

Sandro Maciel Lopes da Costa

**A utilização do gel de Metronidazol numa concentração de  
25% de aplicação local no Tratamento Periodontal Não Cirúrgico**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2016



Sandro Maciel Lopes da Costa

**A utilização do gel de Metronidazol numa concentração de  
25% de aplicação local no Tratamento Periodontal Não Cirúrgico**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2016

Sandro Maciel Lopes da Costa

**A utilização do gel de Metronidazol numa concentração de  
25% de aplicação local no Tratamento Periodontal Não Cirúrgico**

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa  
como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mes-  
tre em Medicina Dentária, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>  
Cristina Pina

---

## RESUMO

A utilização do gel de Metronidazol numa concentração de 25% de aplicação local no Tratamento Periodontal Não Cirúrgico

(Sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Pina)

A doença periodontal continua a ser uma das doenças inflamatórias crónicas, com elevados níveis de prevalência por todo o mundo, sendo a principal causa de perda de dentes na idade adulta. Classificada como uma doença infecciosa e de carácter multifatorial, onde estirpes bacterianas como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* são o seu principal fator etiológico, devido ao expressarem fortes fatores de virulência e induzirem a uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro, levando a uma maior destruição tecidual, são fatores, pelos quais tem havido um crescente estudo e desafio científico.

Sendo a terapia periodontal não cirúrgica considerada o tratamento de eleição, no entanto com algumas limitações, nos últimos anos tem vindo a ser alvo de estudos, novas metodologias que possam ser utilizadas concomitantemente com esta terapia com o intuito de eliminar o principal fator etiológico. Dentro destas novas metodologias figura o Elyzol (gel de Metronidazol de aplicação local numa concentração de 25%) usado concomitantemente com a terapia periodontal não cirúrgica, em particular, nos casos de periodontite crónica e agressiva.

Os resultados dos estudos analisados neste trabalho foram controversos, mas uníssonos ao comprovarem que o Elyzol não é eficaz na eliminação do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Este trabalho teve como objetivo principal realizar uma revisão bibliográfica atual sobre a eficácia do Elyzol na diminuição da carga bacteriana do microbioma das bolsas periodontais e na melhoria dos parâmetros clínicos do periodonto. Foram também objetivos deste estudo, uma caracterização da doença periodontal, assim como uma caracterização do próprio microbioma oral e dos principais agentes periodontopatogénicos, assim como, dos fatores de virulência associados a estas bactérias.

## ABSTRACT

The use of the Metronidazole Gel in a concentration of 25% of local application in Non-Surgical Periodontal Treatment

(Under the orientation of Prof<sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Cristina Pina)

The periodontal disease is still one of the chronic inflammatory diseases with high levels of prevalence worldwide, being the main cause of loss of teeth at an adult age. Classified as a multifactorial infectious disease, where bacterial strains, such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* are its main etiological factor, as they produce strong virulence factors and induce an inflammatory response by the host, leading to more extensive tissue destruction, these are factors that have been more and more the subject of several studies and constitute a scientific challenge.

As the nonsurgical periodontal treatment is considered to be the first-line treatment, however with some limitations, in recent years it has been the subject of studies so that new methodologies emerge that may be used in conjunction with this therapy with the purpose of eliminating the main etiological factor. Among these new methodologies is Elyzol (local application of 25% Metronidazole gel) used in conjunction with nonsurgical periodontal therapy, particularly in cases of chronic and aggressive periodontitis.

The results of the studies analysed in this assignment were controversial, but all of them proved that it is not effective in the elimination of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The main purpose of this assignment was to perform a current bibliographic review on the effectiveness of Elyzol in the reduction of the bacterial load of the microbiome of periodontal pockets and in the improvement of the clinical parameters of the periodontal tissues. This study also aimed at characterising the periodontal disease as well as characterising the oral microbiome itself, the main periodontopathogenic agents and the virulence factors associated to these bacteria.

