the gingival crevicular fluid for the 10 days during which the fiber was present in the pocket. Other local delivery methods for

tetracycline have been studied including an acrylic resin delivery system,²⁰ resorbable collagen film,³⁹ resorbable polymer microencapsulation system⁴⁰ and extensive irrigation.^{21, 32} In view of the technical difficulties of applying antibiotics throughout the entire periodontal pocket with these commercial delivery controlled release devices as well their high price and the rapid outflow of the gingival crevicular fluid, dental practitioners preferring topical tetracycline should consider less expensive alternatives.²¹

This randomized controlled single-blind study evaluated the initial clinical and microbiological efficacy of tetracycline-HCl solution (100mg/ml) applied with a microbrush for treatment of sites with persistent periodontal pockets.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This was a double center, randomized controlled single-blind study to evaluate the efficacy of tetracycline solution (TTC-HCl)[∞] applied with a microbrush for treatment sites with persistent periodontal pockets following initial periodontal therapy. This study was approved by the Ethical Committee of the Araraquara School of Dentistry (Proc. 33/03). Subjects for this study were recruited for therapy of chronic periodontal disease at the State of São Paulo University, School of Dentistry at Araraquara and

[∞] Tetracline® - Teuto- Anápolis, GO, Brazil

School of Dentistry at Araçatuba. They had received full mouth SRP, one quadrant treated each week under local anesthesia, three months prior to baseline examination. Approximately 45-60 min was necessary to treat each quadrant. Patients were instructed on proper home care procedures which were reiterated at each treatment.

Inclusion and exclusion criteria

The subjects included met the following criteria: between 25 and 60 years of age, at least 4 non-adjacent teeth with residual pockets at least 5mm depth and bleeding on probing. Exclusion criteria were: a smoking habit, pregnancy, lactation, medical condition such as diabetes or hepatitis, use of antibiotic in the previous three months, allergy to tetracycline or failure to attend treatment or examination. Because of possible complications, teeth were excluded when pocket depth extended to the apex.

Power and sample size

Calculations were based upon published data from an earlier study of residual pockets.³⁶ The clinically relevant difference for reduction in the primary outcome variable (PD) between treatments was set at 1.2 mm. Thus, the standardized difference =0.8, (1- β =0.8) and α =0.05 resulted in a minimum number of 15 patients for each treatment.

After qualifying for study, 42 patients (25 women and 17 men), aged 40 ± 6.7 years, were randomly divided into test and control groups of 21 each.

Treatment

Each patient in the test group received 4 applications of TTC-HCl with a microbrush,* once a week (T group), in two non-adjacent teeth and the other two non-adjacent teeth received the same treatment plus one session of SRP at the first appointment (SRP+T group). Each patient in the control group received one session of SRP at the first appointment (SRP group), in two non-adjacent teeth and the other two teeth received 4 applications of saline with microbrush once a week plus one session of SRP at the first appointment (SRP+S group). All treatments were carried out by two experienced operators who were periodontal specialists (B.M.V.L. and A.F.B.) different from the examiner (J.M.D.B.). During the treatment phase, professional biofilm control was performed weekly.

Tetracycline solution was prepared by dissolving 500mg of tetracycline chloridrate[∞] in 5ml of sterile saline solution. After solubilization, 3ml of the solution were aspirated by a 0.22 μ m Millipore filter[Ⓔ] for solution sterilization.

* Microbrush® International, WI, United States. Fine Model

∞ Tetraclin® - Teuto- Anápolis, GO, Brazil

Ⓔ Millipore® - São Paulo, SP, Brazil

An autoclaved microbrush was used to debride the subgingival root surface by rubbing vigorously for 2 minutes from gingival margin to the bottom of the pocket.¹⁸ Every 30 seconds the microbrush was dipped in the tetracycline solution for test groups or saline for control groups.

Evaluation of treatment effect

Clinical parameters were assessed and microbial samples were taken by an investigator who was not involved in the treatment and who was unaware of the treatment provided. Clinical and microbiological parameters were recorded at baseline, before the experimental treatment and after the last treatment at 30 days. Alginate impressions were taken and occlusal acrylic stents were prepared for clinical measurements of the sites selected. Periodontal examination included the recording of probing depth (PD) and gingival recession (GR) with an electronic probe,^{*} assessed visible plaque index (PI),⁴¹ gingival bleeding index (BI),⁴¹ as well as the clinical attachment level (CAL) and bleeding on probing (BOP) within 30 seconds.

Subgingival microbiota was sampled following register of PI and GI. Visible supragingival plaque was removed using scalers and the sites were isolated with cotton rolls and gently air-dried. Subgingival plaque samples were collected with a sterile paper point reaching the bottom of the pocket and kept in place for 30 seconds.⁴² The paper point was

^{*} Florida Probe, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA

immediately placed in sterile *Eppendorf* vials containing 500µl of a pre-reduced anaerobically sterilized Ringer's solution and stored at -20 °C prior to polymerase chain reaction identification of *A. actinomycetemcomitnas*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsyntensis*, *T. denticola* and *P. nigrescens*.

At the baseline visit before treatment and after the last treatment at 30 days, clinical and microbiological measurements were made by a trained examiner (J.M.D.B.), blinded to the treatment.

Statistics

Site-based analysis was performed using parametric tests for comparisons between T and SRP+T or SRP and SRP+S and non-parametric tests for comparisons between T and SRP, T and SRP+S or SRP+T and SRP+S for the outcome variables under study. For each group at baseline and after 30 days, PD, CAL and GR data were subjected to unpaired and paired Student's t-test and to an analysis of differences between treatment groups and points in time, the paired Student's t-test was used. McNemar's test compared the percentage of BOP, PI and BI for each treatment at a time while Fisher's and McNemar's tests provided intergroup comparisons.

RESULTS

All patients completed the study without side-effects. Clinical characteristics of the four treatment groups are summarized in Table 1. At baseline no significant differences were found among groups for, PI, BOP, PD, CAL and GR ($p \geq 0,26$).

Table 1. Comparison among treatment groups at baseline.

Treatment group	PI	BI	BOP	PD	CAL	GR
T (n=21)	57.1%	52.4%	100%	6.05±1.05	6.85±1.51	0.80±1.02
SRP+T (n=21)	57.1%	47.6%	100%	6.22±1.23	6.88±1.52	0.66±0.84
SRP (n=21)	59.5%	33.3%	100%	6.23±1.23	6.82±1.40	0.59±0.84
SRP+S (n=21)	45.2%	33.3%	100%	6.05±1.25	6.71±1.71	0.66±1.01
Difference among treatments	$p > 0.42^*$	$p > 0.26^*$	//	$p > 0.32^{**}$	$p > 0.99^{**}$	$p > 0.52^{**}$

*Fisher's test and McNemar's test

**Unpaired and paired t-test

BOP= bleeding on probing, PD= probing depth, CAL= clinical attachment level, GR= gingival recession, PI= visible plaque index, BI= gingival bleeding index

Table 2 presents the clinical variables recorded at baseline and 30 days. All patients maintained the level of oral hygiene and the PI and BI scores did not differ significantly among treatment groups at 30 days ($p \geq 0.53$ and $p \geq 0.16$ respectively). There was no difference among groups at any time for PI ($p \geq 0.42$) or BI ($p \geq 0.16$). The percentage of BOP sites at 30 days decreased significantly ($p \leq 0.02$) in all groups, from 100% at baseline to 57.1%, 50.0%, 66.7% and 71.4% respectively in T, SRP+T, SRP and SRP+S. The greatest reduction occurred in the SRP+T group

($p \geq 0.003$), however differences were not statistically significant among the groups ($p \geq 0.82$).

Table 2. Overall clinical results

Clinical parameters and statistical significance of each therapy	T	SRP+T	SRP	SRP+S	Difference between treatments *
Baseline PI	57.1%	57.1%	59.5%	45.2%	$p > 0.42^*$
30 days PI	52.4%	54.8%	45.2%	50.0%	$p > 0.53^*$
Difference between 0 and 30 days ***	$p = 0.93$	$p = 0.85$	$p = 0.73$	$p = 0.77$	-
Baseline BI	52.4%	47.6%	33.3%	33.3%	$p > 0.26^*$
30 days BI ^o	45.2%	30.9%	33.3%	28.6%	$p > 0.16^*$
Difference between 0 and 30 days***	$p = 0.54$	$p = 0.27$	$p = 1.0$	$p = 0.19$	-
Baseline BOP	100%	100%	100%	100%	//
30 days BOP	57.1%	50.0%	66.7%	71.4%	$p > 0.82^*$
Difference between 0 and 30 days***	$p = 0.008$	$p = 0.003$	$p = 0.01$	$p = 0.02$	-
Baseline PD	6.05±1.05	6.22±1.23	6.23±1.23	6.05±1.25	$p > 0.32^{**}$
30 days PD	4.91±1.72	5.01±1.58	5.35±1.61	5.10±1.47	$p > 0.21^{**}$
Difference between 0 and 30 days****	$p < 0.01$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.05$	-
Baseline CAL	6.85±1.51	6.88±1.52	6.82±1.40	6.71±1.71	$p > 0.99^{**}$
30 days CAL	5.90±2.09	6.05±1.92	6.07±1.77	6.05±1.85	$p > 0.84^{**}$
Difference between 0 and 30 days****	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	**
Baseline GR	0.80±1.02	0.66±0.84	0.59±0.84	0.66±1.01	$p > 0.52^{**}$
30 days GR	0.99±1.20	1.04±1.06	0.72±1.00	0.95±1.10	$p > 0.63^{**}$
Difference between 0 and 30 days****	$p > 0.21$	$p < 0.05$	$p > 0.16$	$p > 0.07$	-

*Fisher's test and McNemar's test; **Unpaired and paired Student's t-test; ***McNemar's test; ****Paired t-test

BOP= bleeding on probing, PD= probing depth, CAL= clinical attachment level, PI= visible plaque index, BI= gingival bleeding index

In all 4 treatment groups, a significant PD reduction ($p \leq 0.05$) and CAL gain ($p < 0.01$) were observed at 30 days when compared to baseline. Mean reduction in PD between baseline and 30 days was greatest in

patients who received SRP+T treatment (1.21mm) followed by T (1.14mm), SRP+S (0.95mm) and SRP (0.88mm). After 30 days, CAL gain was greatest in those who received T treatment (0.95mm) followed by SRP+T (0.83mm), SRP (0.75mm) and the SRP+S (0.66mm). Finally, there was also a significant GR increase only for SRP+T at 30 days ($p < 0.05$). Nevertheless, there was no significant difference between groups at any time for the PD, CAL and GR parameters analyzed ($p \geq 0.21$).

A total of 336 samples were analyzed from sites of 42 patients at baseline and 30 days, for each of six subgingival microorganisms totaling 2016 analyses. For statistical analysis after polymerase chain reaction, results were recorded as positive (1) or negative (0) for presence or absence of the species. Table 3 shows the prevalence of the six target bacteria recovered from all the sampled sites. In general at baseline, there were no statistical differences among groups with respect to relative bacterial colonization, except for between T and SRP groups only and for the *A. actinomycetemcomitans* species ($p = 0.037$). Prior to treatment, *T. forsythia* and *P. gingivalis* were detected in 47.0% and 37.5% respectively, and *A. actinomycetemcomitans* and *P. intermedia* in 16.0% and 16.6% respectively of the mean of total sampled sites. The least prevalent species were *T. denticola* and *P. nigrescens* recovered from only 10.1% and 5.4% of the mean of total sample plaques.

