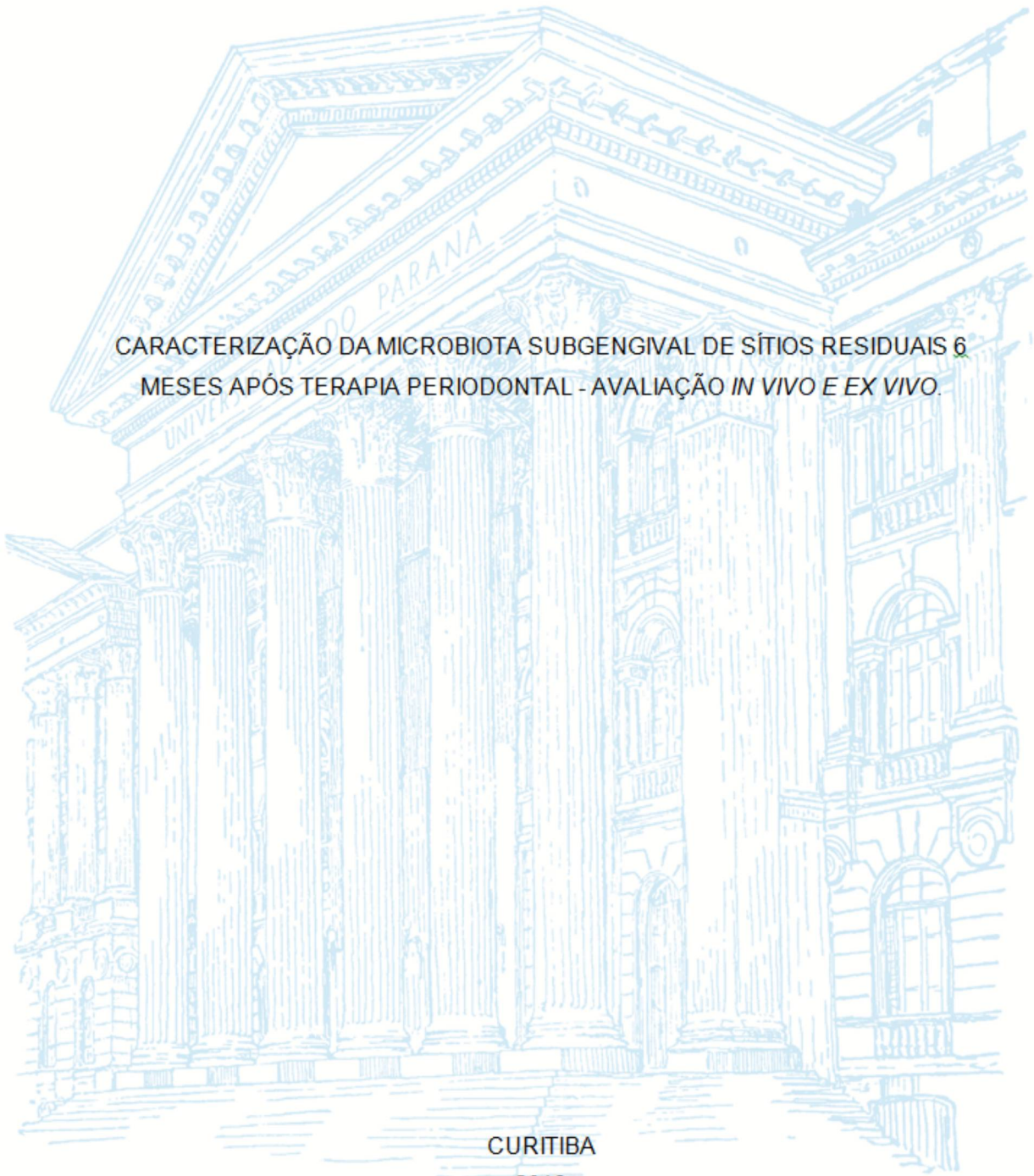


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA ALVES TEIXEIRA RIBAS

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE SÍTIOS RESIDUAIS 6
MESES APÓS TERAPIA PERIODONTAL - AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *EX VIVO*.

CURITIBA
2018



PRISCILA ALVES TEIXEIRA RIBAS

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE SÍTIOS RESIDUAIS 6 MESES APÓS
TERAPIA PERIODONTAL - AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *EX VIVO*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito para defesa no Mestrado em Odontologia.

Orientadora: Geisla Mary Silva Soares

CURITIBA

2018

Ribas, Priscila Alves Teixeira

Caracterização da microbiota subgengival de sítios residuais 6 meses após terapia periodontal - avaliação in vivo e ex vivo [recurso eletrônico] / Priscila Alves Teixeira Ribas - Curitiba, 2018.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2018.
Orientador: Geisla Mary Silva Soares

1. Odontologia. 2. Microbiota subgengival. 3. Terapia periodontal. I. Soares, Geisla Mary Silva. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.632



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **PRISCILA ALVES TEIXEIRA RIBAS**, intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE SÍTIOS RESIDUAIS 6 MESES APÓS TERAPIA PERIODONTAL -AVALIAÇÃO IN VIVO E EX VIVO.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Outubro de 2018.


GEISLA MARY SILVA SOARES(UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)


TATIANA MIRANDA DELIBERADOR(UP)
(Avaliador Externo)


HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO(UFPR)
(Avaliador Interno)

RESUMO

Objetivos: Caracterizar a microbiota de sítios residuais 6 meses após terapia ativa em indivíduos com periodontite crônica generalizada avançada e testar sobre essa microbiota a ação *in vitro* de diferentes antibióticos. **Metodologia:** Voluntários diagnosticados com periodontite crônica generalizada, com idade igual ou superior aos 35 anos, com pelo menos 15 dentes, receberam raspagem e alisamento radicular (RAR) associada ao uso sistêmico de Metronizadol (MTZ) 400 mg e Amoxicilina (AMX) 500 mg, três vezes ao dia por 14 dias. Acompanhamentos após 3 e 6 meses de tratamento foram realizados. Amostras dos biofilmes dos sítios residuais foram coletadas, biofilmes *ex-vivo* foram cultivados e expostos a antibióticos de uso sistêmico. **Resultados:** Todos os pacientes tiveram melhoras clínicas significativas em todos os parâmetros ao longo dos seis meses, no entanto todos permaneceram com sítios periodontais residuais. Redução significativa de espécies bacterianas periodontopatogênicas foram observadas após três meses de acompanhamento e se mantiveram em seis meses. O perfil microbiológico dos sítios residuais foi compatível com o observado em doença, com altos níveis de espécies dos complexos laranja e vermelho. O efeito da Amoxicilina + Clavulanato de Potássio (AMX+CLA) sobre os biofilmes *ex vivo* foi estatisticamente significante superior que o observado com MTZ e com MTZ+AMX. **Conclusão:** A microbiota de sítios residuais permaneceu compatível com o perfil microbiológico encontrado em periodontite ativa. A ação antimicrobiana melhor observada sobre biofilmes cultivados a partir de amostras de sítios residuais foi a associação AMX+CLA.

Palavras-chaves: Sítio residual. Metronizadol. Amoxicilina. Periodontite crônica. Doença periodontal.

ABSTRACT

Objectives: To characterize the microbiota of residual sites 6 months after active therapy in individuals with advanced generalized chronic periodontitis and to test on this microbiota the in vitro action of different antibiotics.

METHODS: Volunteers diagnosed with generalized chronic periodontitis, aged at least 35 years, with at least 15 teeth, received scaling and root planing (SRP) associated with the systemic use of Metronizadol (MTZ) 400 mg and Amoxicillin (AMX) 500 mg, three times a day for 14 days. Follow-up after 3 and 6 months of treatment was performed. Samples of biofilms from the residual sites were collected, ex-vivo biofilms were cultured and exposed to systemic antibiotics.

RESULTS: All patients had significant clinical improvements in all parameters over the six months, however all remained with residual periodontal sites. Significant reduction of periodontopathogenic bacterial species was observed after three months of follow-up and remained in six months. The microbiological profile of the residual sites was compatible with that observed in disease, with high levels of species of the orange and red complexes. The effect of Amoxicillin + Potassium Clavulanate (AMX + CLA) on ex vivo biofilms was statistically significantly higher than that observed with MTZ and MTZ + AMX.

Conclusion: The microbiota of residual sites remained compatible with the microbiological profile found in active periodontitis. The best observed antimicrobial action on biofilms grown from samples from residual sites was the association AMX + CLA.

Keywords: Residual site. Metronizadol. Amoxicillin. Chronic periodontitis. Periodontal disease.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	2
2.1 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
4. METODOLOGIA.....	6
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSSÃO.....	22
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
ANEXOS.....	34

1. INTRODUÇÃO

As periodontites são um grupo de infecções que desencadeiam um processo inflamatório nos tecidos de proteção e sustentação do elemento dentário (LINDHE, 1997) e que possuem como fator etiológico primário as bactérias presentes na cavidade oral, especialmente as que colonizam as superfícies dos dentes supra e subgengivalmente, organizadas em um biofilme complexo (Socransky & Haffajee, 1994). Têm sido consideradas um problema de saúde mundial. Em diversos países, as doenças periodontais superam o percentual de cárie dental na população (Petersen, 2003). Além dos elevados custos para tratamento e restauração das sequelas deixadas após a doença instalada, as infecções bucais podem causar efeitos sistêmicos associados, por exemplo, problemas cardíacos, partos prematuros e doenças reumatológicas (Bahekar et al. 2007, Mealey et al. 2007, Uppal et al. 2010). Por isso a necessidade de se elaborar políticas e programas globais de saúde que possam auxiliar na prevenção e tratamento destas doenças (Petersen & Ogawa 2005).