Table 3. Percentage of positive sites for target bacteria in the treatment groups

Treatment group and target microorganisms	Baseline	30 days	Difference between baseline and 30 days
T			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	28.6	14.3	$p > 0.08$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	26.2 ^A	14.3	$p > 0.23$
<i>Tannerella forsythia</i>	40.5	14.3 ^{B,C}	* $p < 0.01$
<i>Prevotella intermedia</i>	14.3	16.7	$p = 1.00$
<i>Prevotella nigrescens</i>	4.8	16.7	$p > 0.13$
<i>Treponema denticola</i>	7.1	11.9	$p > 0.62$
SRP+T			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33.3	4.8 ^F	* $p < 0.01$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	14.3	9.5	$p > 0.68$
<i>Tannerella forsythia</i>	50.0	7.1 ^{D,E}	* $p < 0.0001$
<i>Prevotella intermedia</i>	14.3	4.8	$p > 0.29$
<i>Prevotella nigrescens</i>	7.1	9.5	$p = 1.00$
<i>Treponema denticola</i>	7.1	4.8 ^G	$p = 1.00$
SRP			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	45.2	28.6 ^F	$p > 0.15$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	7.1 ^A	4.8	$p = 1.00$
<i>Tannerella forsythia</i>	47.6	38.1 ^{B,D}	$p > 0.39$
<i>Prevotella intermedia</i>	19	19	$p > 0.75$
<i>Prevotella nigrescens</i>	4.8	2.4	$p = 1.00$
<i>Treponema denticola</i>	9.5	14.3	$p > 0.68$
SRP+S			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	42.9	16.7	* $p < 0.01$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	16.7	9.5	$p > 0.45$
<i>Tannerella forsythia</i>	50	31 ^{C,E}	$p > 0.10$
<i>Prevotella intermedia</i>	19	11.9	$p > 0.51$
<i>Prevotella nigrescens</i>	4.8	11.9	$p > 0.37$
<i>Treponema denticola</i>	16.7	23.8 ^G	$p > 0.45$

* McNemar's test

Capital letters indicate a statistically significant difference between groups (McNemar's test and Fisher's test): A- T vs. SRP ($p=0.0377$); B- T vs. SRP ($p=0.0242$); C- T vs. SRP+S ($p=0.0043$); D- SRP+T vs. SRP ($p=0.0013$); E- SRP+T vs. SRP+S ($p=0.0107$); F- SRP+T vs. SRP ($p=0.0067$); G- SRP+T vs. SRP+S ($p=0.0258$).

Monitored bacteria pattern of change differed after therapies for each species. Although in any test or control groups, site therapies could completely eliminate all target pathogens. The number of *P. gingivalis* was significantly reduced ($p < 0.01$) only in groups that received SRP plus an additional therapy (SRP+T and SRP+S). Furthermore the number of positive *T. forsythia* sites was significantly reduced ($p \leq 0.01$) only for tetracycline groups (T and SRP+T). For *P. intermedia* and *T. denticola*, the difference did not indicate a pattern of significant change and the number of *A. actinomycetemcomitans* showed a small decrease for all groups, however both were without statistical significance.

Among groups at 30 days, tetracycline monotherapy (T) showed a significant decrease over SRP and SRP+S for *T. forsythia* ($p = 0.002$) and when used adjunctively with SRP (SRP+T), it consistently resulted in lower percentages of sites with detectable levels of *T. forsythia* ($p \leq 0.02$), *P. gingivalis* ($p \leq 0.04$) and *T. denticola* ($p = 0.02$) when compared to control therapies.

DISCUSSION

The purpose of this investigation was to evaluate the initial clinical and microbiological response to a tetracycline solution applied with a microbrush for treatment of sites with persistent periodontal pockets. Participants had already been treated for chronic periodontal disease with meticulous quadrant scaling and root planing under local anesthesia

however at least 4 periodontal pockets ≥ 5 mm in non-adjacent teeth with bleeding on probing, remained. It must be recognized that some sites respond poorly to such treatment unlike the average cases. A clinical therapeutic procedure should be carried out and reevaluated against expected response to define further therapy.⁶

Several aspects of this study were in accordance with Kaldahl et al. (1993)⁶ and Mombelli et al. (2005).⁴³ The first was to standardize, under practical conditions, the use of a controlled force probe and splints as described^{44,45} in order to secure probe insertion pathways and provide vertical reference points for depth measurements. A second was to obtain sampling units by randomization so as to provide reasonable protection against assembly bias and legitimize application of many statistical procedures. Third was blindness to ensure that investigator bias and scientific beliefs did not unduly influence patient management and assessment. Finally, a split mouth study was rejected to avoid wash-out of antimicrobials by saliva that might alter microbial flora in control sites receiving distinct treatments and thereby mask differences of interest.²⁹ Also, none of the patients had side effects during the study.

However, limitations of this study must be taken into account. Since only initial clinical and microbiological responses to therapy were examined, the early maximum benefits are to be expected. Moreover, sites were selected on the basis of poor response to initial treatment, possibly caused by incomplete debridement,⁴⁶ once SRP is usually effective in

producing evident and statistically significant improvements. Further, the antimicrobial treatments required four visits. A cost-benefit analysis should compare all these aspects with the traditional approach.

It is difficult to compare these clinical results with other studies because few have evaluated persistent periodontal pockets after active scaling and root planing^{26,27,29,35,36} and only a few were short term. All treatment modalities in the present study significantly improved probing depth and clinical attachment. Introduction of tetracycline solution in residual pockets or in association with SRP resulted in improved mean probing depth and clinical attachment gain that were superior to those of the two control therapies, although without statistical significance. These results are consistent with those of Heijl et al. (1991)³⁹ that showed SRP plus tetracycline fiber in treatment of chronic periodontitis produced more reduction in probing depth than only scaling. However, differences between groups were not significant in that study. Our clinical observations also concur with Kinane & Radvar (1999)²⁷ who demonstrated added improvement in probing depth and attachment level for the tetracycline fiber plus SRP group.

Other clinical parameters including visible plaque index and bleeding index did not vary between baseline and 30 days. This is possible if the baseline level of hygiene was maintained throughout the study. Bleeding on probing, however, was significantly improved irrespective of treatment method. These studies supported the hypothesis

that many sites that do not respond favorably to initial mechanical periodontal therapy may nevertheless benefit from further scaling and root planing.²⁹

Similar results between tetracycline as monotherapy and the SRP group could probably occur because the biofilm ambient in which bacteria are organized in the periodontal pocket is an important indication that a locally delivered antimicrobial should be used adjunctively with mechanical means.²⁷ However according to Christersson et al. (1993)⁸ and Tonetti (1997)²¹, even if good results can be achieved with drug monotherapy, it is likely that local delivery should be used only in conjunction with adequate measures to disperse bacterial biofilm. The microbrush may become a useful addition to the armamentarium of periodontal instrumentation, once it has demonstrated to be effective in removing plaque bacteria from surfaces of periodontally involved cementum with a non-surgical approach.¹⁸

Good clinical results of tetracycline groups (T and SRP+T) were concomitant with higher proportions of sites with reduced presence of bacteria. Salvi et al. (2002)²⁶ reported that additional suppression of subgingival microbiota after mechanical debridement may lead to further shrinkage of residual pockets producing clinical attachment gains. When periodontitis progresses in spite of SRP, high levels of putative pathogens such as *A. actinomycetemcomitans*,^{47,48} *P. gingivalis* and *P. intermedia*,⁴⁸⁻⁵² *T. forsythensis*^{50,51,53} and *T. denticola*^{50,54} are found in subgingival

plaque. In the present study, high prevalence of those periodontopathogens at baseline suggests that they play a role in non-responsive sites, which is in agreement with Edwardsson et al. (1999)⁵¹ and Aimetti et al. (2004)³⁶ who considered *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *T. forsyntensis* as a causal factor therapy resistant periodontitis.

Analysis of the microbiological test showed that *T. forsyntensis* was significantly decreased only in tetracycline groups while *P. gingivalis* was significantly reduced only in groups that received SRP plus an additional therapy. Among groups, tetracycline as a monotherapy or adjunctively with SRP resulted in lower detectable levels of *T. forsyntensis*, *P. gingivalis* and also *T. denticola*. The few studies on short term microbiological results from tetracycline therapy concluded that a significant reduction in the number of detectable species when compared to baseline, could be expected in the treatment of chronic adult periodontitis.^{55,56} Inability of subgingival instrumentation to eradicate *A. actinomycetemcomitans* has been attributed to the ability of this bacteria to invade subjacent periodontal tissues,^{57,58} as well as to high count levels prior to treatment and to deep initial probing depths.⁵⁹ Such invasion of root structure may provide a reservoir of periodontopathic bacteria for recolonization and re-infection.^{60,61}

Treatment time is another consideration for antimicrobial treatment.³³ In the Kinane & Radvar (1999)²⁷ study, tetracycline fiber application required an average of 8.2 minutes per tooth in addition to

scaling time and Flemmig et al. (1996)⁶² reported that this time was in excess of 13 minutes. Our T group required only 2 minutes for each tetracycline application, however 4 sessions were necessary for complete treatment. Extensive periodontic data on local delivery systems stresses that multiple applications are frequently suggested due to limitations in the delivery profile. These factors must be considered in the cost-benefit analysis of antimicrobial treatments when compared to traditional approaches.

This report presents the initial 30 day clinical and microbiological response to therapy in our investigation on the efficacy of locally applied tetracycline solution for treatment of persistent periodontitis. While these short term results suggest that tetracycline solution applied with a microbrush may be beneficial in treatment of periodontal lesions, evidence of long term benefits, for more than three and six months, is needed to determine the full efficacy of these treatment modalities because antimicrobial agents produce maximum effect soon after administration.

ACKNOWLEDGMENTS

Grants: This study was supported by the Foundation for Research Support of the State of Sao Paulo, Fapesp, grant 03/10598-9 and the Brazilian National Council for Scientific and Technologic Development, CNPq.

REFERENCES

1. Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Effect of non-surgical periodontal therapy (I). Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1981;8:57–72.
2. Ramfjord S, Caffesse R, Morrison E et al. Four modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987;14:445-452.
3. Haffajee AD., Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24:324–334.
4. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effects of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12 month results. *J Clin Periodontol* 2000;27:30–36.
5. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planning. *J Clin Periodontol* 2002;29(Suppl 2):6-16.
6. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* 1993;64:243–253.
7. Kornman KS. Refractory periodontitis: clinical questions in clinical management. *J Clin Periodontol* 1996;3:293– 298.

8. Tonetti M. The topical use of antibiotics in periodontal pockets. In: Lang N, Karring T, Lindhe J. (eds). Proceedings of the 2nd European Workshop on Periodontology. *Chemicals in Periodontics*, 1997:78–109. Berlin Quintessence.
9. Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planning, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol* 1979;50:495–509.
10. Pedrazzoli V, Kilian M, Karring T. Comparative clinical and microbiological effects of topical subgingival application of metronidazole 25% dental gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1992;19:715–722.
11. Lindhe J, Nyman S. The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *J Clin Periodontol* 1975;9:67-79.
12. Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000* 2002;28:56–71.
13. Lindhe J, Nyman S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984;11:504–514.
14. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long term evaluation of periodontal therapy. I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol* 1996;67:93–102.

15. Tonetti M, Muller-Campanile V, Lang N. Changes in the prevalence of residual pockets and tooth loss in treated periodontal patients during a supportive maintenance care program. *J Clin Periodontol* 1998;25:1008–1016.
16. Rosling B, Serino G, Hellstrom MK, Socransky S, Lindhe J. Longitudinal periodontal tissue alterations during supportive therapy. Findings from subjects with normal and high susceptibility to periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 2001;28:241–249.
17. Chung DT, Bogle G, Bernardini M, Stephens D, Riggs M, Egelberg J. Pain experienced by patients during periodontal maintenance. *J Periodontol* 2003;74:1293–1301.
18. Carey HM, Daly CG. Subgingival debridement of root surfaces with a micro-brush: macroscopic and ultrastructural assessment. *J Clin Periodontol* 2001;28:820-827.
19. Sallum AW, Alves RV, Damis LF, Bertolini PF, Nociti Jr FH, Sallum EA. Open flap debridement with or without intentional cementum removal: a 4-month follow-up. *J Clin Periodontol* 2005;32:1007-1010.
20. Addy M, Langeroudi M. Comparisson of the immediate effects on the subgingival microflora of acrylic strips containing 40% chlorexidine, metronidazole or tetracycline. *J Clin Periodontol* 1984;11:379-386.
21. Christersson LA, Norderyd OM, Puchalsky CS. Topical application of tetracycline-HCL in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:88-95.

22. Michalowicz BS, Pihlstrom BL, Drisko CL et al. Evaluation of periodontal treatments using controlled-release tetracycline fibers: Maintenance response. *J Periodontol* 1995;66:708-715.
23. Stelzel M, Florès-de-Jacoby L. Topical metronidazole application as an adjunct to scaling and root planning. *J Clin Periodontol* 2000;27:447–452.
24. Vinholis, A. H., Figueiredo, L. C., Marcantonio Junior, E., Marcantonio, R. A., Salvador, S. L. & Goissis, G. (2001) Subgingival utilization of a 1% chlorhexidine collagen gel for the treatment of periodontal pockets. A clinical and microbiological study. *Brazilian Dental Journal* 12, 209–213.
25. Friesen LR, Williams KB, Krause LS, Killoy WJ. Controlled local delivery of tetracycline with polymer strips in the treatment of periodontitis. *J Periodontol*. 2002;73:13-9.
26. Salvi GE, Mombelli A, Rutar A, Suvan J, Garrett S, Lang NP. Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. A randomized clinical trial comparing three biodegradable sustained release polymers. *J Clin Peridontol* 2002;29,:540-50.
27. Kinane DF, Radvar M. A six month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. *J Clin Peridontol* 1999;70:1-7.
28. Renvert S, Persson GR. A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial

periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. *J Clin Periodontol* 2002;29(Suppl. 3):82-89.

29. Radvar M, Pourtagui N, Kinane DF. Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol* 1996;67:860-865.

30. Vandekerckove BNA, Quirynen M, Van Steenberghe D. The use of tetracycline- containing controlled-release fibres in the treatment of refractory periodontitis. *J Periodontol* 1997;68:353–361;

31. Newman MG, Kornman KS, Dopherty FM. A 6 month multi-center evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planning in maintenance patients: Clinical results. *Journal of Periodontology* 1994;65, 685-691.

32. Stabholz A, Nicholas AA, Zimmerman GJ, Wikesjo UM. Clinical and antimicrobial effects of a single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine in deep periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 1998;25:794-800.

33. Killoy WJ. The clinical significance of local chemotherapies. *J Clin Periodontol* 2002;29(Suppl.2):22-29.

34. Quirynen M, Teughels W, De Soete M, Van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol 2000* 2002;28:72-90.

35. Perinetti G, Paolantonio M, Cordella C, D'Ercole S, Serra E, Piccolomini R: Clinical and microbiological effects of subgingival

administration of two active gels on persistent pockets of chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 273– 281

36. Aimetti M, Romano F, Torta I, Cirillo D, Caposio P, Romagnoli R: Debridement and local application of tetracycline-loaded fibers in the management of persistent periodontitis: results after 12 months. *J Clin Periodontol* 2004;31:166–172.

37. Goodson JM, Cugini M, Kent R et al. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy II: clinical response. *J Periodontal Res* 1991;26:371–379.

38. Heijl L, Dahlen G, Sundin Y, Wenander A, Goodson JM. A four quadrant comparative study of periodontal treatment using tetracycline containing drug delivery fibres and scaling. *J Clin Periodontol* 1991;18:111–116.

39. Minabe M, Takeuchi K, Tomomatsu E, Hori T, Umemoto T. Clinical effects of local application of collagen film-immobilized tetracycline. *J Clin Periodontol* 1989;16:291-294.

40. Goulding MJ, Sandahl KO, Nowadly CA, Zambon JJ, Christesson LA. Release of minocycline after subgingival deposition by use of resorbable polymer. *J Periodontol* 1991;62:84-85.

41. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *J Clin Periodontol* 1975;25:229-235.

42. Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:326–330.
43. Mombelli A. Clinical parameter: biological validity and clinical utility. *Periodontology 2000* 2005;39:30-39.
44. Isidor F, Karring T, Attström R. Reproducibility of pocket depth and attachment level measurements when using a flexible splint. *J Clin Periodontol* 1984;11:662–668.
45. Watts T. Constant force probing with and without a stent in untreated periodontal disease: the clinical reproducibility problem and possible sources of error. *J Clin Periodontol* 1987;14:407–411
46. Heasman PA, Heasman L, Stacey F, McCracken GI. Local delivery of chlorhexidine gluconate (PerioChip) in periodontal maintenance patients. *J Clin Periodontol* 2000;28:90-95.
47. Van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, De Graaf J. 1992. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)-associated periodontitis. *J Periodontol* 1992;63:52-57.
48. Mombelli A, Schmidt B, Rutar A, Lang NP. Persistent patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus*

actinomycetemcomitans) after mechanical therapy of periodontal disease.

J Periodontol 2000;71:14-21.

49. Sato K, Yoneyama T, Okamoto H, Dahlen G, Lindhe J. The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 1993;20:359–365.

50. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planning. *J Clin Periodontol* 1997b;24:767–776.

51. Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Soderfeldt B, Attstrom R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26:143-152.

52. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol* 2000;27:903–997.

53. Listgater MA, Lai CH, Young V. Microbial compositions and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993;64:155-161.

54. Simonson LG, Robison PS, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J Periodontol* 1992;63:270–273.
55. Maiden MF, Tanner A, McArdle S, Haspaner K, Goodson JM. Tetracycline fibre therapy monitored by DNA probe and culture methods. *J Periodontol Res* 1991;26: 452–459.
56. Sanz, M., Serrano, C., Garcia, C., Echievarria, C. & O'Connor, A. Clinical and microbiological efficacy of tetracycline fiber therapy in relapsing periodontal site during supportive periodontal therapy. *J Dent Res* 1997;76:153.
57. Christersson LA, Slots J, Rosling B, Genco R. Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1985;12:465-476.
58. Shiloah J & Patters MR. DNA probe analysis of the survival of selected periodontal pathogens following scaling, root planning and intra-pocket irrigation. *J Periodontol* 1994 65: 568-575.
59. Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. *J Periodontol* 1994;65:827-834.
60. Daly C, Seymour G, Kieser J, Corbet E. Histological assessment of periodontally involved cementum. *J Clin Periodontol* 1982;9:266-274.

61. Giuliana G, Ammatuna P, Pizzo G, Capone F, D'Angelo M. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. *J Clin Periodontol* 1997;24: 478-485.
62. Flemmig TF, Weinacht S, Rudiger S, Rumetsch M, Jung A, Klaiber B. Adjunctive controlled topical application of tetracycline HCl in the treatment of localized persistent or recurrent periodontitis. Effects on clinical parameters and elastase-a1-proteinase inhibitor in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1996;23:914–921.

4.2 Capítulo 2 - Avaliação longitudinal

A Six-Month Clinical and Microbiological Response to Local Tetracycline Solution Applied by a Micro-brush in Persistent Periodontal Pockets

Artigo a ser submetido para publicação

Six-Month Clinical and Microbiological Response to Tetracycline Solution Applied with a Microbrush in Persistent Periodontal Pockets

Joseane M. D. Bosco*, Beatriz M. V. Lopes*, Alvaro F. Bosco[†] Denise M. P. Spolidorio[‡], Rosemary A. C. Marcantonio*

Background: This study reported the 6 month clinical and microbiological response to tetracycline solution applied with a microbrush for treatment of persistent periodontal pockets.

Methods: Thirty-seven patients, each with 4 pockets ≥ 5 mm deep and bleeding on probing (BOP), were randomized into test and control groups. For each patient in the test groups, two teeth received 4 applications of tetracycline solution (100mg/ml) with a microbrush once a week (T group) while the other two teeth received the same treatment plus one session of SRP at the first appointment (SRP+T group). For each patient in the control groups, two teeth received one session of SRP (SRP group) and the other two received 4 applications of saline with a microbrush once a week plus one session of SRP (SRP+S group). Clinical measurements were taken at baseline, 1, 3 and 6 months after last treatment. Subgingival plaque samples were analyzed by polymerase chain reaction.

Results: All therapies yielded statistically significant data on probing and clinical attachment levels. Differences between treatments did not reach statistically significant levels at any time. While the frequency of sites with BOP was markedly reduced after therapies, the most effective reductions were in SRP+T (60%) and T (52%). Prevalence of tested subgingival bacteria decreased in all groups, however, in tetracycline groups only, a significant decrease of *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, and *A. actinomycetemcomitans*, was noted up to 3 and 6 months.

Conclusion: This study suggests that the tetracycline solution applied with a microbrush may be an alternative treatment for persistent periodontal pockets and provide added microbiological benefits as well.

KEY WORDS

Periodontal disease/microbiology; periodontal disease/drug therapy; comparative study; tetracycline/therapeutic use.

* Department of Periodontology, School of Dentistry, State University of São Paulo, UNESP, Araraquara, S. P., Brazil.

[†] Department of Periodontology, School of Dentistry, State University of São Paulo, UNESP, Araçatuba, S. P., Brazil

[‡] Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, State University of São Paulo, UNESP, Araraquara, S. P., Brazil.

Treatment for control of periodontal infections continues under development at this time, although scaling and root planing (SRP) is still the most common therapy. Developments have demonstrated an improvement in clinical parameters following reduced counts of microorganisms and percentages of periodontal pathogens, such as *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*.¹⁻⁴

Studies suggest that subgingival scaling treatment of chronic periodontitis with manual instruments is likely to result in a modest, albeit transient shift in composition of microbial flora,⁵⁻¹⁰ particularly in deep pockets that persist after periodontal therapy.^{1,6,11} Continued presence of specific subgingival species including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* has been associated with poor response to SRP treatment.^{3,7,12,13} Haffajee et al. (1997)³ reported that 32% of the subjects exhibited little benefit from non-surgical therapy and continued to have high levels of putative pathogens accompanied by progressive loss of attachment. A direct correlation was found between the increasing number of post-treatment residual pockets of >4mm and the number of *Porphyromonas gingivalis* positive sites¹³. Persistence of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*^{13,14} and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)¹³ was stated to have a highly significant relationship with bleeding on probing.