Socransky et al. (1994) descreveram a técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para diagnóstico microbiológico utilizando sondas de ácido desoxirribonucleico (DNA). Utilizando essa técnica de diagnóstico, esse grupo de pesquisadores avaliou as associações entre 40 espécies bacterianas presentes em 13.261 amostras de biofilme subgengival de 185 indivíduos (160 com periodontite e 25 saudáveis) (Socransky et al., 1998). Os autores descreveram cinco complexos bacterianos principais nas amostras de biofilme subgengival desses indivíduos. Um deles, denominado complexo vermelho, era composto pelas espécies *T. forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, e foi fortemente relacionado com profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem (SS). Outro, denominado complexo laranja, que parece preceder a colonização do complexo vermelho, foi dividido em 2 subgrupos: um central, composto por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e

Parvimonas micra; e outro grupo periférico, formado por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus*. Os outros três complexos, denominados amarelo, verde e roxo demonstraram grande associação entre si e menor associação com os dois primeiros, e são compostos por diversas espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro. Esses seriam os colonizadores primários da superfície dentária. O complexo verde é formado por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetencomitans* sorotipo a. O complexo amarelo é composto por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*; e o complexo roxo inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As espécies *Selenomonas noxia* e *A. actinomycetencomitans* sorotipo b não se correlacionaram com nenhuma outra. Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces oris*) foram agrupadas e consideradas compatíveis com o hospedeiro, relacionadas diretamente com estado de saúde (Socransky & Haffajee, 2002).

2. OBJETIVO GERAL

Os objetivos desse estudo são: caracterizar a microbiota de sítios periodontais que não responderam à terapia periodontal, em indivíduos com periodontite crônica generalizada avançada até 6 meses após terapia, e testar *in vitro* a ação de diferentes antibióticos sobre a microbiota que se manteve presente nesses sítios após 6 meses de acompanhamento.

Para alcançarmos os objetivos propostos, traçamos os objetivos específicos delineados a seguir.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Caracterização da microbiota subgengival de sítios residuais 6 meses após a terapia por meio de cultivo de biofilmes *ex vivo* e pela técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

2.1.2 Cultivar biofilmes *ex vivo* desses sítios residuais.

2.1.2 Testar *in vitro* a ação dos antimicrobianos MTZ, MTZ+AMX, AMX+CLA sobre os biofilmes cultivados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Evidências mostram que a terapia periodontal básica, incluindo raspagem e alisamento radicular (RAR), é efetiva na maioria dos casos de periodontite (Haffajee et al. 1997; Teles et al. 2006). Porém, vários indivíduos tratados apenas com RAR não atingem o resultado clínico esperado e se mantêm em alto risco de progressão da doença após o tratamento (Feres et al. 2012, Matuliene et al. 2008, 2010).

A avaliação de um grupo de indivíduos com acompanhamento com mais de 15 anos após terapia ativa verificou que 13% dos pacientes perderam de 4 a 9 dentes (Hirschfeld & Wasserman, 1978). Em outro estudo, de 100 indivíduos tratados e acompanhados ativamente por 15 anos, pelo menos 9,8% dos dentes foram perdidos (McFall, 1982).

Pacientes que permanecem com bolsas periodontais e sangramento à sondagem após o tratamento periodontal permanecem com doença ativa. Esses locais, que permanecem com sinais da doença, são chamados de bolsas residuais ou sítios residuais. Muitos estudos relatam casos com diferentes nomeações, como periodontite persistente ou periodontite refratária, mas essas denominações estão em desuso e alguns estudos as utilizam com variância de significados (Vandeketvkchove, 1997; Soder et al., 1999, Handal, 2004; Kim, 2006; Aboodi, 2010; Colombo et al., 2012; Zhang 2015).

A presença e o percentual de bolsas residuais após terapia periodontal ativa começaram a ser valorizados quando a presença de sítios residuais começou a ser considerado um dos fatores para definir o risco de progressão da doença (Lang e Tonneti, 2003; Matuliene et al. 2008). Para definir o risco de permanência de bolsas periodontais após a terapia sugeriu-se avaliar também alguns fatores como: as diferenças clínicas de indivíduos tratados com sucesso; a quantidade de microbiota subgengival e níveis de patógenos periodontais; e imunidade do hospedeiro (Colombo et al. 1998).

Diversas terapias, individualmente ou combinadas já foram testadas para tratamento de sítios residuais. RAR + minociclina local (Killeen et al, 2016), terapia fotodinâmica + RAR (Petelin et al. 2015, Cappuyns et al 2012, Lulic et al. 2009), diodo terapia com laser (Cappuyns et al. 2012, Kolbe et al. 2014,); AMX + MTZ (Amoxicilina + Metronidazol) sistêmico (Colombo et al. 2012, Haffajee et al. 2004), Er: YAG laser (Krohn-Dale, 2012), MTZ sistêmico (Soder et al. 1999, Winkel et al. 1997); tetraciclina local (Haffajee et al. 2004, Vandekerckhove et al. 1997), metronidazol e clorexidina locais (Perinetti et al. 2004, Heasman et al. 2001) e tetraciclina sistêmica e minociclina (Kinane & Radvar, 1999). Os efeitos clínicos e microbiológicos dessas terapias foram observados e nenhum alcançou diferença significativa.

A utilização da RAR juntamente com amoxicilina (AMX) e metronidazol (MTZ) sistêmicos para o tratamento inicial das periodontites tem levado a alterações clínicas e microbiológicas significativamente melhores do que as obtidas com RAR somente (Cionca et al. 2010; Feres et al. 2012; Socransky et al. 2013, Soares et al. 2014). Resultados semelhantes também foram observados em terapias adicionais, anteriormente chamados de casos de periodontite refratária (Haffajee et al. 2004).

Alterações microbiológicas também foram observadas em locais que respondem bem à terapia periodontal quando comparados aos locais residuais. Um grupo de indivíduos com sítios periodontais residuais recebeu uma combinação de RAR, tetraciclina localmente em bolsas > 4 mm, AMX sistêmica (500 mg, por 14 dias) + MTZ sistêmico (250 mg, por 14 dias) e remoção semanal da placa supragengival por 3 meses. A monitorização clínica e

microbiológica foi realizada a cada 3 meses após a terapia, durante dois anos. A combinação de terapias causou as reduções de espécies bacterianas, incluindo espécies de *Actinomyces*, espécies do bem como *Streptococcus* ssp., e do "complexo laranja" de Socransky, principalmente durante os três meses iniciais e efeitos clínicos foram observados com variações, mas para todos os indivíduos após os dois anos seguintes (Haffajee et al, 2004). Observou-se que as espécies podem aumentar ou permanecer em alta frequência em sítios residuais, mas foram significativamente reduzidas nos pacientes que responderam bem ao tratamento, como *P.endodontalis*, *P.gingivalis*, *Prevotella*, *T.forsythia*, entre outros.

A presença de bolsas residuais está associada à falta de estabilidade periodontal (Lang & Tonetti 2003, Cionca et al. 2010). De acordo com Lang & Tonetti (2003) e Matuliene et al. (2008, 2010) pacientes apresentando ≥ 9 , 5-8 sítios ou ≤ 4 sítios com PS ≥ 5 milímetros no pós-tratamento são considerados de "alto", "moderado" ou "baixo" risco para o progressão da doença, respectivamente. Por outro lado foi demonstrado que o uso adjunto de MTZ+AMX à RAR leva aos melhores resultados clínicos e microbiológicos, e mantém mais indivíduos em baixo risco para progressão por até 1 ano após terapia (67%), do que apenas a RAR (22%) (Feres et al. 2012, Soares et al. 2014).

O uso do clavulanato de potássio associado à amoxicilina (Clavulin®) também foi demonstrado eficaz no tratamento periodontal, e foi indicado particularmente para infecções por *A. actinomycetemcomitans* (Slots & Ting 2002) e ainda com ação sobre as espécies produtoras de β - lactamase como *Fusobacterium* ssp. e *Prevotella* ssp. (Kuriyama et al. 2007), consideradas importantes na doença periodontal.

Modelos de biofilmes in vitro e ex vivo vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de mimetizar as condições de crescimento presentes na cavidade oral na tentativa de se entender melhor as interações e sucessões microbianas no desenvolvimento do biofilme, e o papel de cada espécie no processo saúde-doença (Belibasakis & Thurnheer 2014; Soares et al. 2015, Prada-López et al. 2015). A utilização desses modelos de biofilme pode auxiliar no melhor

entendimento do microbioma oral e do seu metabolismo, e conseqüentemente contribuir para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas mais efetivas e individualizadas. O modelo de biofilme ex vivo permite a análise detalhada e sistemática dos biofilmes e seus produtos sem a necessidade de múltiplas intervenções nos voluntários, além de testes in vitro.

Existe uma escassez na literatura sobre dados de acompanhamento após 6 meses o término de terapia ativa em sítios residuais, sobre microbiota presente nessas bolsas periodontais, sobre modelos de biofilmes ex vivo e também sobre tratamentos efetivos.

4. METODOLOGIA

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Paraná, CAAE 64705317.5.0000.0102 número 2.043.999.

a) Critérios de exclusão e inclusão:

Para a seleção dos voluntários, foram utilizados os seguintes critérios: Critérios de inclusão: voluntários portadores de periodontite crônica generalizada avançada (Armitage, 1999), com no mínimo 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares e os dentes indicados para extração, mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal, não contíguo, com PS e NIC ≥ 5 mm ou apresentar 30% dos sítios com PS e NIC ≥ 4 mm e SS.

Critérios de exclusão: terapia periodontal prévia subgingival nos últimos 6 meses; gestantes ou lactantes; fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos; pacientes com doenças sistêmicas que pudessem afetar a progressão da doença periodontal; longo prazo de uso de medicamentos anti-inflamatórios ou antibioticoterapia nos últimos seis meses; e casos de alergia ao MTZ e/ou à penicilina.

b) Avaliação clínica:

A amostra de conveniência foi composta por quatro indivíduos. As anamneses foram todas realizadas por um mesmo operador (P.A.T.R). As avaliações dos parâmetros clínicos foram realizados por outro operador (G.M.S.S) através de periograma no início do estudo e após 3 e 6 meses o término na terapia ativa. O operador que realizou os periogramas foi calibrado para PS e NIC, com Kappa de 89%. Parâmetros periodontais foram avaliados em 6 sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual/palatina, lingual/palatina e mésio-lingual/palatina) em todos os dentes, excluindo os terceiros molares utilizando-se uma sonda periodontal tipo Carolina do Norte (Hu- Friedy, Chicago, IL, EUA). Os parâmetros avaliados foram:

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

c) Avaliação microbiológica:

Foram coletadas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e após 3 e 6 meses ao término da terapia ativa, sempre pelo mesmo operador (P.A.T.R). No início do estudo e aos 3 meses os sítios selecionados para coleta de amostra de biofilme foram todos os sítios moderados e profundos (PS \geq 4mm). Aos 6 meses foram coletadas amostras dos sítios residuais (PS \geq 5mm).