Since effective control of pathogenic microbiota in periodontal sites has often proven to be more difficult than expected during mechanical therapy,¹⁶ a rationale is apparent for adjunctive use of chemotherapeutic agents. Thus, in management of localized non-responsive sites, delivery of topical antibiotics into periodontal pockets might overcome a deficiency of mechanical therapy.^{17,18} This should provide an antimicrobial concentration sufficient to penetrate biofilm in the periodontal pocket for prolonged periods. Numerous studies have investigated use of biodegradable sustained or controlled release devices and gels during initial periodontal therapy. However, few studies have addressed antibiotic use at reevaluation after initial periodontal therapy when sites did not respond satisfactorily to treatment. This presents a valuable opportunity, prior to supportive periodontal therapy.¹⁹⁻²³

Baker et al. (1983)²⁴ have demonstrated that tetracycline is adsorbed very well by tooth surfaces, up to 100-fold more than other antimicrobials, and further it is then released in an active form. Sustained antimicrobial release from dentin and enamel impregnated with tetracycline was demonstrated in investigations.^{25,26} Delivery systems are now available for topical application of antibiotics which also maintain high antibiotic concentrations in gingival crevicular fluid over an extended period.²⁷ Local subgingival tetracycline delivery by fibers is under extensive investigation that has shown relatively high concentrations of antibiotic in gingival crevicular fluid for 10 days.^{19,20,28-30} Other approaches

to local delivery of tetracycline have been studied including an acrylic resin delivery system,³¹ a resorbable collagen film³² and extensive irrigation.^{26,33}

However, these approaches are characterized by difficulty in applying antibiotic throughout the periodontal pocket and high price, while the rapid outflow of gingival crevicular fluid from sites do not indicate the irrigation method.³⁴ Dental practitioners who prefer a topical antibiotic should consider new delivery methods.²⁶ The microbrush is one alternative to satisfactorily apply topical antibiotic with an added advantage of removing subgingival biofilm from periodontally involved root surfaces instead of other methods which affect cementum.³⁵ The microbrush is a disposable flexible hand-held plastic holder of a fine nylon brush tip for applying liquids such as resins and disclosants during dental treatment.³⁶

This study reported the 6 month clinical and microbiological response obtained by treatment with a tetracycline solution when applied with a microbrush to remove subgingival biofilm at reevaluation time during treatment when periodontal pockets are persistent.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Participants were recruited at the State University of Sao Paulo, UNESP, School of Dentistry at Araraquara and School of Dentistry at Aracatuba. Three months prior to baseline examination they had completed full-mouth SRP during four weeks. Each quadrant required 45-

60 minutes of SRP under local anesthesia during weekly visits. They were instructed on proper home care which was reiterated at each visit. After therapy they received full mouth maintenance supragingival scaling once a month. Participants were between 25 and 60 years of age and had at least 4 non-adjacent teeth with residual pockets of 5mm depth or more and bleeding on probing.

Exclusion criteria were a smoking habit, pregnancy, lactation, an impaired health condition such as diabetes or hepatitis, antibiotic intake in the previous 3 months, allergy to tetracycline or failure to attend treatment or examination. To avoid complications, teeth were excluded when pocket depth reached the apex of the tooth.

Study design

This was a double center, randomized controlled single-blind study to evaluate efficacy of the tetracycline solution applied with a microbrush* at the time of reevaluation after initial periodontal therapy, to treat sites with persistent periodontal pockets. The study was begun by 42 patients and completed after 6 months by 37 patients. Five were excluded when they failed to attend treatment or examination. Of these 4 were in the control group and 1 was in the tetracycline group. An explanation was given to all who signed an informed consent agreement approved by the

* Microbrush® International, WI, United States. Fine Model

Research Ethics Committee of the Araraquara School of Dentistry (number 33/03)

Patients were randomly divided in test and control groups. In test groups, each patient received 4 applications of tetracycline solution applied weekly with microbrush on two non-adjacent teeth, as site T, while the other two non-adjacent teeth received the same treatment plus one session of SRP at the first visit, as site SRP+T. Those in control groups each received one session of SRP in two non-adjacent teeth at first visit, as site SRP, and the other two teeth received 4 weekly applications of saline with a micro brush, plus one session of SRP at first visit, as site SRP+S. All treatments were carried out by experienced periodontal specialists (B.M.V.L. and A.F.B.) and the examiner (J.M.D.B.) was still another specialist. Professional biofilm control was carried out weekly during the treatment month and again monthly during the following 5 months of the study.

Tetracycline solution was prepared by dissolving 500mg of tetracycline chloridrate[∞] in 5ml of sterile saline solution. After solubilization, 3ml of the solution were aspirated by a 0.22µm Millipore filter^ε for solution sterilization.

Subgingival root surface was debrided with an autoclaved microbrush by rubbing the surface vigorously from gingival margin to the bottom of the pocket.³⁶ During the debridement of 2 minutes; the

[∞] Tetraclin® - Teuto- Anápolis, GO, Brazil

microbrush was dipped in tetracycline solution every 30 seconds for test teeth or saline solution for control teeth.

Measurements

Clinical parameters were assessed and microbial samples were taken by an investigator not involved in treatment and who was unaware of treatment choice. Clinical and microbiological parameters were recorded at baseline 1, 3 and 6 months after the last treatment by a single trained examiner, blinded to the treatment (J.M.D.B). Alginate impressions were taken and occlusal acrylic stents were made for clinical measurements of sites selected. Periodontal examination included recording of visible plaque index (PI),³⁷ gingival bleeding index (GI),³⁷ probing depth (PD) and gingival recession (GR) as measured by an electronic probe* as well as clinical attachment level (CAL), and bleeding on probing (BOP) within 30 seconds.

Subgingival microbiota was sampled following register of PI and GI. Visible supragingival plaque was removed using scalars and selected sites were isolated with cotton rolls and gently air-dried. Each subgingival plaque sample was collected with a sterile paper point inserted down to the pocket bottom and held there for 30 seconds.³⁸ The paper point was immediately placed in sterile *Eppendorf* vials containing 500µl of a pre-reduced anaerobically sterilized Ringer's solution and stored at -20°C, until

ε Millipore®- São Paulo, SP, Brazil

* Florida Probe, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL., USA

the polymerase chain reaction (PCR) identification of *A. actinomycetemcomitnas*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola* and *P. nigrescens*.

Statistics

Site-based analysis was performed using parametric tests for comparisons between T and SRP+T or SRP and SRP+S and non-parametric tests for comparisons between T and SRP, T and SRP+S or SRP+T and SRP+S for outcome variables under study. For each group, the clinical data, PD, CAL and GR were subjected to repeated measurement analysis of the variance model (ANOVA) at each measurement time. When there were significant differences, post-hoc comparisons were performed using Tukey's test. Unpaired and paired Student's t-tests were employed to analyze differences for those clinical parameters between groups at the four points in time.

The Cochran-Q test compared the percentage of BOP, PI, BI and the six periodontal pathogens, for each treatment at a time. Significance of differences was assessed using McNemar's test. Fisher's test and McNemar's test were used for intergroup comparisons. Significance cut-off was $p < 0.05$.

RESULTS

Clinical observations

None of those treated patients had adverse clinical events. Baseline clinical parameters of all 37 subjects are described in Table 1. Average of pocket depth and attachment level for groups at baseline was 6.05 and 6.85 for T and SRS+T respectively and 6.12 and 6.77 for SRP and SRP+S respectively.

Table 1. Comparison between treatment groups at baseline

Clinical variable	Treatment				Difference between groups
	T (n=40)	SRP+T (n=40)	SRP (n=34)	SRP+S (n=34)	
PI	60.0%	55.0%	55.9%	44.1%	$p>0.24^*$
BI	55.0%	47.5%	29.4%	29.4%	$p>0.05^*$
BOP	100%	100%	100%	100%	//
PD	6.05±1.08	6.25±1.25	6.25±1.18	5.99±1.06	$p>0.26^\dagger$
CAL	6.83±1.54	6.87±1.54	6.94±1.37	6.61±1.36	$p>0.08^\dagger$
GR	0.78±1.04	0.62±0.83	0.68±0.89	0.62±1.00	$p>0.42^\dagger$

*Fisher's test and McNemar's test; [†]Unpaired and paired Student's t-test

BOP= bleeding on probing, PD= probing depth, CAL= clinical attachment level,

PI= visible plaque index, BI= gingival bleeding index

Participants maintained the level of oral hygiene and the PI (Table 2) and BI (Table 3) scores did not differ significantly among treatment groups at baseline, 3 and 6 months.

Table 2. Plaque index

Treatment group	1-month PI ^ϕ	3-month PI ^ϕ	6-month PI ^ϖ	p values [§]
T	50.0%	50.0%	40.0%	$p \geq 0.15$
SRP+T	52.5%	40.0%	55.0%	$p \geq 0.25$
SRP	47.1%	47.1%	47.1%	$p \geq 0.75$
SRP+S	44.1%	52.9%	52.9%	$p \geq 0.58$
Difference between treatment [‡]	$p \geq 0.35$	$p \geq 0.38$	$p \geq 0.26$	

[‡] Fisher's test and McNemar's test; [§] Cochran-Q test

BOP= bleeding on probing, PD= probing depth, CAL= clinical attachment level, PI= visible plaque index, BI= gingival bleeding index

Table 3. Bleeding index (site number and percentage).

Treatment group	1-month BI ^ϕ	3-month BI ^ϕ	6-month BI ^ϖ	p values [¶]
T	45.0%	35.0%	37.5%	$p \geq 0.11$
SRP+T	30.0%	27.5%	27.5%	$p \geq 0.05$
SRP	32.4%	26.5%	38.2%	$p \geq 0.68$
SRP+S	26.5%	35.3%	44.1%	$p \geq 0.28$
Difference between treatment	$p \geq 0.18^*$	$p \geq 0.14^*$	$p \geq 0.15^*$	

^{||} Fisher's test and McNemar's test; [¶] Cochran-Q test

BOP= bleeding on probing, PD= probing depth, CAL= clinical attachment level,

PI= visible plaque index, BI= gingival bleeding index

All treatments reduced the percentage of BOP sites ($p < 0.004$) from 100% at baseline to 47%, 40%, 68% and to 59% at 6 months respectively in T, SRP+T, SRP and SRP+S (Figure.1). The greatest reduction occurred in SRP+T at 1, 3 and 6 months ($p \leq 0.0001$), however differences among groups were statistically significant only at 6 months when compared with SRP ($p \leq 0.02$). Persistence of bleeding on probing throughout the study occurred in 27.5 % with T, 17.5% with SRP+T, and 32.3% with both SRP and SRP+S.

did not remain significant at 6 months. Nevertheless, there was no significant difference across groups at any time.

Table 4. Probing depth (mean \pm standard deviation).

Treatment group	Baseline PS	1-month PS	3-month PS	6-month PS	Difference between baseline and time points [#]
T	6.05 \pm 1.08	4.97 \pm 1.74	4.76 \pm 1.62	4.74 \pm 1.69	$p < 0.001$
SRP+T	6.25 \pm 1.25	5.06 \pm 1.59 ^{AB}	4.47 \pm 1.52 ^A	4.38 \pm 1.63 ^B	$p < 0.001$
SRP	6.25 \pm 1.18	5.50 \pm 1.61 ^A	5.11 \pm 1.36	4.88 \pm 1.33 ^A	$p < 0.01$
SRP+S	5.99 \pm 1.06	5.02 \pm 1.41	4.72 \pm 1.62	4.71 \pm 1.73	$p < 0.001$
Difference between treatment ^{**}	$p \geq 0.26$	$p \geq 0.17$	$p \geq 0.05$	$p \geq 0.15$	

[#]ANOVA and Tukey's test

^{**}Unpaired and paired Student's t-test

Means followed by equal letters in line indicate statistically significant differences among 1, 3 and 6 months ($p < 0.05$).

Table 5. Clinical attachment level (mean \pm standard deviation).

Treatment group	Baseline CAL	1-month CAL	3-month CAL	6-month CAL	Difference between baseline and time points ^{‡‡}
T	6.83 \pm 1.54	5.88 \pm 2.14	5.74 \pm 2.00	5.59 \pm 1.98	$p < 0.001$
SRP+T	6.87 \pm 1.54	6.07 \pm 1.94 ^{AB}	5.44 \pm 1.88 ^A	5.18 \pm 1.88 ^B	$p < 0.001$
SRP	6.94 \pm 1.37	6.33 \pm 1.70	6.01 \pm 1.39	5.85 \pm 1.57	$p < 0.01$
SRP+S	6.61 \pm 1.36	5.89 \pm 1.64	5.59 \pm 1.84	5.52 \pm 1.72	$p < 0.01$
Difference between treatment ^{††}	$p \geq 0.25$	$p \geq 0.29$	$p \geq 0.13$	$p \geq 0.09$	

^{††}Unpaired and paired Student's t-test

^{‡‡} ANOVA and Tukey's test

Means followed by equal letters in line indicate statistically significant differences among 1, 3 and 6 months ($p < 0.05$).

Table 6. Gingival recession (mean \pm standard deviation).

Treatment group	Baseline GR	1-month GR	3-month GR	6-month GR	Difference between baseline and time points
T (n=20)	0,78 \pm 1,04	0,92 \pm 1,15	0,98 \pm 1,09	0,85 \pm 1,15	$p \geq 0,21$
SRP+T (n=20)	0,62 \pm 0,83 ^{AB}	1,02 \pm 1,08 ^A	0,97 \pm 1,04 ^B	0,80 \pm 0,97	$p < 0,01$
SRP (n=17)	0,68 \pm 0,89	0,83 \pm 1,06	0,90 \pm 1,00	0,98 \pm 1,07	$p \geq 0,18$
SRP+S (n=17)	0,62 \pm 1,00	0,88 \pm 1,03	0,87 \pm 1,06	0,82 \pm 1,04	$p \geq 0,44$
Difference between treatment ^{§§}	$p \geq 0,42$	$p \geq 0,45$	$p \geq 0,67$	$p \geq 0,48$	

^{§§}Unpaired and paired Student's t-test

^{||}ANOVA and Tukey's test

Means followed by equal letters in line indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Microbiological observations

A total of 148 samples were analyzed from 37 patients at baseline, 1, 3 and 6 month visits, for each of 6 subgingival microorganisms totaling of 888 analyses. Table 7 shows prevalence of the 6 target bacteria, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* and *T. denticola* species at baseline in T, SRP+T, SRP and SRP+S. recovered from total sampled sites. Prior to treatment, in general, there were no statistical differences among groups with respect to relative bacterial colonization. There was a statistical difference between T and SRP only for *A. actinomycetemcomitans*.

Table 7. Percentage of target bacteria in the treatment groups at time points.

Treatment group and target microorganisms	Baseline	1-month	3-month	6-month	Difference between baseline and time points
T					
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	30	15	10*	22.5	* $p=0.02$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	27.5 ^A	15	7.5 ^B	5**	* $p=0.02$ ** $p=0.01$
<i>Tannerella forsythia</i>	42.5	15 ^{C,D}	10 ^{**F,H}	17.5 ^{***}	* $p=0.005$ ** $p=0.03$ *** $p=0.009$
<i>Prevotella intermedia</i>	15	17.5	2.5	7.5	$p \geq 0.13$
<i>Prevotella nigrescens</i>	5	17.5	7.5	5	$p \geq 0.13$
<i>Treponema denticola</i>	7.5	12.5	2.5	5	$p \geq 0.61$
SRP+T					
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	35	5*	7.5 ^{**}	17.5	* $p=0.001$ ** $p=0.005$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	15	10	2.5	7.5	$p \geq 0.13$
<i>Tannerella forsythia</i>	50	7.5 ^{*E}	12.5 ^{**}	20 ^{***}	* $p=0.000$ ** $p=0.001$ *** $p=0.013$
<i>Prevotella intermedia</i>	15	5	2.5	5	$p \geq 0.07$
<i>Prevotella nigrescens</i>	7.5	7.5	2.5	0	$p \geq 0.24$
<i>Treponema denticola</i>	7.5	5	5 ^G	0 ^I	$p \geq 0.24$
SRP					
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	38.5	20.6	11.8	23.5	$p \geq 0.059$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5.9 ^A	0	11.8 ^B	5.9	$p \geq 0.47$
<i>Tannerella forsythia</i>	38.2	29.4 ^{C,E}	35.3 ^F	26.5	$p \geq 0.38$
<i>Prevotella intermedia</i>	20.6	17.6	2.9	8.8	$p \geq 0.07$
<i>Prevotella nigrescens</i>	5.9	2.9	5.9	2.9	$p \geq 0.61$
<i>Treponema denticola</i>	11.8	11.8	8.8 ^G	11.8 ^I	$p \geq 0.61$
SRP+S					
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	38.2	14.7	20.6	23.5	$p \geq 0.05$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	14.7	2.9	8.8	5.9	$p \geq 0.13$
<i>Tannerella forsythia</i>	47.1	26.5 ^D	29.4 ^H	26.5	$p \geq 0.07$
<i>Prevotella intermedia</i>	20.6	14.7	5.8	0	$p \geq 0.05$
<i>Prevotella nigrescens</i>	5.9	5.9	2.9	0	$p \geq 0.47$
<i>Treponema denticola</i>	20.6	23.5	5.9	2.9	$p \geq 0.05$

***** Cochran Q-test and McNemar test. Caps letters indicates difference statistically significant between groups (McNemar test and Fisher test): A- T vs. SRP ($p=0,01$); B- T vs. SRP ($p=0,02$); C- T vs. SRP ($p=0,01$); D- T vs. SRP+S ($p=0,04$); E- SRP+T vs. SRP ($p=0,02$); F-SRP+T vs. SRP ($p=0,02$); G- SRP+T vs. SRP+S ($p=0,03$); H- T vs SRP+S ($p=0,04$); I- SRP+T vs. SRP ($p=0,04$).

The pattern of change of monitored bacteria after therapies at points in time differed for each species. The number of *P. gingivalis* and *T. forsythensis*-positive sites remained high throughout the study. However tetracycline therapy groups achieved a statistical significance in reduction of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia* between baseline and other measurement times. For *P. gingivalis* and *T. forsythia* the proportion reached lower levels at 1 and 3 months, increasing at 6 months, however, still showing statistical significance. SRP and SRP+S sites, despite lower proportions of target bacteria after treatment, did not show statistical significance at any time.

Furthermore, statistical analysis of data indicates that to achieve a lower prevalence of *A. actinomycetemcomitans* ($p \leq 0.02$), *T. forsythia* ($p \leq 0.04$), and *T. denticola* ($p \leq 0.04$) at various points in time, tetracycline therapy groups were more efficient than SRP alone or combined with saline. However the proportion of *P. intermedia* and *P. nigrescens* was not significantly lower in the test compared to the control at any time.

DISCUSSION

The purpose of this investigation was to evaluate the longitudinal clinical and microbiological response to the tetracycline solution applied with a microbrush for treatment of sites with persistent periodontal pockets. Residual sites with evidence of disease are at risk of additional tissue destruction and, eventually, tooth loss.³⁹ Study participants had

already been treated for chronic periodontal disease with meticulous quadrant scaling and root planing under local anesthesia but still had at least 4 periodontal pockets ≥ 5 mm in non-adjacent teeth with bleeding on probing. In accordance with Radvar et al. (1996),¹⁹ our results support the hypothesis that sites which do not respond favorably to initial mechanical therapy may benefit from a further episode of SRP or local antimicrobial therapy. Most clinical improvements and microbial changes occurred prior to 6 months in all therapies.

All treatment modalities resulted in significant probing depth reduction and clinical attachment gain at any time. A interesting aspect of this study was standardization, under practical conditions, of the use of a controlled force probe and splints as used in some trials^{40,41} to secure probe insertion pathways and to provide vertical reference points for depth readings. These recourses may be justified for clinical research but they are too complicated for clinical practice.⁴² Mean PD reduction in all group sites, 1.46 mm at 6 months, was consistent with reports by Hung & Douglass (2002)⁴³ in a meta-analysis (1.00-2.80 mm) while Cobb (1996)⁴⁴ cites a mean PD reduction of 1.29mm for pockets initially measuring 4 to 6mm.

Our clinical observations also concur with those of Kinane & Radvar (1999)²⁰ that demonstrated greater improvement in probing depth and attachment level in the tetracycline by fiber plus SRP group. Although improvements appeared to be greater in the SRP+T group than in others,

differences between treatments did not reach statistically significant levels at any time. These clinical results are consistent with Heijl et al. (1991)³⁰ who showed that SRP plus tetracycline by fiber produced a greater reduction in probing depth than scaling alone, however differences between groups were not significant. This may be explained, recognizing that SRP alone is effective in producing clinically obvious and statistically significant improvements and as well as when adjunctive therapy is involved. However, Aimetti et al. (2004)²³ had improved results with tetracycline by fiber in persistent periodontal pockets. This discrepancy may be due to its defect selection (mean PD 4.79) and a split mouth design with a possible crossover effect on control sites.

In addition, other clinical parameters including visible plaque index, bleeding index and bleeding on probing were significantly improved irrespective of treatment. Compared with SRP, none of the adjunctive local treatments were better statistically. Single applications of tetracycline solution with a microbrush resulted in lower bleeding on probing sites including lower persistent bleeding sites throughout the study. Furthermore, it should be noted that at 6 months, more than half of the non-tetracycline groups still bled on probing while T and SRP+T respectively showed a mean of 47% and 40% of bleeding on probing. This study was consistent with Christersson et al. (1993)²⁶ who stated that tetracycline solution in vivo is substantive to dentin root surfaces following application of a tetracycline concentration of 100 mg/ml. Substantive

properties of this local drug, in addition to its antimicrobial and anticollagen activities, show promise as a sole therapy as demonstrated by our SRP+T or in adjunct to mechanical therapy.^{23,26} Thus, this treatment may support conventional therapy of non-responding sites or when vigorous mechanical therapy should be avoided, for example, in maintenance programs. Interestingly, Renvert & Persson (2002)³⁹ found that residual probing depth was predictive of further disease progression, whereas persistent bleeding on probing was not.

It is questionable whether application of local antimicrobials is justifiable in clinical practice, in the absence of subgingival instrumentation, once it is well established that bacteria are organized into biofilms. There is extensive evidence that locally delivered antimicrobials should be used adjunctively with mechanical instrumentation to disrupt biofilm. T group results were similar without concomitant mechanical instrumentation, proved to be as effective as SRP+T, SRP or SRP+S, all with concomitant conventional subgingival scaling and root planing. This reflected current emphasis on mechanical disruption of subgingival microbial deposits to produce a biologically clean root surface rather than intentional removal of periodontally involved cementum.^{35,36}

It is generally agreed that efficacy of periodontal therapy is directly related to the ability of the treatment to reduce the level and prevalence of one or more pathogenic species. A positive association has been demonstrated between low proportions of periodontal pathogens and a

reduction in pocket depth and gain in attachment after periodontal treatment.^{1,3,6} thereby indicating that a large number of microorganisms were removed from the subgingival area at the time of instrumentation. However large numbers of microorganisms also remain.³ When periodontitis progresses despite SRP, high levels of putative pathogens, such as *A. actinomycetemcomitans*,^{13,46} *P. gingivalis* and *P. intermedia*,^{7,13,14,47} *T. forsythia* and *T. denticola*⁴⁷ are found in subgingival plaque. At baseline, high prevalence of monitored bacteria suggests that they play a role in non-responsive sites which is in agreement with Edwardsson et al. (1999),⁴⁵ who considered *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *T. forsythia* as causal factors in therapy-resistant periodontitis.