Coleta das amostras:

Após a remoção do biofilme supragengival, as amostras de biofilme subgengival foram retiradas com curetas Gracey do tipo minifive 11-12 esterilizadas, posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único golpe de raspagem no sentido ápico-coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais e identificadas, contendo 150 μ L de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 mM EDTA (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil), pH 7,6, e a estas foi acrescentado 100 μ L de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Esses tubos plásticos foram previamente identificados com o código do indivíduo, data e sítio, e após a coleta foram armazenados sob refrigeração a -20°C até as amostras serem analisadas por meio da técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 cepas bacterianas no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da Universidade Guarulhos.

d) Protocolo de tratamento periodontal:

Todo o tratamento periodontal foi realizado por um mesmo operador (P.A.T.R) em todos os pacientes. Inicialmente foi realizada adequação do meio bucal, com fechamento das cavidades com ionômero de vidro restaurador e extrações de raízes residuais. Em seguida, orientação de higiene bucal com

escovação com técnica de Bass Modificada, uso do fio dental, e indicação de escova interdental em caso de necessidade do paciente. Então, terapia ativa com raspagem subgengival e alisamento radicular (RAR) sob anestesia local, que foi realizada em atendimentos de aproximadamente duas horas, dentro do período de 14 dias, com o uso de curetas periodontais do tipo Gracey modelos 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy) em todas as faces dentárias. Todos os pacientes realizaram as RAR por quadrantes, com intervalos de 3 a 4 dias entre os atendimentos. Polimento com taças de borracha e pasta profilática e aplicação tópica de flúor (fluoreto de sódio 2%) em casos de exposições radiculares. Foi orientado aos pacientes que não usassem nenhum tipo de colutório. Além disso, durante todo o período de terapia ativa, houve a cobertura da administração sistêmica de MTZ 400 mg (Flagyl®, Sanofi-Aventis) e AMX 500 mg (Amoxicilina®, Prati-Donaduzzi), três vezes ao dia, por 14 dias. Cada paciente recebeu a prescrição da medicação e orientação sobre a forma de uso antes do início do tratamento e orientação para iniciar a utilização no mesmo dia após o início da RAR. A medicação foi conferida durante e após o término dos 14 dias para certificação do uso completo dos medicamentos, através de mensagens e ligações, além do pedido a cada consulta para se mostrar a cartela de medicação. Finalmente, foi realizada uma reavaliação após um mês do término da terapia ativa e manutenção periodontal 3 e 6 meses após o término da terapia ativa, que consistiu em debridamento de todos os sítios, profilaxia com escova de Robson e pasta profilática, nova instrução de higiene e quando necessário raspagem supra e subgengival com curetas periodontais. A RAR foi considerada necessária em sítios que se mantinham com PS > 3mm e SS.

e) *Checkerboard DNA-DNA hybridization:*

Cepas bacterianas e condições de crescimento:

As cepas bacterianas utilizadas para a realização da técnica fazem parte da biblioteca de bactérias da Universidade Guarulhos. As espécies bacterianas foram cultivadas em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de

sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias necessitam de meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrinado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de Mycoplasma suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Após o cultivo das espécies, o DNA de cada uma foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do random primer digoxigenin labeling kit (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Socransky e Haffajee, 1998; Socransky e Haffajee, 2013).

Preparo das amostras:

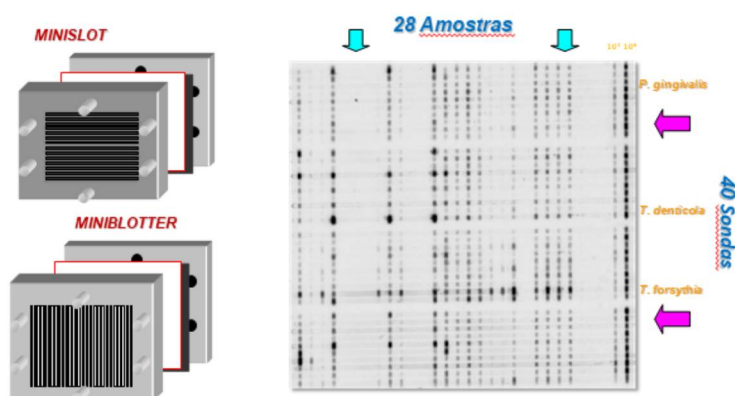
As amostras foram fervidas em banho-maria por 10 minutos, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5M, depositadas nas canaletas do Minislot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e transferidas para a membrana de nylon com carga positiva.

O DNA foi fixado a 120°C por 20 min. Em seguida a membrana foi posicionada no Miniblotter 45 (Immunetics) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do

aparato. Em cada canaleta do Miniblotter 45 foi adicionada uma sonda de DNA marcada com digoxigenina, específica para 40 espécies bacterianas (Socransky et al. 1998). (Fig. 1).

Após o período de hibridização a membrana foi lavada numa solução adstringente. As sondas foram detectadas por anticorpos anti-digoxigenina conjugados com fosfatase alcalina e revelados por quimiluminescência. Os sinais foram convertidos em contagens absolutas por meio da comparação com os controles de 10^5 e 10^6 de cada membrana.

Figura 1 – Checkerboard DNA-DNA hybridization

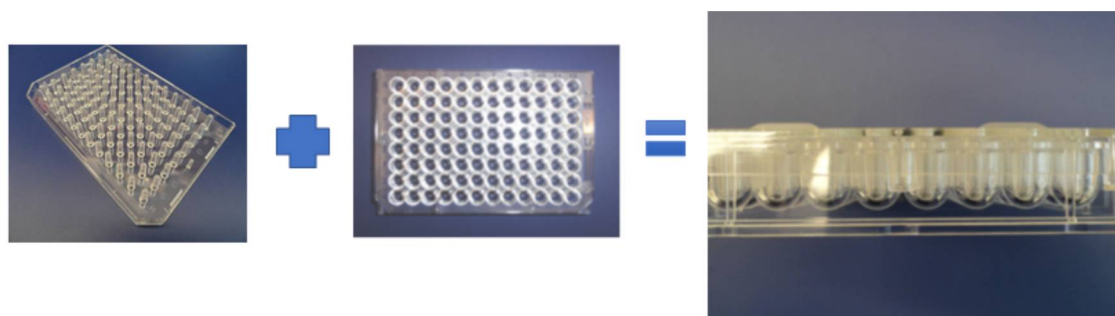


f) Desenvolvimento dos biofilmes *ex vivo*:

As amostras coletadas dos sítios residuais que se mantiveram com PS ≥ 5 mm 6 meses após a terapia ativa foram preparadas para cultivo de biofilmes *ex vivo*. As amostras foram depositadas em tubos contendo 100 μ L de meio de cultura. Dispositivos de Biofilme de Calgari (DBC) (Fig. 2) foram individualmente preparados para cada indivíduo, 45 μ L de meio de cultivo (BHI (Brain heart infusion) + 1% hemina + 5% sangue de ovelha) foram dispensados por poço. Em seguida, 5 μ L de amostra de biofilme foi adicionada a cada poço. Cada placa recebeu uma tampa de cobertura com 96 pinos (NUNC TSP system) (Thermo Scientific. Roskilde, Denmark). Os DBC foram fechados e encubados em anaerobiose usando o sistema

BD GasPak™ EZ (Becton Dickinson, Sparks, MD) à 37°C em estufa por 10 dias. No quarto e no sétimo dias de cultivo a tampa do DBC contendo os biofilmes foram transferidos para uma nova placa de 96 poços contendo meio de cultura fresco. No décimo dia de cultivo foram coletados quatro pinos contendo os biofilmes para determinação do conteúdo microbiano através da técnica de *checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 cepas bacterianas. Os demais biofilmes foram encaminhados para testes antimicrobianos.

Figura 2 - Dispositivos de Biofilme de Calgari(DBC) formado por uma tampa contendo 96 pinos e uma placa com 96 poços, que se encaixam.



g) Processamento dos biofilmes *ex vivo*:

Os pinos contendo biofilmes extraídos do DBC e analisados por *checkerboard DNA-DNA hybridization* foram lavados duas vezes em solução 1% PBS e em seguida depositados em tubos plásticos individuais contendo 100µL de solução tampão TE (10µM Tris-HCL, 1 mM EDTA e 100 µL de NaOH 0,5 M foi adicionado). De cada paciente foram selecionados os 4 sítios mais profundos.

h) Exposição aos antimicrobianos:

Os biofilmes com 10 dias de crescimento foram expostos aos antimicrobianos comprados comercialmente e diluídos em BHI. A exposição foi de MTZ (MP Biomedicals LLC 155710), AMX+clavulanato de potássio(clavulin)

e MTZ+AMX(MP Biomedicals, LLC 190145) por 36 horas na mesma condição atmosférica onde foram crescidos, também à 37°C. Cada antibiótico usado na concentração observada em fluido gengival crevicular quando usados sistemicamente: 10 µg/ml de MTZ (Pahkla et al. 2005), 4 µg/ml de AMX, e 0.4 µg/ml de clavulanato de potássio (Tenenbaum et al. 1997). Em condição foi realizada em quadruplicata. Após exposição os pinos contendo os biofilmes foram extraídos do DBC e o conteúdo bacteriano foi estabelecido pela técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

i) Análise estatística:

Dados clínicos:

A análise de cada parâmetro clínico foi realizada por indivíduo. Alterações em PS e NIC em sítios inicialmente com PS 4-6mm e ≥7mm ou a média/percentual de sítios com PS ≥5mm, ≥6mm, ≥7mm e ≥8mm foram calculados separadamente dentro de cada categoria de PS por indivíduo e entre os indivíduos.

Dados microbiológicos:

Nas amostras processadas por *checkerboard DNA-DNA hybridization* os sinais obtidos foram convertidos para contagens absolutas de acordo com os controles de 10⁵ e 10⁶ células. Esses dados foram expressos em contagens (níveis) das sondas de DNA. Os níveis (x 10⁴) foram computados por indivíduo em cada tempo do estudo. As diferenças significativas ao longo do tempo foram determinadas pelo teste Friedman e entre os indivíduos, em cada tempo, pelo teste Kruskal-Wallis.

Após os testes antimicrobianos a composição de cada biofilme foi determinada em contagens (níveis), como realizado com as amostras colhidas dos pacientes. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste Kruskal-Wallis.