After a short period of time total numbers of bacteria in the pocket again reach pretreatment levels and continue to slowly increase over time. Inability of subgingival instrumentation to eradicate *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* has been attributed to an ability to invade subjacent periodontal tissues,^{48,49} as well as to high pretreatment levels and deep initial probing depths.⁵⁰ Such bacterial invasion of root structure may represent a reservoir of periodontopathic bacteria for recolonization and re-infection.^{51,52}

Apparently, effective supragingival control of microbial plaque is fundamental to achieve long term control of inflammatory periodontal disease.^{3,4} Professional supragingival debridement is directed to plaque elimination, especially under study conditions; so that every effort is made

to achieve this goal.⁵³ Periodicity of this professional supragingival control during maintenance is not fully defined, therefore once a month was considered to be realistic for those not included in research study.

These clinical and microbiological changes caused by the substantive nature of tetracycline compare favorably to those following SRP. For effectiveness, antimicrobials must reach the target site and remain in adequate concentration for a sufficient time to support the antimicrobial effect. Our microbiological observations concur with Salvi et al. (2002)²² where parameters in both studies did not indicate dramatic decreases in the prevalence of subgingival microbiota due to treatments. Although in our study, the 3 species of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythensis*, significantly decreased, all occurred in tetracycline patients. Our findings corroborate this interpretation since tetracycline sustains adequate antimicrobial levels over a sufficient period of time because the root surface may act as a reserve for slow release of tetracycline, leading to subsequent availability in therapeutic doses.²⁶

Risk of bacterial resistance is controversial in relation to use of antimicrobials, especially tetracycline. An average of 12% of viable subgingival bacteria was found to be resistant to 4 mg/ml tetracycline in adult periodontitis.⁵⁴ However, only 16% of the microorganisms, harboring tetracycline resistance determinant tetM, were considered to be putative periodontal pathogens.^{54,55}

Other investigations have demonstrated the significance of specific host factors that can either contribute to exacerbation of periodontitis or effectively control infection. Edwardsson et al. (1999)⁴⁵ stated that a susceptible host is required to sustain a therapy-resistant periodontitis in addition to disease related bacteria. It might be postulated that subgingival debridement has an additional influence on host-parasite equilibrium such as affecting the environment of pathogenic species as well as local and systemic immunological response. As such, additional investigation is needed to define improved methods for treating persistent periodontal pockets.

This paper updates a previous report after a one month study on the efficacy of local antibiotic applied according to a new design for treatment of persistent periodontal pockets. This study suggests that tetracycline solution (100 mg/ml) applied with a microbrush may be an alternative in treatment of persistent periodontal pockets with additional microbiological benefits.

REFERENCES

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

2. Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *J Periodontol* 1992;63:540–547.
3. Haffajee AD., Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24:324–334.
4. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effects of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12 month results. *J Clin Periodontol* 2000;27:30–36.
5. Listgarten MA, Lindhe J, Hellden L. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. Clinical, microbiological and histological observations. *J Clin Periodontol* 1978;5:246-271.
6. Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, De Graaff J. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra and subgingival debridement. *J Clin Peridontol* 1987;15:116–122.
7. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) in periodontitis and its

association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol* 2000;27:903–997.

8. Stelzel M, Florès-de-Jacoby L. Topical metronidazole application as an adjunct to scaling and root planning. *J Clin Periodontol* 2000;27:447–452.

9. Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000* 2002;28:56–71.

10. Rhemrev GE, Timmerman MF, Veldkamp I, Winkelhoff AJ, Van der Velden U. Immediate effect of instrumentation on the subgingival microflora in deep inflamed pockets under strict plaque control. *J Clin Periodontol* 2006;33:42-48.

11. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol* 1984;11,193–207.

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

13. Fleming TF, Weinacht S, Rudiger S, Rumetsch M, Jung A , Klaiber B. Adjunctive controlled topical application of tetracycline HCl in the treatment of localized or recurrent periodontitis. Effects on clinical parameters and elastase- α 1-proteinase inhibitor in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1996;23:914-921.

14. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planning. *J Clin Periodontol* 2002;29(Suppl 2):6-16.
15. Sato K, Yoneyama T, Okamoto H, Dahlen G, Lindhe J. The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota. *J Clin Peridontol* 1993;20:359–365.
16. Mombelli A, Schmidt B, Rutar A, Lang NP. Persistent patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* 2000;71:14-21.
17. Killoy WJ. The clinical significance of local chemotherapies. *J Clin Peridontol* 2002;29(Suppl.2):22-29.
18. Quirynen M, Teughels W, De Soete M, Van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol 2000* 2002;28:72-90.
19. Radvar M, Pourtagui N, Kinane DF. Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol* 1996;67:860-865.

20. Kinane DF, Radvar M. A six month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. *J Clin Peridontol* 1999;70:1-7.
21. Heasman PA, Heasman L, Stacey F, McCracken GI. Local delivery of chlorhexidine gluconate (PerioChip) in periodontal maintenance patients. *J Clin Periodontol* 2000;28:90-95.
22. Salvi GE, Mombelli A, Rutar A, Suvan J, Garrett S, Lang NP. Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. A randomized clinical trial comparing three biodegradable sustained release polymers. *J Clin Peridontol* 2002;29,:540-50.
23. Aimetti M, Romano F, Torta I, Cirillo D, Caposio P, Romagnoli R: Debridement and local application of tetracycline-loaded fibers in the management of persistent periodontitis: results after 12 months. *J Clin Periodontol* 2004;31:166–172.
24. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ. Tetracycline and its derivates strongly bind to and are released from tooth surface in active form. *J Periodontol* 1983;54:580-585.
25. Wikesjö UME, Baker PJ, Christersson LA, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodont Res* 1986;21:322-329.

26. Christersson LA, Norderyd OM, Puchalsky CS. Topical application of tetracycline-HCL in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:88-95.
27. Tonetti M, Cuggini MA, Goodson JM. Zero-order delivery with periodontal placement of tetracycline-loaded ethylene vinyl acetate fibers. *J Periodont Res* 1990;25:243-249.
28. Friesen LR, Williams KB, Krause LS, Killoy WJ. Controlled local delivery of tetracycline with polymer strips in the treatment of periodontitis. *J Periodontol.* 2002;73:13-9.
29. Newman MG, Kornman KS, Dopherty FM. A 6 month multi-center evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planning in maintenance patients: Clinical results. *Journal of Periodontology* 1994;65, 685-691.
30. Heijl L, Dahlen G, Sundin Y, Wenander A, Goodson JM. A four quadrant comparative study of periodontal treatment using tetracycline containing drug delivery fibres and scaling. *J Clin Periodontol* 1991;18:111–116.
31. Addy M, Langeroudi M. Comparisson of the immediate effects on the subgingival microflora of acrylic strips containing 40% chlorexidine, metronidazole or tetracycline. *J Clin Periodontol* 1984;11:379-386

32. Minabe M, Takeuchi K, Tomomatsu E, Hori T, Umemoto T. Clinical effects of local application of collagen film-immobilized tetracycline. *J Clin Periodontol* 1989;16:291-294.
33. Stabholz A, Nicholas AA, Zimmerman GJ, Wikesjo UM. Clinical and antimicrobial effects of a single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine in deep periodontal pockets. *J Clin Periodontol*. 1998;25:794-800.
34. Goodson JM. Gingival crevice flow. *Periodontol* 2000 2003;31:43-54.
35. Sallum AW, Alves RV, Damis LF, Bertolini PF, Nociti Jr FH, Sallum EA. Open flap debridement with or without intentional cementum removal: a 4-month follow-up. *J Clin Periodontol* 2005;32:1007-1010.
36. Carey HM, Daly CG. Subgingival debridement of root surfaces with a micro-brush: macroscopic and ultrastructural assessment. *J Clin Periodontol* 2001;28:820-827.
37. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *J Clin Periodontol* 1975;25:229-235.
38. Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:326-330.
39. Renvert S, Persson GR. A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status

following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. *J Clin Peridontol* 2002;29(Suppl. 3):82-89.

40. Isidor F, Karring T, Attström R. Reproducibility of pocket depth and attachment level measurements when using a flexible splint. *J Clin Peridontol* 1984;11:662–668.

41. Watts T. Constant force probing with and without a stent in untreated periodontal disease: the clinical reproducibility problem and possible sources of error. *J Clin Periodontol* 1987;14:407–411.

42. Mombelli A. Clinical parameter: biological validity and clinical utility. *Periodontology 2000* 2005;39:30-39.

43. Hung HC, Douglass CW. Meta-analysis of the effect of scaling and root planning, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J Clin Periodontol* 2002;29:975–986.

44. Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: Mechanical. *Ann Periodontol* 1996;1:443-4990.

45. Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Soderfeldt B, Attstrom R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26:143-152.

46. Van Winkelhoff AJ, Tijnhof CJ, De Graaf J. 1992. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)-associated periodontitis. *J Periodontol* 1992;63:52-57.
47. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planning. *J Clin Periodontol* 1997b;24:767-776.
48. Christersson LA, Slots J, Rosling B, Genco R. Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1985;12:465-476.
49. Shiloah J & Patters MR. DNA probe analysis of the survival of selected periodontal pathogens following scaling, root planning and intra-pocket irrigation. *J Periodontology* 1994 65: 568-575.
50. Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. *J Periodontol* 1994;65:827-834.

51. Daly C, Seymour G, Kieser J, Corbet E. Histological assessment of periodontally involved cementum. *J Clin Periodontol* 1982;9:266-274.
52. Giuliana G, Ammatuna P, Pizzo G, Capone F, D'Angelo M. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. *J Clin Periodontol* 1997;24:478-485.
53. Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000* 2002;28:56–71.
54. Lacroix JM, Walker CB. Detection and incidence of tetracycline resistance determinant *tet(M)* in the microflora associated with adult periodontitis. *J. Periodontol* 1995;66:102-108.
55. Olsvik B, Hansen BF, Tenover FC, Olsen I. Tetracycline-resistant micro-organisms recovered from patients with refractory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol* 1995;22:391-396.

5 Considerações finais

O propósito da presente investigação foi avaliar clínica e microbiologicamente a resposta inicial e longitudinal da solução de tetraciclina aplicada com microbrush no tratamento de bolsas periodontais persistentes. Os participantes do presente estudo foram previamente tratados com raspagem e alisamento radicular sob anestesia local, entretanto na reavaliação após 3 meses do tratamento ativo e controle de biofilme supragengival, ainda apresentavam pelo menos 4 dentes com bolsas periodontais com profundidade de sondagem ≥ 5 mm e sangramento à sondagem.

O monitoramento dos parâmetros clínicos para avaliar o potencial da instrumentação subgengival direciona o tratamento futuro. Assim como Heasman et al.²⁷ (2001) nós não consideramos nossos pacientes como tendo periodontite refratária, mas sim um número de sítios não respondentes. Neste contexto, Renvert, Person⁴³ (2002) verificaram que a presença destas bolsas residuais apresenta risco para progressão da doença periodontal, portanto, medidas adicionais devem ser estabelecidas para o tratamento específico destes sítios.