A significância estatística foi estabelecida em 5% (p<0,05). Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas. Foi

aplicada a fórmula $0,05 = 1 - (1 - K)^{40}$, onde k é o valor equivalente ao $p < 0,05$ quando ajustado para a comparação de 40 bactérias. Desta forma, as diferenças detectadas no presente estudo foram consideradas significativas quando $p < 0,00125$ ($p < 0,05$), como proposto por Socransky et al. (1991).

5. RESULTADOS

Adesão dos pacientes ao tratamento e efeitos adversos

O estudo foi conduzido entre julho de 2017 e janeiro de 2018. Quatro pacientes foram incluídos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Nenhum efeito adverso em relação ao tratamento foi relatado ou observado pelos pacientes durante a terapia ativa e uso dos antibióticos sistêmicos, e não foi relatado dificuldade para uso da medicação.

As características sócio-demográficas dos indivíduos estão apresentadas na tabela 1. Dos quatro participantes três eram do sexo masculino e um do sexo feminino, com idade média de 51 ± 35 anos de idade.

Tabela 1. Distribuição de frequência das variáveis demográficas

Paciente	Idade	Sexo (M/F)	Raça	Educação
1	35	M	Leucoderma	Primária
2	39	F	Parda	Primária
3	42	M	Leucoderma	Primária
4	51	M	Leucoderma	Primária

Resultados Clínicos

A Tabela 2 apresenta a média dos parâmetros clínicos no início do tratamento e 3 e 6 meses após o término da terapia ativa. Nenhuma diferença

significativa foi observada entre os indivíduos no início do estudo. Os quatro pacientes alcançaram melhoras significativas em todos os parâmetros após 3 meses que se mantiveram ao longo dos seis meses.

Tabela 2. Média ou proporção (%) : erro padrão dos parâmetros clínicos nos tempos de acompanhamento.

Tempo	Variável			
	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	SS (%)
0	70,3 : 0,002a	3,62: 0,08a	3,64: 0,09a	47 : 0,01a
1	34,4 : 0,02b	2,58: 0,04b	3,16: 0,06b	5 : 0,00b
2	32,1 : 0,02b	2,61: 0,04b	3,21: 0,07b	4 : 0,00b

IP: índice de placa, PS: profundidade de sondagem, NIC: nível de inserção clínica, SS: sangramento à sondagem, 0: inicial, 1: 3 meses, 2: 6 meses. Letras diferentes significam diferenças estatísticas significantes entre os tempos ($p \leq 0,05$).

O risco de progressão da doença periodontal após o término do tratamento foi avaliado de acordo com a quantidade de sítios residuais (Lang & Tonetti, 2003; Matuliene et al. 2008). Dos quatro pacientes tratados todos reduziram a quantidade de sítios residuais. Sendo que um paciente permaneceu com alto de risco de progressão de perda de inserção e progressão da doença periodontal, com mais de 9 sítios com profundidade de sondagem ≥ 5 mm e três pacientes alcançaram moderado risco de progressão da doença, com 6 sítios com $PS \geq 5$ mm.

Tabela 3. Número de sítios totais e em diferentes PS no início e após 6 meses do termino da terapia ativa.

	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3		Paciente 4	
	Início	6 meses	Início	6 meses	Início	6 meses	Início	6 meses
Total de sítios	162		132		168		120	
PS\geq5	25	12*	66	6*	41	11*	26	11*
PS\geq6	19	9*	44	1*	25	4*	11	4*
PS\geq7	14	6*	20	0*	15	1*	5	3
PS\geq8	12	1*	6	0*	6	0*	2	2

PS: Profundidade de sondagem. * Indica diferença estatística significativa, $p < 0,05$, obtidas entre os tempos.

Resultados Microbiológicos

O perfil microbiológico dos sítios que permaneceram residuais após a terapia periodontal está demonstrado na figura 4. A média de contagem ($\times 10^4$) de cada espécie bacteriana foi analisada nos tempos inicial e 6 meses após a terapia ativa. No início do estudo foi observado um perfil compatível com doença, com altos níveis de espécies dos complexos laranja e vermelho (Socransky et al. 1998). Aos 6 meses após a terapia ativa observou-se redução da maioria das espécies. A média ($\times 10^4$) de espécies compatíveis com saúde como *Actinomyces* e as do complexo verde (Socransky et al. 1998) aumentaram em contagem, já periodontopatógenos como *P. gingivalis* e *T. denticola* tiveram suas contagens reduzidas.

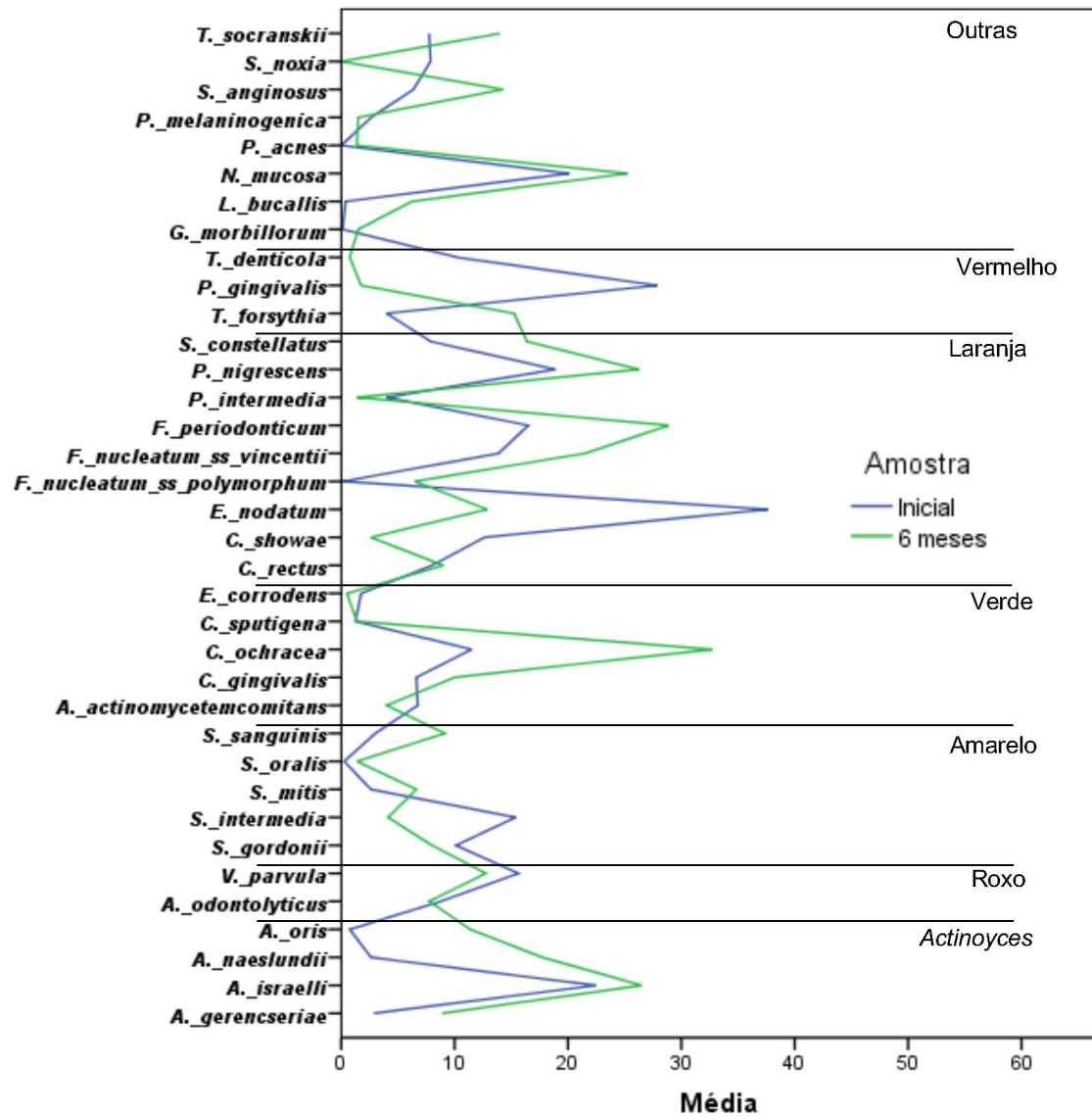
A figura 5 apresenta o perfil microbiano dos biofilmes cultivados antes e após os testes antimicrobianos. A partir das amostras dos biofilme subgingival coletadas dos sítios residuais 384 biofilmes *ex vivo* foram cultivados. Biofilmes com 10 dias de cultivo foram coletados para a definição da microbiota cultivada e todas as espécies bacterianas observadas nos biofilmes subgingivais foram mantidas nos biofilmes *ex vivo*. Os testes antimicrobianos alteraram a microbiota dos biofilmes, MTZ e MTZ+AMX permitiram o aumento da média de contagem da maioria das espécies avaliadas e a associação AMX+CLA causou uma redução estatisticamente significante maior do que o MTZ e o MTZ+AMX.

Na figura 6 é demonstrado as diferenças da média de contagem ($\times 10^4$) das espécies dos *Actinomyces*, entre os tempos. A média de todas as amostras coletadas, sendo incluídas entre 10 a 12 sítios rasos, moderados e profundos do início e após 6 meses terapia ativa. Já nas amostras dos sítios residuais coletados após 6 meses de terapia ativa e cultivados *ex vivo* observa-se nos biofilmes (BL) e após os testes antimicrobianos, sendo que a ação com redução estatisticamente significante maior foi observada com a exposição dos

biofilmes à AMX+CLA quando comparados com os biofilmes expostos ao MTZ+AMX e ao MTZ.