Embora antibióticos de ação local disponíveis comercialmente sejam muito promovidos, a eficácia da terapia antibiótica local não tem sido convincentemente demonstrada, principalmente como monoterapia, ou seja, sem estar associada à raspagem e alisamento radicular. A aplicação de antimicrobianos locais na ausência de instrumentação

subgengival para romper o biofilme na raiz dental é questionável²⁷, uma vez que os agentes antimicrobianos podem ser inibidos, neutralizados ou degradados por outros microrganismos diferentes da bactéria alvo. Portanto, um meio de distribuir o antibiótico na bolsa periodontal e ainda causar o rompimento do biofilme é a aplicação deste com o microbrush. Este instrumento tem tamanho similar à sonda periodontal, adapta-se à curvatura da bolsa, tem baixo custo e é provavelmente eficiente em remover biofilme subgengival.⁷

Um fator adicional a ser considerado na terapia local é que a bolsa periodontal é constantemente irrigada por exsudato inflamatório, sendo trocado 40 vezes em uma hora.¹⁹ Para o antibiótico ter efeito, é necessário que ele esteja disponível em concentração suficientemente alta no ambiente subgengival. Portanto, qualquer substância que não seja capaz de se ligar à superfície dura da bolsa e estabelecer um reservatório em equilíbrio de droga ligada e livre não terá sucesso durante a terapia periodontal.³¹

O emprego de tetraciclina como antimicrobiano tópico requer maior tempo de contato da droga com o biofilme, em função de seu próprio mecanismo de ação. A maior vantagem desse fármaco reside na afinidade que o mesmo possui pela parede dura da bolsa periodontal, a qual acaba por se transformar em um dispositivo de liberação lenta adicional.¹¹ De acordo com Quirynen et al.⁴⁰ (2002), a maioria dos estudos com tetraciclina tópica evidencia que a mesma produz uma

modificação significativa da microbiota por um período de, aproximadamente, 3 meses e leva a uma redução da profundidade clínica de sondagem da ordem de 0,5mm, além de ganho de inserção conjuntiva o que estaria associada à substantividade dessa droga.

A análise clínica do presente estudo foi realizada inicialmente aos 30 dias e após 3 e 6 meses de finalizados os tratamentos das bolsas periodontais residuais. A avaliação da resposta do periodonto à RAR não deve ser realizada antes de 4 semanas após o tratamento.^{8,14,30} Medidas tomadas prematuramente não vão representar a completa cicatrização dos tecidos e podem ser erroneamente interpretadas como resposta insatisfatória. De acordo com Cobb¹² (2002) as maiores reduções da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica ocorrem entre 1 e 3 meses após RAR, embora a cicatrização e maturação possam ocorrer até 9 e 12 meses. O controle de biofilme supragengival também é absolutamente crítico se o clínico espera alcançar o controle a longo prazo da resposta periodontal inflamatória.^{13,23}

Os dados clínicos de índice de biofilme visível e de sangramento gengival alcançados aos 30 dias foram mantidos até os 6 meses em todos os grupos. Este fato pode ter ocorrido uma vez os pacientes já terem alcançado nos 3 meses anteriores ao baseline, após orientação e motivação quanto aos cuidados de higiene bucal, os níveis de higiene bucal que conseguiriam manter durante todo o estudo. Outra razão da falta de detecção de maior efeito dos tratamentos nestes índices pode ter

sido devido ao uso de índices dicotômicos para a medida destes parâmetros.²³ Em particular, isto pode afetar a avaliação do acúmulo de biofilme e inflamação gengival, desde que não foram realizadas análises quantitativas ou qualitativas.

Contudo, apesar da não redução dramática dos parâmetros de inflamação, as médias da profundidade de sondagem e do nível de inserção clínica intragrupos melhoraram significativamente comparando-se o baseline e os períodos avaliados. A diferença apresentada entre os grupos nestes parâmetros deve ser interpretada com cuidado já que apesar dos grupos em que a tetraciclina foi utilizada terem apresentado melhores resultados, principalmente entre os grupos SRP+T e SRP para PS, estes não alcançaram diferença estatisticamente significativa em nenhum dos estudos.

Outro fato de interesse é que em um defeito periodontal existente, mudanças verdadeiras em profundidade de sondagem ou no nível de inserção clínica dificilmente podem ser discriminadas de um erro de sondagem a menos que exceda 2 mm.³⁶ Para minimizar este tipo de erro, foram realizadas sondagens com força padronizada e biofilmes de acrílico para padronizar a posição da sonda. Este método tem sido utilizado com boas perspectivas, entretanto é viável apenas no nível de pesquisa acadêmica.³⁶ Contudo, a maior limitação da sondagem periodontal ainda é a incapacidade de distinguir perdas prévias de tecido da atividade de doença atual.

Aplicações de tetraciclina associadas ou não à RAR também resultaram em menores presenças de sangramento à sondagem incluindo menor persistência de sangramento no decorrer do estudo, enquanto que mais da metade dos sítios nos grupos controle ainda exibiram sangramento à sondagem aos 6 meses.

A composição bacteriana modificada após o debridamento mecânico representa a base para a cicatrização periodontal finalmente expressa como redução de profundidade de sondagem e ganho de inserção.⁴⁵ A alta prevalência de bactérias específicas como *P. gingivalis* e *T. forsythia* no baseline deste estudo, nas bolsas periodontais persistentes, sugerem que têm um papel importante em sítios não respondentes. Quando a periodontite progride apesar da RAR, altos níveis de *A. actinomycetemcomitans*,^{37,51} *P. gingivalis* e *P. intermédia*,^{10,24,37,46} *T. forsythia*,^{24,33} e *T. denticola*²⁴ foram encontrados na biofilme subgingival. Mombelli et al.³⁷ (2000) encontraram uma correlação direta entre o aumento do número de bolsas periodontais residuais >4mm e o aumento do número de sítios positivos para *P. gingivalis*. De acordo com Edwardsson et al.¹⁵ (1999) e Aimetti et al.¹ (2004), *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia* são considerados fatores causais na periodontite resistente à terapia.

No presente estudo, a avaliação inicial de 1 mês revelou que *P. gingivalis* teve uma redução significativa nos grupos em que a RAR foi associada ao microbrush tanto no grupo controle (RAR+S) quanto no

grupo de tetraciclina (RAR+T) e *T. forsythia* apresentou uma redução significativa apenas nos grupos em que a tetraciclina foi utilizada (T e RAR+T). A análise intergrupos revelou que o grupo da raspagem associada à tetraciclina (RAR+T) apresentou resultados superiores aos outros grupos para *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*.

No estudo longitudinal, essas observações permaneceram parcialmente, uma vez que a redução do baseline aos 6 meses ocorreu apenas nos grupos em que a tetraciclina foi utilizada sendo que no grupo T a redução de *A. actinomycetemcomitans* ocorreu após 3 meses e manteve-se, no grupo RAR+T a redução de *P. gingivalis* foi apenas até os 3 meses e de *T. forsythia* a redução foi permanente. Além disso, entre os grupos, houve superioridade daqueles em que a tetraciclina foi utilizada associada ou não à RAR.

Embora as evidências sejam limitadas, a solução de tetraciclina aplicada com microbrush pode ser uma alternativa na terapia de suporte convencional em sítios não-respondentes ou quando a terapia mecânica vigorosa não pode ser exercida, por exemplo, em programas de manutenção, em pacientes com aumentada sensibilidade dental, potencialmente menos custosa para o paciente e para o clínico.

6 Conclusão

De acordo com os resultados clínicos e microbiológicos obtidos, concluiu-se que a utilização da solução de tetraciclina aplicada com microbrush, pode ser uma alternativa para o tratamento de bolsas periodontais residuais, sem benefícios clínicos adicionais, entretanto com melhoras no padrão microbiológico até 6 meses.

7 Referências*

1. Aimetti M, Romano F, Torta I, Cirillo D, Caposio P, Romagnoli 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.
2. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. J Clin Periodontol. 1975;25:229-35.
3. American Academy of Periodontology. Parameter on chronic periodontitis with advanced loss of periodontal support. J Periodontol. 2000; 71: 856-8.
4. 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; 11: 266-73.
5. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from tooth surface in active form. J Periodontol. 1983;54:580-5.
6. 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 o estilo Vancouver. Disponível no site:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Carey HM, Daly CG. Subgingival debridement of root surfaces with a micro-brush: macroscopic and ultrastructural assessment. *J Clin Periodontol.* 2001;28:820-7.
8. Caton JG, Proye M, Polson A. Maintenance of healed periodontal pockets after single episode of root planning. *J Periodontol.* 1982; 53: 420-4.
9. Cesco RT. Avaliação clínica e microbiológica da periodontite e peri-implantite induzidas. Estudo em cães [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 1999.
10. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol.* 2000;27:903–97.
11. Christersson LA, Norderyd OM, Puchalsky CS. Topical application of tetracycline-HCL in human periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1993;20:88-95.
12. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planning. *J Clin Periodontol.* 2002;29(Suppl 2):6-16.
13. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effects of scaling and root planing on the clinical and microbiological

parameters of periodontal diseases: 12 month results. *J Clin Periodontol.* 2000;27:30–6.

14. Dahlén G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okamoto H. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival flora in periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 802-9.

15. Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Soderfeldt B, Attstrom R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999;26:143-52.

16. El Attar TMA, Lin MS, Schultz R. Effects of minocycline on prostaglandin formation in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1988; 23:285-6.

17. Fleming TF, Weinacht S, Rudiger S, Rumetsch M, Jung A , Klaiber B. Adjunctive controlled topical application of tetracycline HCl in the treatment of localized or recurrent periodontitis. Effects on clinical parameters and elastase- α 1-proteinase inhibitor in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 1996;23:914-21.

18. Gabler WL, Creamer MR. Suppression on humans neutrophil functions by tetracyclines. *J Periodontal Res.* 1991; 26: 52-8.

19. Goodson J. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J Dent Res.* 1989; 68: 1625-32.

20. Grevstad HJ. Doxycycline prevents root resorption and alveolar bone loss in rats after periodontal surgery. *Scand J Dent Res.* 1993; 101: 287-91.
21. Grevstad HJ, Boe OE. Effect of doxycycline on surgically induced osteoclast recruitment in the rat. *Eur J Oral Sci.* 1995; 103: 156-9.
22. Guillot E, Mouton C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia sensu stricto* and *Prevotella nigrescens*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1876-82.
23. Haffajee AD., Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997;24:324–34.
24. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planning. *J Clin Periodontol.* 1997;24:767–76.
25. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:78-111.
26. Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol.* 1999;14:326–30.
27. Heasman PA, Heasman L, Stacey F, McCracken GI. Local delivery of chlorhexidine gluconate (PerioChip) in periodontal maintenance patients. *J Clin Periodontol.* 2000;28:90-5.

28. Hill RW, Ramfjord SP, Morrison EC, Appleberry EA, Caffesse RG, Kerry GJ, et al. Four types of periodontal treatment compared over two years. *J Periodontol.* 1981; 52: 655-62.
29. Isidor F, Karring, T. Long term effect of surgical and non-surgical periodontal treatment. A 5 year clinical study. *J Periodontal Res.* 1986; 21: 462-72.
30. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes. *J Periodontol.* 1988; 59: 783-93.
31. Kinane DF, Radvar M. A six month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 1999;70:1-7.
32. Lindhe J, Nyman S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1984;11:504–14.
33. Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial compositions and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol.* 1993;64:155-61.
34. Listgarten MA, Lindhe J, Hellden L. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. Clinical, microbiological and histological observations. *J Clin Periodontol.* 1978;5:246-71.

35. Michalowicz BS, Pihlstrom BL, Drisko CL et al. Evaluation of periodontal treatments using controlled-release tetracycline fibers: Maintenance response. *J Periodontol*. 1995;66:708-15.
36. Mombelli A. Clinical parameter: biological validity and clinical utility. *Periodontology 2000*. 2005;39:30-9.
37. Mombelli A, Schmidt B, Rutar A, Lang NP. Persistent patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol*. 2000;71:14-21.
38. Newman MG, Kornman KS, Dopherty FM. A 6 month multi-center evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planning in maintenance patients: clinical results. *J Periodontol*. 1994;65: 685-91.
39. Perinetti G, Paolantonio M, Cordella C, D'Ercole S, Serra E, Piccolomini R: Clinical and microbiological effects of subgingival administration of two active gels on persistent pockets of chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2004; 31: 273– 81
40. Quirynen M, Teughels W, De Soete M, Van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol 2000*. 2002;28:72-90.