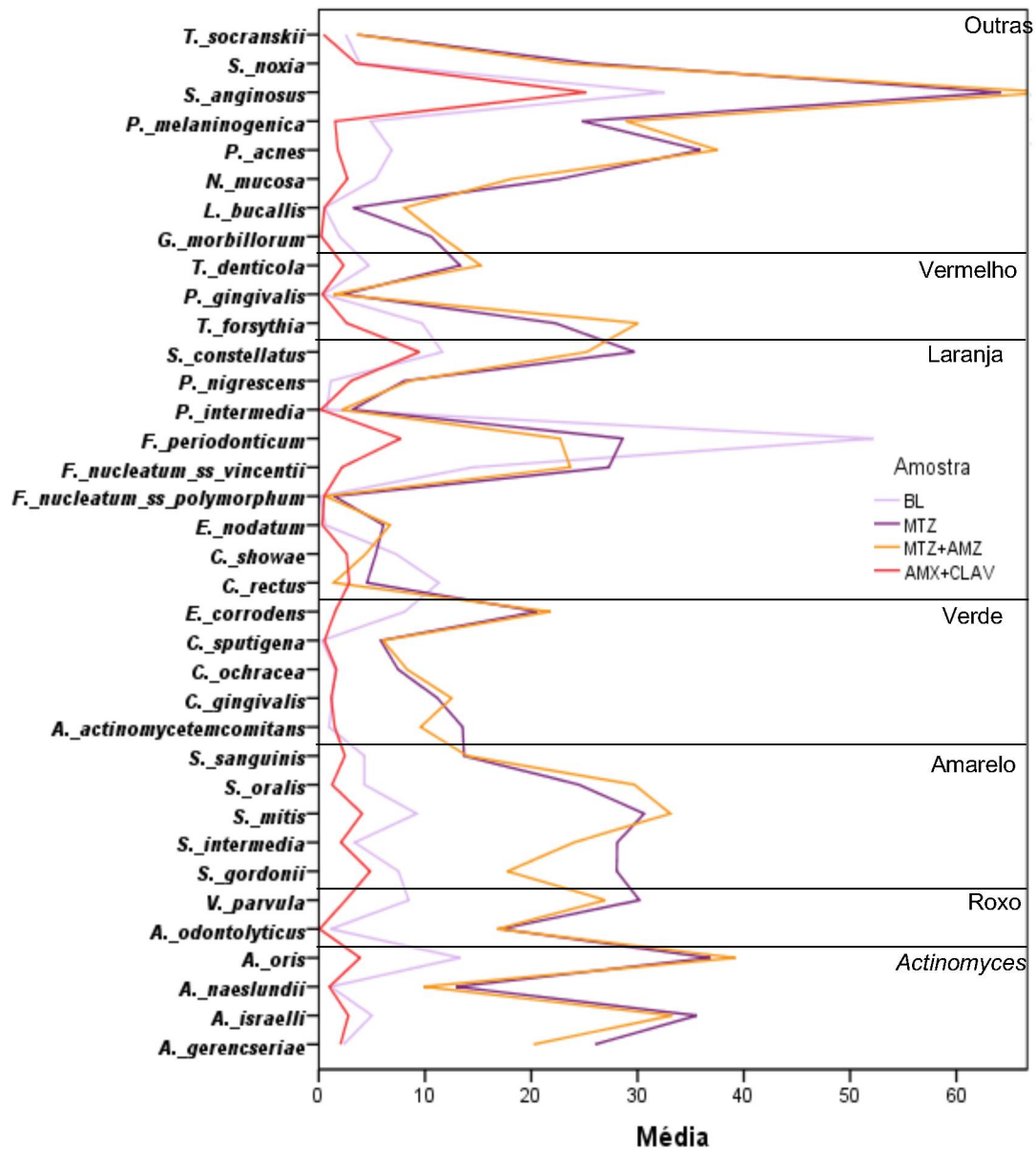
As figuras 7 e 8 apresentam as diferenças da média de contagem ($\times 10^4$) das espécies do complexo vermelho e laranja (Socransky et al. 1998) respectivamente, entre os tempos e nos biofilmes *ex vivo*. Essas espécies bacterianas foram estatisticamente mais reduzidas quando os biofilmes foram expostos a AMX + CLA quando comparados aos expostos ao MTZ ou MTZ+AMX.

Figura 4 - Média de contagem ($\times 10^4$) de cada espécie bacteriana nos sítios residuais analisada tempos inicial e 6 meses após a terapia ativa.



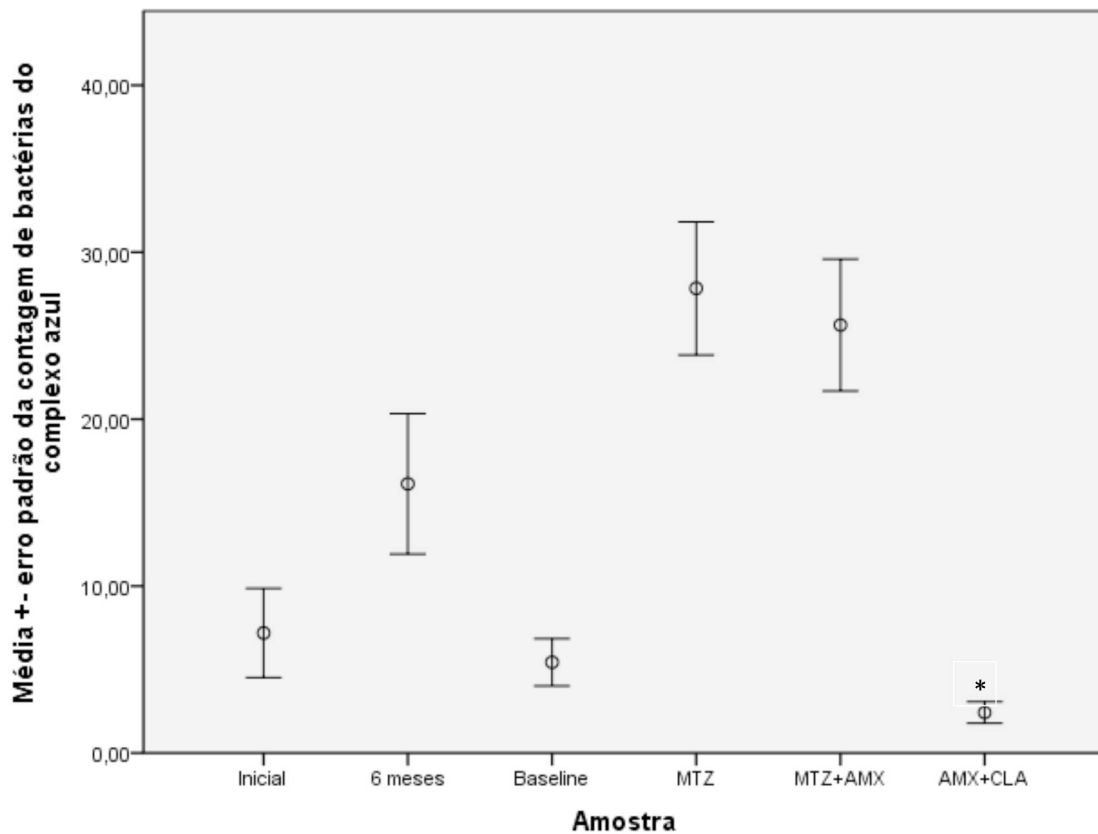
Espécies bacterianas organizadas em complexos de acordo com Socransky et al. 1998.

Figura 5 - Média de contagem ($\times 10^4$) de cada espécie bacteriana nos sítios residuais analisada no biofilme em baseline e após testes microbianos com MTZ, MTZ+AMX e AMX+CLA.



E
 espécies bacterianas organizadas em complexos de acordo com Socranksy et al. 1998.

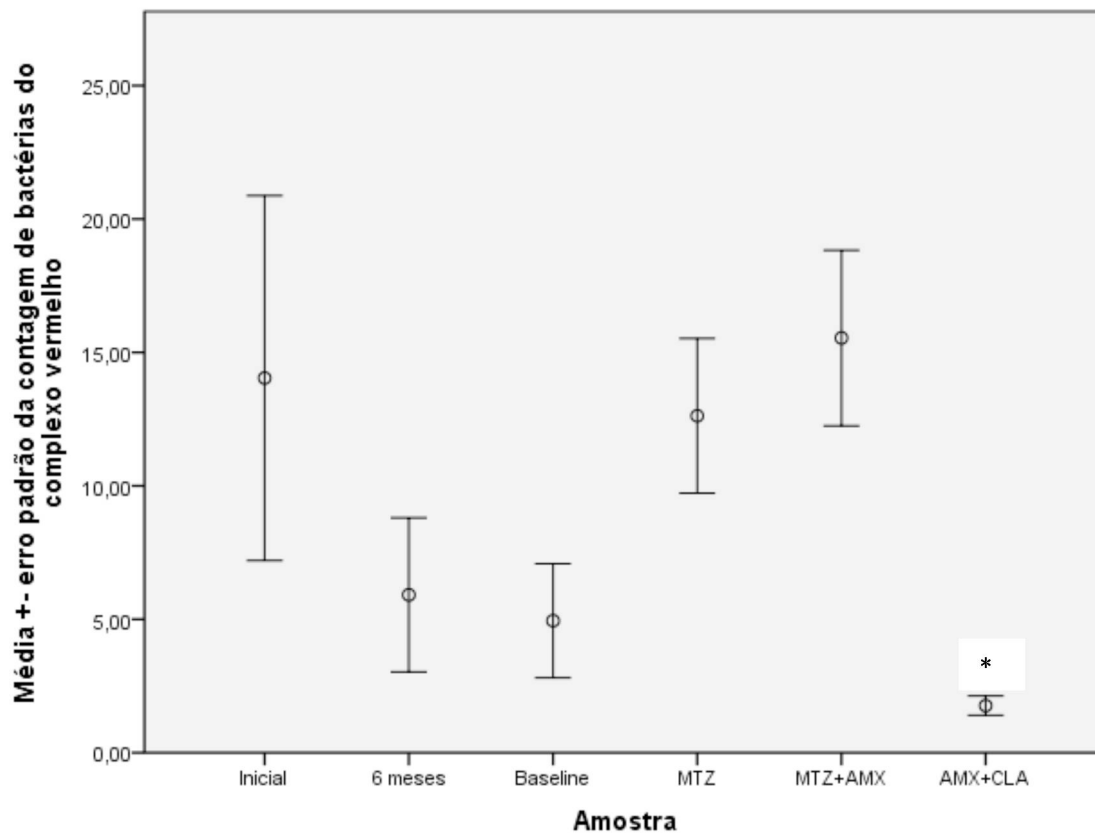
Figura 6 - Média ($\times 10^4$) e erro padrão da contagem dos *Actinomyces* nos diferentes tempos e nos biofilmes *ex vivo*. Composição nas amostras de biofilme coletadas os tempos inicial e 6 meses e composição nos biofilmes cultivados *in vitro* durante 10 (baseline) dias e após os testes antimicrobianos.



MTZ: Metronidazol; MTZ+AMX: Metronidazol+Amoxicilina; AMX+CLA: Amoxicilina+Clavulanato de Potássio.

*diferença estatisticamente significativa.

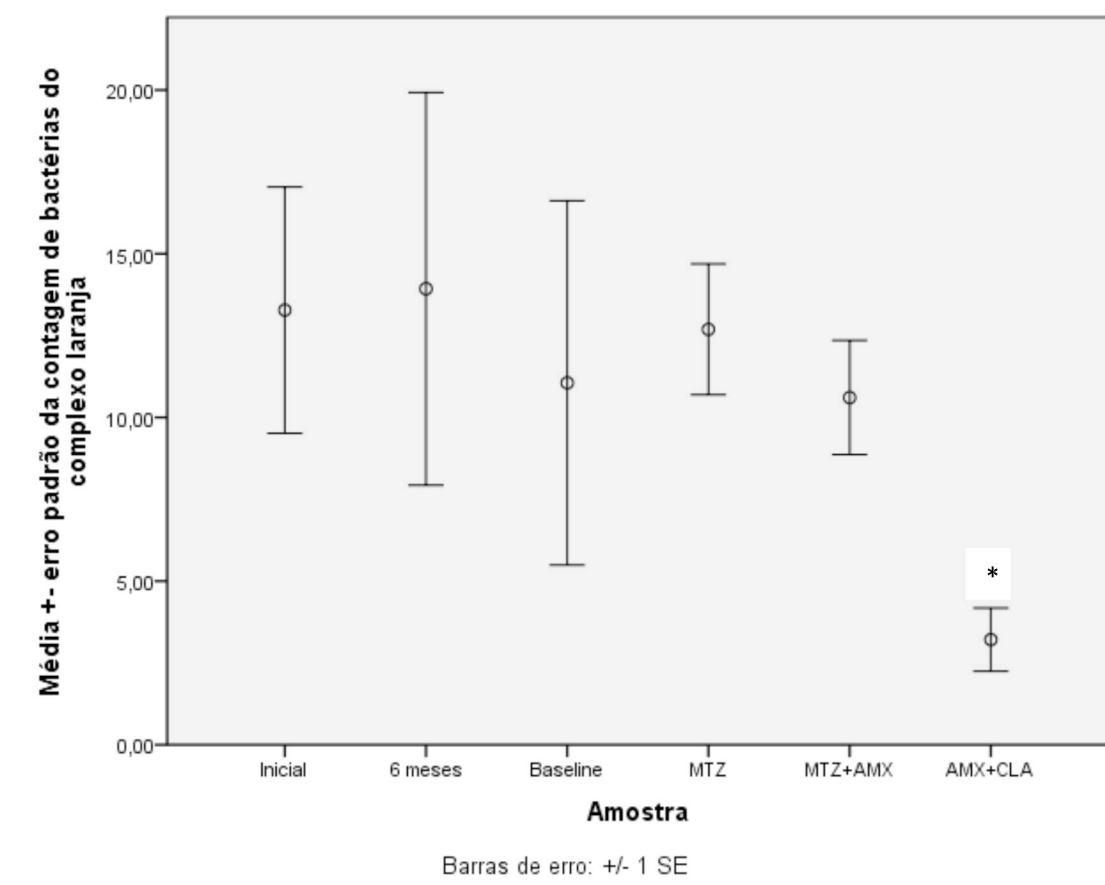
Figura 7 - Média ($\times 10^4$) e erro padrão da contagem das bactérias do complexo vermelho nos diferentes tempos e nos biofilmes *ex vivo*. Composição nas amostras de biofilme coletadas os tempos inicial e 6 meses e composição nos biofilmes cultivados *in vitro* durante 10 (baseline) dias e após os testes antimicrobianos.



MTZ: Metronidazol; MTZ+AMX: Metronidazol+Amoxicilina; AMX+CLA:Amoxicilina+Clavulanato de Potássio.

*diferença estatisticamente significante.

Figura 8 - Média ($\times 10^4$) e erro padrão da contagem das bactérias do complexo laranja (Socransky et al. 1998) nos diferentes tempos e nos biofilmes *ex vivo*. Composição nas amostras de biofilme coletadas os tempos inicial e 6 meses e composição nos biofilmes cultivados *in vitro* durante 10 (baseline) dias e após os testes antimicrobianos.



MTZ: Metronidazol; MTZ+AMX: Metronidazol+Amoxicilina; AMX+CLA: Amoxicilina+Clavulanato de Potássio.

*diferença estatisticamente significativa.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo definiu o perfil microbiológico de sítios residuais de pacientes portadores de periodontite crônica generalizada avançada (Armitage,

1999) que foram submetidos a terapia periodontal ativa com RAR associada com uso sistêmico de MTZ (400mg) + AMX (500mg) (Figura 4). A escolha da terapia ativa utilizada está de acordo com a literatura, que relata que pacientes portadores de periodontite crônica avançada generalizada (Armitage, 1999) não alcançam efeitos clínicos tão satisfatórios quanto em casos de periodontite moderada ou leve (Armitage et al. 1999), permanecendo com quantidade de sítios residuais que os colocam em risco para a progressão da doença (Teles et al. 2006, Feres et al. 2012, Soares et al. 2014) e portanto, muitas vezes entram em um grupo de pacientes que precisam de novas terapias ativas (Feres et al. 2012). O uso de medicação sistêmica adjunta à RAR tem se mostrado a melhor opção para a redução da presença de sítios residuais (Feres et al. 2015, Feres et al. 2012, Colombo et al., 2012, Haffajee et al., 2004, Soder et al., 1999, Winkel et al., 1997). A terapia periodontal realizada promoveu melhoras clínicas significantes estatisticamente em todos os pacientes. Nenhum paciente apresentou complicações ou efeitos adversos. No entanto, corroborando com a literatura, mesmo associando medicação sistêmica alguns pacientes permanecem em moderado ou elevado risco de continuar apresentando perda de inserção periodontal (Tabela 3) (Feres et al. 2012, Soares et al. 2014).

O perfil microbiológico subgingival dos pacientes no início do estudo foi compatível com o perfil microbiológico de doença sugerido na literatura, com altos índices de espécies dos complexos laranja e vermelho (Teles et al. 2006). E, ao término do tratamento, espécies periodontopatogênicas foram reduzidas em contagem (Figura 4). Ao mesmo tempo, espécies bacterianas compatíveis com saúde, como *Actinomyces* e as do complexo verde (Socransky et al. 1998) aumentaram em contagem após 6 meses de terapia ativa, estando de acordo a literatura que tem demonstrado essa alteração de perfil microbiológico associada à melhora clínica da doença periodontal (Soares et al. 2014). No entanto, ao nosso conhecimento o perfil microbiano de sítios residuais está sendo apresentado pela primeira vez.

A partir das amostras de biofilmes coletadas dos sítios residuais biofilmes *ex vivo* foram cultivados. Quarenta espécies bacterianas foram

identificadas nos biofilmes cultivados. O cultivo de biofilmes *in vitro* tem sido um dos grandes desafios para o entendimento da microbiota subgengival (Teles et al. 2006). No presente estudo todas as espécies bacterianas observadas nos biofilmes subgengivais foram cultivadas *ex vivo*. Um resultado muito positivo frente às importantes necessidades nutricionais e atmosférica de algumas cepas, como nos casos da *T. denticola* e *T. forsythia*. O entendimento aprofundado sobre os efeitos clínicos e microbiológicos da terapia periodontal ainda é incompleto na literatura, principalmente nos casos mais avançados, como em sítios periodontais mais profundos (Teles et al. 2006). Tem se demonstrado que além das diferenças na reação de cada indivíduos, ou seja, na resposta do hospedeiro, a microbiota também tem suas especificidades (Socransky & Haffajee, 2013).

O controle mecânico do biofilme supragengival é considerado fator fundamental para o tratamento periodontal, há décadas o controle pelo paciente para manter baixos índices de biofilme supragengival é fator básico, primário e essencial para o tratamento das periodontites (Haffajee et al. 2003). No entanto ao longo do tempo de acompanhamento muitos indivíduos perdem a motivação e reduzem os cuidados de higiene oral, como o demonstrado no presente estudo onde um dos indivíduos chegou há 6 meses de acompanhamento com IPV de aproximadamente 36% (Tabela 2). A contínua manutenção e motivação dos pacientes tratados são fundamentais para a permanência da saúde periodontal (Matuliene et al. 2008, 2010). Indivíduos que permanecem com sítios residuais ao longo do tempo precisam ser acompanhados de forma diferente dos pacientes que respondem bem a terapia periodontal e entram em fase manutenção periodontal, visto que pacientes com sítios com PS \geq 5mm apresentam maior dificuldade controle de biofilme nessas regiões, já que a alteração no biofilme supragengival, através da higiene oral diária, não altera profundamente esses sítios. Os cuidados diários precisam ser mais efetivos para dificultar o estabelecimento de um biofilme compatível com doença. Dessa forma esses pacientes precisam de acompanhamento e manutenção mais frequentemente do que os que ficam livres de sítios residuais.

Os testes antimicrobianos realizados sobre os biofilmes *ex vivo* analisaram os efeitos antimicrobianos sobre essa microbiota de sítios periodontais que permanecem ativos mesmo após a terapia ativa e períodos de manutenção. Alterações no perfil microbiológico dos biofilmes foram claramente observadas. Sendo que a exposição à AMX+CLA foi a condição que causou maior redução em contagem dos biofilmes, com diferença significativa em relação aos outros antimicrobianos (Figura 5). Slots e Ting (2002) e Kuriyama et al. (2007) observaram a ação dessa associação antimicrobiana sobre espécies bacterianas consideradas possíveis patógenos, o mesmo foi observado no presente estudo (Figuras 7 e 8) quando reduções estatisticamente significantes foram observadas tanto em espécies do complexo laranja, quanto do vermelho. Por outro lado, em estudos anteriores (Feres et al. 2012, Soares et al. 2014, Soares et al. 2015) foram observados tanto *in vivo* quanto *in vitro* o efeito antimicrobiano do MTZ e MTZ+AMX, diferentemente do presente estudo, que embora tenha observado aumento em contagem dos *Actinomyces*, como nesses estudos anteriores, pequena ação antimicrobiana foi observada sobre espécies do complexo laranja e nenhuma, sobre o complexo vermelho. Embora metodologia diferentes tenham sido utilizadas, como o uso de biofilmes *ex vivo* no presente estudo e *in vitro* no estudo de Soares et al. (2015), podemos considerar um ponto fraco do presente estudo a falta de um grupo controle com biofilmes *ex vivo* cultivados a partir de amostras de biofilmes de pacientes que não tivessem recebido terapia antibiótica associada à RAR, com o objetivo de observar se o efeito de uma primeira exposição dos biofilmes aos antibióticos pode ser diferente de repetidas exposições; além de um controle negativo, somente com placebo sobre os biofilmes cultivados.