41. Radvar M, Pourtagui N, Kinane DF. Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol.* 1996;67:860-5.
42. Ramfjord S, Caffesse R, Morrison E et al. Four modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol.* 1987;14:445-52.
43. Renvert S, Persson GR. A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. *J Clin Periodontol.* 2002;29(Suppl. 3):82-9.
44. Rhemrev GE, Timmerman MF, Veldkamp I, Winkelhoff AJ, Van der Velden U. Immediate effect of instrumentation on the subgingival microflora in deep inflamed pockets under strict plaque control. *J Clin Periodontol.* 2006;33:42-8.
45. Salvi GE, Mombelli A, Rutar A, Suvan J, Garrett S, Lang NP. Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. A randomized clinical trial comparing three biodegradable sustained release polymers. *J Clin Periodontol.* 2002;29:540-50.
46. Sato K, Yoneyama T, Okamoto H, Dahlen G, Lindhe J. The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 1993;20:359–65.

47. Seymour RA, Heasman PA. Tetracyclines in the management of periodontal diseases: a review. *J Clin Periodontol*. 1995; 22: 22-35.
48. Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planning, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol*. 1979;50:495–509.
49. Stabholz A, Nicholas AA, Zimmerman GJ, Wikesjö UM. Clinical and antimicrobial effects of a single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine in deep periodontal pockets. *J Clin Periodontol*. 1998;25:794-800.
50. Stelzel M, Florès-de-Jacoby L. Topical metronidazole application as an adjunct to scaling and root planning. *J Clin Periodontol*. 2000;27:447–52.
51. Trombelli L, Scabbia A, Zangari F, Griselli A, Wikesjö UME, Calura G. Effect of tetracycline HCl on periodontally-affected human root surfaces. *J Periodontol*. 1995; 66: 685-91.
52. Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, De Graaff J. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra and subgingival debridement. *J Clin Peridontol*. 1987;15:116–22.
53. Vandekerckove BNA, Quirynen M, Van Steenberghe D. The use of tetracycline- containing controlled-release fibres in the treatment of refractory periodontitis. *J Periodontol*. 1997;68:353–61;

54. Walker CB, Pappas JD, Tyler KZ, Cohen S, Gordon JM. Antibiotic susceptibilities of periodontal bacteria. In vitro susceptibilities to eight antimicrobial agents. J Periodontol. 1985; 56: 67-74.
55. Wikesjö UM, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. J Periodontal Res. 1986;21:322-9.

8. Anexos

8.1 Aprovação do Comitê de Ética

8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO I

Por este instrumento particular, declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu,

_____,
(idade)_____, (Nacionalidade)_____, (Profissão)_____,
portador do R.G. nº _____ Órgão Expedidor: _____,
C.I.C._____, residente e domiciliado à

_____,
nº_____, Bairro:_____, Cidade:_____, Estado _____,
Tel:_____, prontuário geral nº _____ fui esclarecido sobre

todos os procedimentos de R.A.R. (*Raspagem e Alisamento Radicular*) e I.H.B. (*Instrução de Higiene Bucal*). Se acaso alguma dúvida me restar, o pesquisador responsável, Dra. Joseane Maria Dias Bosco, por esta pesquisa deverá esclarecê-la. Vou me submeter ao tratamento da doença existente em meus dentes, nos termos abaixo relacionados:

1. Como meio auxiliar de tratamento de bolsas periodontais profundas, que restarem após os procedimentos iniciais de R.A.R, será realizada a limpeza da superfície radicular com mini-brush (mini-escova) embebido em um antibiótico local, cloridrato de tetraciclina (100 mg/mL), de nome comercial Tetraclin.®
2. Fui informado que embora anteriormente não tenha manifestado alergia ao medicamento (tetraciclina tópica), caso venha a apresentar qualquer reação, deverei comunicar à pesquisadora qualquer reação ao medicamento, e esta, por sua vez, deverá suspender o tratamento, tomar os procedimentos locais necessários e me encaminhar ao médico.
3. Fui informado que a não necessidade de um tratamento cirúrgico tem como benefícios ausência de sintomas pós-cirúrgicos como a dor, além da necessidade de repouso, mudanças de hábitos alimentares, uso de medicamento pós-operatório, possíveis problemas estéticos decorrentes de recessão gengival e hipersensibilidade dentinária. Como a raspagem é um procedimento conservador, a sua escolha é sempre uma conduta inicial para se conseguir a cura da Doença Periodontal. Para o procedimento de raspagem subgengival, poderá ser necessária a realização de anestésias locais para garantir maior conforto durante o tratamento da doença periodontal. Uma vez que essa doença está relacionada com uma infecção bacteriana, pode haver a necessidade da associação de antibióticos para alcançar o sucesso do tratamento;
4. Fui informado dos benefícios e riscos aos quais estou me submetendo durante esta pesquisa/tratamento, estando consciente e de acordo que o meu consentimento não exime a responsabilidade do profissional que o está executando, tendo este o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante a pesquisa;
5. Esclareço que minha adesão ao presente trabalho de pesquisa/tratamento foi voluntária, sem qualquer tipo de pressão ou coação por parte dos pesquisadores e pessoal de apoio, e que não terei qualquer gasto durante a pesquisa. Estou consciente de que a duração desta pesquisa/tratamento será de 180 (cento e oitenta) dias, devendo ter meu comparecimento semanal e que a não realização de uma boa higiene bucal

- e o não comparecimento às visitas de controle, poderão vir a comprometer seriamente a qualidade do resultado do tratamento a médio e longo prazo;
6. Recebi explicações detalhadas a respeito da minha participação nesse experimento, possuindo plena liberdade para me negar a participar da referida pesquisa a qualquer momento;
 7. Autorizo, portanto, minha participação na pesquisa clínica intitulada: *“Avaliação do controle de biofilme subgengival pela aplicação de solução de tetraciclina com mini-brush, em bolsas periodontais residuais de pacientes com periodontite crônica generalizada, através de parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos nos períodos de 30, 90 e 180 dias”*, concordando com a realização de radiografias, fotografias, exames clínicos, microbiológicos e imunológicos que permitam a observação do resultado do tratamento, o qual poderá vir a ser utilizado com finalidades de material didático (dar aulas) e de divulgação em revistas científicas, brasileiras e estrangeiras;
 8. Foi-me informado de que quando da divulgação e/ou publicação dos dados obtidos na presente investigação, estas serão informações CONFIDENCIAIS, guardadas por força de Sigilo Profissional (Art. 9º do *Código de Ética Odontológica*) sendo minha identidade preservada;
 9. Estou ciente que optei pelo tratamento em pesquisa ao invés do tratamento convencional, realizando a limpeza radicular com mini-brush associado à solução de tetraciclina 100 mg/mL;
 10. Foi-me informado o telefone da pesquisadora responsável na Faculdade: (16) 201-6360 e em sua residência: (16) 3331-2006 para atendimento em eventual intercorrência odontológica ou médica;
 11. Todas essas normas estão de acordo com o *Código de Ética Odontológica*, segundo a resolução C.F.O. 196/96.
 12. Consta o telefone da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para recurso ou reclamações: (16) 201 6432 e 201 6434.

Araraquara, _____ de _____ de 200__.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador Responsável

8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO II

Por este instrumento particular, declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu,

 (idade)_____, (Nacionalidade)_____, (Profissão)_____,
 portador do R.G. nº _____ Órgão Expedidor: _____,
 C.I.C._____, residente e domiciliado à

_____, nº _____,
 Bairro: _____, Cidade: _____, Estado _____,
 Tel: _____, prontuário geral nº _____ fui esclarecido sobre

todos os procedimentos de R.A.R. (*Raspagem e Alisamento Radicular*) e I.H.B. (*Instrução de Higiene Bucal*). Se acaso alguma dúvida me restar, o pesquisador responsável, Dra. Joseane Maria Dias Bosco, por esta pesquisa deverá esclarecê-la. Vou me submeter ao tratamento da doença existente em meus dentes, nos termos abaixo relacionados:

1. Como meio auxiliar de tratamento de bolsas periodontais profundas, que restarem após os procedimentos iniciais de R.A.R, serão realizados novamente a raspagem e o alisamento radicular (método convencional), e também a limpeza da superfície radicular com mini-brush (mini-escova) embebido em soro fisiológico.
2. Fui informado que a não necessidade de um tratamento cirúrgico tem como benefícios ausência de sintomas pós-cirúrgicos como a dor, além da necessidade de repouso, mudanças de hábitos alimentares, uso de medicamento pós-operatório, possíveis problemas estéticos decorrentes de recessão gengival e hipersensibilidade dentinária. Como a raspagem é um procedimento conservador, a sua escolha é sempre uma conduta inicial para se conseguir a cura da Doença Periodontal. Para o procedimento de raspagem subgengival, poderá ser necessária a realização de anestésias locais para garantir maior conforto durante o tratamento da doença periodontal;
3. Fui informado dos benefícios e riscos aos quais estou me submetendo durante esta pesquisa/tratamento, estando consciente e de acordo que o meu consentimento não exime a responsabilidade do profissional que o está executando, tendo este o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante a pesquisa;
4. Esclareço que minha adesão ao presente trabalho de pesquisa/tratamento foi voluntária, sem qualquer tipo de pressão ou coação por parte dos pesquisadores e pessoal de apoio, e que não terei qualquer gasto durante a pesquisa. Estou consciente de que a duração desta pesquisa/tratamento será de 180 (cento e oitenta) dias, devendo ter meu comparecimento semanal e que a não realização de uma boa higiene bucal e o não comparecimento às visitas de controle, poderão vir a comprometer seriamente a qualidade do resultado do tratamento a médio e longo prazo;
5. Recebi explicações detalhadas a respeito da minha participação nesse experimento, possuindo plena liberdade para me negar a participar da referida pesquisa a qualquer momento;
6. Autorizo, portanto, minha participação na pesquisa clínica intitulada: "*Avaliação do controle de biofilme subgengival pela aplicação de solução de tetraciclina com mini-brush, em bolsas periodontais residuais de pacientes com*

- periodontite crônica generalizada, através de parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos nos períodos de 30, 90 e 180 dias”, concordando com a realização de radiografias, fotografias, exames clínicos, microbiológicos e imunológicos que permitam a observação do resultado do tratamento, o qual poderá vir a ser utilizado com finalidades de material didático (dar aulas) e de divulgação em revistas científicas, brasileiras e estrangeiras;*
7. Foi-me informado de que quando da divulgação e/ou publicação dos dados obtidos na presente investigação, estas serão informações CONFIDENCIAIS, guardadas por força de Sigilo Profissional (Art. 9º do *Código de Ética Odontológica*) sendo minha identidade preservada;
 8. Estou ciente que optei pelo tratamento em pesquisa realizando a raspagem em alguns dentes, e em outros o tratamento com mini-brush embebido em soro fisiológico;
 9. Foi-me informado o telefone da pesquisadora responsável na Faculdade: (16) 201-6360 e em sua residência: (16) 3331-2006 para atendimento em eventual intercorrência odontológica ou médica;
 10. Todas essas normas estão de acordo com o *Código de Ética Odontológica*, segundo a resolução C.F.O. 196/96.
 11. Consta o telefone da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para recurso ou reclamações: (16) 201 6432 e 201 6434.

Araraquara, _____ de _____ de 200 ____.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador Responsável

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 12 de março de 2007.

Joseane Maria Dias Bosco