Bactérias que apresentam a capacidade de produção de betalactamase são naturalmente resistentes a amoxicilina, pois possuem um anel betalactâmico em sua fórmula e a betalactamase quebra esse anel. Com o clavulanato de potássio essas bactérias são impedidas de quebrar essa molécula e com isso perdem a capacidade de resistência. Dessa forma o uso

do CLA tem a capacidade de ação sobre um número maior de bactérias do que a AMX sozinha (Andersen, 1990; Rotondo et al. 2017).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microbiota de sítios residuais se mostrou compatível com perfil microbiológico encontrado em periodontite, com alta prevalência de periodontopatógenos.

O uso do MTZ e MTZ+AMX sobre os biofilmes cultivados a partir de biofilmes *ex vivo* dos sítios residuais favoreceu o aumento em contagens de espécies bacterianas compatíveis com saúde, mas não foram efetivos em reduzir periodontopatógenos, já a associação de AMX+CLA causou as maiores reduções em contagem de todas as espécies cultivadas.

REFERÊNCIAS

ABOODI G.M, GOLDBERG M.B, GLOGAUER M. Refractory periodontitis population characterized by a hyperactive oral neutrophil phenotype. *J Periodontol.* 2011 May;82(5):726-33. doi: 10.1902/jop.2010.100508. Epub 2010 Nov 16.

ANDERSEN BM. Bacterial resistance against beta-lactam antibiotics. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1990 Oct 20;110(25):3233-9.

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. *Ann Periodontol, Chicago,* v. 4, n.1, p. 1-6, Dec. 1999.

BAHEKAR A.A, SINGH S, SAHA S, MOLNAR J, ARORA R. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *Am Heart J.* 2007;154:830–837.

BELIBASAKIS G.N, THURNHEER T. Validation of antibiotic efficacy on in vitro subgingival biofilms. *J Periodontol.* 2014 Feb;85(2):343-8. doi: 10.1902/jop.2013.130167. Epub 2013 May 9.

CAPPUYNS I, CIONCA N, WICK P, GIANNOPOULOU C, MOMBELLI A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2012 Sep;27(5):979-86. doi: 10.1007/s10103-011-1027-6.

CIONCA N, GIANNOPOULOU C, UGOLOTTI G, MOMBELLI A. Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planning with or without amoxicillin/metronidazole in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010; 81:15–23.

COLOMBO A.P, HAFFAJEE A.D, DEWHIRST F.E, PASTER B.J, SMITH C.M, CUGINI M.A, SOCRANSKY S.S. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):169-80.

COLOMBO A.P, BENNET S, COTTON S.L, GOODSON J.M, KENT R, HAFFAJEE A.D, SOCRANSKY S.S, HASTURK H, VAN DYKE T.E, DEWHIRST F.E, PASTER B.J. Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol.* 2012 Oct;83(10):1279-87. Epub 2012 Feb 10.

FERES M, SOARES G.M.S, MENDES J.A.V, SILVA M.P, FAVERI M, TELES R, SOCRANSKY S.S, FIGUEIREDO L.C. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebocontrolled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2012; 39, 1149–1158.

HAFFAJEE A.D, CUGINI M.A, DIBART S, SMITH C, KENT R.L JR, SOCRANSKY S.S. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:767- 776.

HAFFAJEE A.D, ARGUELLO E.I, XIMENEZ-FYVIE L.A, SOCRANSKY S.S. Controlling the plaque biofilm. *Int Dent J.* 2003;53 Suppl 3:191-9.

HAFFAJEE A.D, UZEL N.G, ARGUELLO E.I, TORRESYAP G, GUERRERO D M, SOCRANSKY S.S. Clinical and microbiological changes associated with the use of combined antimicrobial therapies to treat "refractory" periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004 Oct;31(10):869-77.

HANDAL T, OLSEN I, WALKER C.B, CAUGANT D.A. b-Lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiology Immunology* 2004; 19: 303–308

HEASMAN P.A, HEASMAN L, STACEY F, MCCRACKEN G.I. Local delivery of chlorhexidine gluconate (PerioChip) in periodontal maintenance patients. *J Clin Periodontol.* 2001 Jan;28(1):90-5.

HIRSCHFELD L, WASSERMAN B. A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol.* 1978 May;49(5):225-37.

KILLEEN A.C, HARN J.A, ERICKSON L.M, YU F, REINHARDT R.A. Local Minocycline Effect on Inflammation and Clinical Attachment During Periodontal Maintenance: Randomized Clinical Trial. *J Periodontol.* 2016 Oct;87(10):1149-57. doi: 10.1902/jop.2016.150551. Epub 2016 Jun 5.

KIM D.M, RAMONI M.F, NEVINS M, FIORELLINI J.P. The Gene Expression Profile in Refractory Periodontitis Patients. *J Periodontol*, June 2006, vol 67.

KINANE D.F, RADVAR M. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol.* 1999 Jan;70(1):1-7.

KOLBE M.F, RIBEIRO F.V, LUCHESI V.H, CASARIN R.C, SALLUM E.A, NOCITI F.H JR, AMBROSANO G.M, CIRANO F.R, PIMENTEL S.P, CASATI M.Z. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2014 Aug;85(8):e277-86. doi: 10.1902/jop.2014.130559. Epub 2014 Feb 21.

KROHN-DALE I, BØE O.E, ENERSEN M, LEKNES K.N. Er:YAG laser in the treatment of periodontal sites with recurring chronic inflammation: a 12-month

randomized, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2012 Aug;39(8):745-52. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01912.x. Epub 2012 Jun 13.

KURIYAMA T, WILLIAMS D.W, YANAGISAWA M, IWAHARA K, SHIMIZU C, NAKAGAWA K, YAMAMOTO E, KARASAWA T. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 285–288.

LANG N.P, TONETTI M.S. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health & Preventive Dentistry*. 2003; 1, 7–16.

LULIC M, LEIGGENER G.I, SALVI G.E, RAMSEIER C.A, MATTHEOS N, LANG N.P. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009 Aug;36(8):661-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01432.x. Epub 2009 Jun 25.

MATULIENE G, PJETURSSON B.E, SALVI G.E, SCHMIDLIN K, BRÄGGER U, ZWAHLEN M, LANG N.P. Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: Results after 11 years of maintenance. *J Clin Periodontol*. 2008; 35, 685-695.

MATULIENE G, STUDER R, LANG N.P, SCHMIDLIN K, PJETURSSON B.E, SALVI G.E, BRÄGGER U, ZWAHLEN M. Significance of periodontal risk assessment in the recurrence of periodontitis and tooth loss. *J Clin Periodontol*. 2010; 37, 191–199.

MCFALL W.T JR. Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. A long-term study. *J Periodontol*. 1982 Sep;53(9):539-49.

MEALEY B.L, OCAMPO G.L. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;44:127–153.

PÄHKLA E.R, KOPPEL T, SAAG M, PÄHKLA R. Metronidazole concentrations in plasma, saliva and periodontal pockets in patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005 Feb;32(2):163-6.

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 Apr;31(4):273-81.

PETELIN M, PERKIČ K, SEME K, GAŠPIRC B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2015 Aug;30(6):1647-56. doi: 10.1007/s10103-014-1632-2. Epub 2014 Jul 24.

PETERSEN P.E. The world oral health report: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Program. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003; 31 (Suppl.1):3-24.

PETERSEN P.E, OGAWA H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol.* 2005 Dec;76(12):2187-93.

PRADA-LÓPEZ I, QUINTAS V, CASARES-DE-CAL M.A, SUÁREZ-QUINTANILLA J.A, SUÁREZ-QUINTANILLA D, TOMÁS I. Ex vivo vs. in vivo antibacterial activity of two antiseptics on oral biofilm. *Front Microbiol.* 2015 Jul 2;6:655. doi: 10.3389/fmicb.2015.00655. eCollection 2015.

ROTONDO CM, WRIGHT GD. Inhibitors of metallo- β -lactamases. *Curr Opin Microbiol.* 2017 Oct;39:96-105. doi: 10.1016/j.mib.2017.10.026. Epub 2017 Nov 16.

SLOTS J & TING M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2002; 28:106–176.

SOARES G.M, MENDES J.A, SILVA M.P, FAVERI M, TELES R, SOCRANSKY S.S, WANG X, FIGUEIREDO L.C, FERES M. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2014 Apr;41(4):366-76.

SOARES G.M, TELES F, STARR JR, FERES M, PATEL M, MARTIN L, TELES R. Effects of azithromycin, metronidazole, amoxicillin, and metronidazole plus amoxicillin on an in vitro polymicrobial subgingival biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 May;59(5):2791-8. doi: 10.1128/AAC.04974-14. Epub 2015 Mar 2.

SOCRANSKY S.S, HAFFAJEE A.D, CUGINI M.A, SMITH C, KENT R.L.JR. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25, 134–144.

SOCRANSKY S.S, HAFFAJEE A.D, TELES R, WENNSTROM J.L, LINDHE J, BOGREN A, HASTURK H, VAN DYKE T, WANG X, GOODSON J.M. Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota over a 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. 2013 *J Clin Periodontol*. 40(8):771-80. doi:10.1111/jcpe.12117.

SÖDER B, NEDLICH U, JIN L.J. Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. *J Periodontol*. 1999 Jul;70(7):761-71.

TENENBAUM H, JEHL F, GALLION C, DAHAN M. Amoxicillin and clavulanic acid concentrations in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 1997 Nov;24(11):804-7.

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

UPPAL A, UPPAL S, PINTO A, DUTTA M, SHRIVATSA S, DANDOLU V, MUPPARAPU M. The effectiveness of periodontal disease treatment during pregnancy in reducing the risk of experiencing preterm birth and low birth weight: a metaanalysis. *J Am Dent Assoc*. 2010;141:1423-34.

VANDEKERCKHOVE B.N, QUIRYNEN M, STEENBERGHE D. The use of tetracycline-containing controlled-release fibers in the treatment of refractory periodontitis. *J Periodontol*. 1997 Apr;68(4):353-61.

WINKEL E.G, VAN WINKELHOFF A.J, TIMMERMAN M.F, VANGSTED T, VAN DER VELDEN U. Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J Clin Periodontol*. 1997 Aug;24(8):573-9.

ZHANG B, LIN T, HE H. Comparative analysis of blood and saliva expression profiles in chronic and refractory periodontitis patients. *BMC Oral Health*. 2015 Dec 24;15:166. doi: 10.1186/s12903-015-0150-3.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFPR

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do microbioma subgingival de sítios residuais 1 ano após terapia periodontal - avaliação in vivo e ex vivo

Pesquisador: Geisla Mary Silva Soares

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 64705317.5.0000.0102

Instituição Proponente: Departamento de Estomatologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.043.999

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de dissertação de mestrado da aluna Priscila Alves Teixeira Ribas e da prof. Dra Geisla Mary S Soares, no Programa de Pós graduação em Odontologia da UFPR, departamento de Estomatologia.

Objetivo da Pesquisa:

O primeiro objetivo desse estudo é caracterizar a microbiota de sítios periodontais que não responderam à terapia de indivíduos com periodontite crônica generalizada até 1 ano após terapia, pela técnica do Checkerboard DNA-DNA Hybridization. O segundo objetivo é testar in vitro a ação de diferentes antibióticos que possam ser específicos para as espécies bacterianas periodonto patogênicas que se mantiveram presentes nesses sítios após 6 meses e 1 ano de acompanhamento, utilizando amostras de biofilmes cultivadas ex vivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos aos quais os participantes serão expostos são aqueles referentes ao incômodo durante a realização do exame clínico periodontal, coleta de amostras de biofilme e tratamento periodontal. Estes procedimentos de avaliação e coleta das amostras de biofilme não são invasivos, são praticamente indolores e não necessitam de anestesia local. Já a terapia periodontal será realizada

Endereço: Rua Padre Camargo, 265 - Têrreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Telefone: (41)3363-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.040.999

sob anestesia local.

Além disso, existirá o risco de desconforto durante o período de utilização da medicação sistêmica, que incluem desconforto gastrointestinal, dor de cabeça e náusea. Todos serão beneficiados em receber um diagnóstico completo na triagem inicial e informações sobre a periodontite e ainda receberão gratuitamente o tratamento da infecção periodontal, pois como parte do estudo todos os participantes receberão tratamento periodontal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os participantes do estudo serão diretamente afetados pois receberão um diagnóstico completo de sua condição periodontal, informações sobre a periodontite e ainda receberão gratuitamente o tratamento periodontal, incluindo a medicação sistêmica e a terapia mecânica de raspagem e alisamento radicular. Os pesquisadores consideraram os participantes como grupo vulnerável visto que precisam do tratamento periodontal, no entanto se comprometem a informá-los sobre a liberdade que possuem de decidirem pararem de participar do estudo há qualquer momento. Serão recrutados a partir de triagens realizadas com os indivíduos que estão na lista de espera para tratamento periodontal no Curso de Odontologia desta universidade

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ADEQUADOS

Recomendações:

Foram feitas recomendações acatadas pelas pesquisadoras nesta apresentação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram resolvidas.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEPICNS).

Considerações Finais a critério do CEP:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento

Endereço: Rua Padre Camargo, 255 - Térreo
Bairro: Alto da Glória
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometicos.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.043.999

da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: www.cometica.ufpr.br (obrigatório envio)

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_858278.pdf	12/04/2017 15:51:35		Aceito
Outros	RespostaParecerCEPMestrado.pdf	12/04/2017 15:50:43	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEfinal.docx	12/04/2017 15:34:47	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Folha de Rosto	FolhadaRosto2.pdf	11/04/2017 17:28:03	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	TermoDeCompromissoParaUtilizacaoDeDadosDoArquivo2.pdf	11/04/2017 16:10:29	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhadoFinal.docx	11/04/2017 15:48:30	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	RespostaPendenciaDocumentalCEP.pdf	13/02/2017 12:09:00	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	ExtratoDaAta.pdf	13/02/2017 11:56:32	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	AnaliseDeMerito.pdf	13/02/2017 11:56:10	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	TermoDeConfidencialidade.pdf	13/02/2017 11:55:46	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	OFICIO.pdf	07/02/2017 21:57:32	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	DeclaracaoDeResponsabilidadesNoProjeto.pdf	07/02/2017 21:55:32	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	CheckList.pdf	07/02/2017 21:45:42	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	DeclaracaoDeUsoEspecificoDosDados.pdf	07/02/2017 21:41:41	Geisla Mary Silva Soares	Aceito

Endereço: Rua Pedro Camargo, 285 - Térreo
Bairro: Alto da Glória
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.040.966

Outros	DeclaracaoDeTomarPublicoOsResultad os.pdf	07/02/2017 21:41:05	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	TermoDeCompromissoParalinicioDaPes quisa.pdf	07/02/2017 21:38:42	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	ConcordanciaDoDepartamento.pdf	07/02/2017 21:36:43	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	TermoDeGuardaDeMaterialBiologico.pdf	07/02/2017 21:34:56	Geisla Mary Silva Soares	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 03 de Maio de 2017

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 265 - Térreo
Bairro: Alto da Glória
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: comitex.saude@ufpr.br

ANEXO 2 – MODELO DA FICHA USADA NA COLETA DE DADOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA
 DISCIPLINA DE PERIODONTIA

Aluno: _____ Data: ____/____/____

DADOS PESSOAIS			
Nome:			Prontuário:
Endereço:			
Cidade:	Estado:	CEP:	Fone:
Data de nasc.:	Idade:	Sexo:	Raça:
Fone/Recado:	Estado civil:	Profissão:	

ANAMNESE – HISTÓRIA MÉDICA			
Está ou esteve recentemente sob cuidados médicos?			Motivo:
Faz uso de medicamento:	Quais:	Há qto tempo:	
Alergia a anestésicos:	Alergia a antibióticos:	Alergia a outros medicamentos:	
Alterações cardiovasculares:	Dor no peito:	Fadiga ao menor esforço:	
Dificuldade para respirar quando deitado:	Válvula cardíaca:	Tosse seca noturna:	
Hipertensão:	Cefaléia:	Tontura:	P.A.:
Diabetes mellitus:	Urina várias/x dia:	Alimenta-se várias x/dia:	Obesidade:
Alterações hepáticas:	Urina escura:	Pele ou olhos amarelos:	
Alterações renais:	Edema facial:	Fraqueza:	
Alterações hematológicas:	Anemia:	Leucemia:	Hemofilia:
Sangramento anormal associado à procedimentos cirúrgicos ou extrações:			
DSTs-AIDS:	Sífilis:	Gonorréia:	
Esteve hospitalizado:	Motivo:	Transfusão sanguínea:	
Febre sem causa aparente:	Sudorese noturna:	Perda de peso:	
Algum tipo de tumor:	Radioterapia:	Quimioterapia:	
Mulheres:	Ciclos menstruais normais:	Menopausa:	
Uso de contraceptivos ou hormônios:	Qual?		
Grávida:	Há quanto tempo:	Amamentando:	
Fumante:	Há quanto tempo:	Qtos cigarros/dia:	
Ex-fumante:	Há quanto tempo:	Qtos cigarros/dia:	
Uso de drogas:			
Exames de laboratório:			
Observações:			

Assinatura do Paciente: _____

ANAMNESE – HISTÓRIA ODONTOLÓGICA		
Motivo principal da consulta:		
Sabia que tem doença gengival:	Tratou alguma vez:	Tipo:
A sua gengiva sangra com facilidade:	Espontâneo:	Durante a escovação:
Tem dentes moles:	Mau hálito:	Sente mau gosto na boca:
Características da escova:		
Técnica de escovação:	Número de vezes ao dia:	
Uso de fio dental:	Número de vezes ao dia:	Outros agentes auxiliares:
Realiza(ou) tratamento ortodôntico:	Respirador Bucal:	

ANAMNESE – HISTÓRIA ODONTOLÓGICA	
Respiração Bucal:	Mast. Unilateral:
Dor na ATM:	Estalido na ATM:
Aspecto da mucosa oral:	Higiene oral: () Boa () Regular () Ruim
Cárie:	Presença de cálculo:
Má posição dentária:	Migrações dentais:
Excesso marginais de restaurações:	Contato prematuro:
Impactação alimentar:	Presença de prótese:
Observações:	

ANAMNESE – HISTÓRIA ODONTOLÓGICA
Técnica de escovação indicada paciente:
Indicação de escova unitufo e/ou interdental:
Indicação de fio dental:
Indicação de outros agentes auxiliares:
Observações:

Assinatura do Paciente: _____

Paciente:	Data:	Examinador:
-----------	-------	-------------

TESTIDULAR																	
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28		
D	V	H	D	V	H	D	V	H	D	V	H	D	V	H	D	V	H

IPV
ISG
PS
NCI
SS
SUP
F
M

PALATAL																	
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28		
D	P	H	D	P	H	D	P	H	D	P	H	D	P	H	D	P	H

IPV
ISG
PS
NCI
SS
SUP
F
M

TESTIDULAR																	
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		
D	V	H	D	V	H	D	V	H	D	V	H	D	V	H	D	V	H

IPV
ISG
PS
NCI
SS
SUP
F
M

LINGUAL																	
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		
D	L	H	D	L	H	D	L	H	D	L	H	D	L	H	D	L	H

IPV
ISG
PS
NCI
SS
SUP
F

IPV-Índice de Placa Visual [B/1]	SS-Sangramento a Sondaem [B/1]	NCI-Huel Clases de Inserção [mm]	F-Fossa [1/2/3]
ISG-Índice de Sangramento Gingival [B/1]	PS-Profundidade de Sondaem [mm]	SUP-Supragên [B/1]	M-Mobidade [B/1/2/3]

S line de esteta	S line 0.5mm	S line fotografada
------------------	--------------	--------------------