## **Agradecimentos**

*Para a execução deste trabalho, e até à altura da realização do mesmo, foi necessária a “ajuda” de algumas pessoas, das quais gostaria de salientar;*

*Os meus pais, Fernando Lopes e Maria do Céu Costa que me ajudaram e apoiaram nesta nova jornada de formação dentro da área da Medicina Dentária, incentivando-me nas alturas em que o desânimo, o cansaço e o sentimento de desespero se iam apoderando de mim;*

*À Professora Doutora Cristina Pina ao qual, desde já agradeço a “paciência”, à sua determinante “ajuda” que me outorgou pelos seu mérito e notável sabedoria que se asenhora dentro da área da Microbiologia, com fim a encontrar o melhor caminho para a realização deste trabalho que desde início entendi que seria o melhor tema para o meu trabalho final;*

*Ao meu padrinho, Paulo Maciel que sempre me ajudou nos momentos mais críticos desta caminhada, e que pudesse concluir com sucesso este meu sonho de evoluir dentro da especialidade da Medicina Dentária, à sua mãe Alda Mendes e à sua consorte Maria Félix Bravo;*

*A minha família, em especial aos meus irmãos Rodrigo Lopes e Cláudio Lopes, pela importância que têm na pessoa que hoje sou, para além da minha cunhada Andreia Simões que me proporcionou 3 sobrinhos deslumbrantes;*

*O meu binómio, Luís Sousa, pelas “batalhas” que fomos tendo ao longo dos anos, as quais fomos vencendo com inteligência e trabalho, e pela ajuda psicológica que me foi estendendo, nas alturas em que o sentimento de medo se apoderava de mim;*

*Os meus colegas de turma, tanto da UFP como da FMDUL, “companheiros” destas “caminhadas”; fomo-nos apoiando uns aos outros para podermos chegar até aqui;*

*A todos os meus professores desta instituição e da FMDUL, pelos conhecimentos transmitidos, pela ajuda, compreensão – um muito obrigado;*

*À docente do curso de Higiene Oral da FMDUL, Dr.<sup>a</sup> Sandra Graça pela ajuda preciosa que me deu no início desta caminhada, ao se responsabilizar pela matéria burocrática inicial que necessitei para que ingressa-se na UFP, proporcionando-me uma desmedida de disciplinas convalidadas;*

*Ao meu recente Amigo Tercio Aleixo pela disponibilidade que sempre patenteou, pela sua sagacidade nas traduções na área da saúde, que outorga, e fez parte da conclusão deste trabalho.*

*Aos meus colegas de profissão e médicos dentistas com quem exerci e tenho exercido durante estes últimos 12 anos, como Higienista Oral, em especial à Dr.<sup>a</sup> Sandra Borges pelo apoio prestado até à data, pela paciência, ajuda, força e incentivo constante que teve nesta demanda a que me propus, e ao seu marido Ricardo Tavares.*

*À Dr.<sup>a</sup> Lília Rangel que sempre atendeu aos meus pedidos;*

*Aos meus amigos do Grupo “espalhados” pelo Mundo, em especial no Brasil: Cristina Pinto, Juliano Gaspar, Helena Gomes, Alexandre Josué e Jorge Cury;*

*E todas as pessoas que comigo convivem todos os dias, alguns que injustamente não citei, mas de qualquer maneira, vocês sabem quem são: um muito Obrigado;*

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE IMAGENS E TABELAS.....	III
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	IV
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. DESENVOLVIMENTO.....	4
1. Materiais e Métodos.....	4
2. A Doença Periodontal.....	6
2.1 Características do Periodonto Saudável.....	6
2.2 Definição da Doença Periodontal.....	8
2.3 Definição de Gengivite.....	11
2.4 Definição de Periodontite.....	13
2.4.1 Definição de Periodontite Crónica.....	14
2.4.2 Definição de Periodontite Agressiva.....	15
2.5 Resposta do Hospedeiro.....	17
2.6 Tratamento das Doenças Periodontais.....	19
2.6.1 Protocolo da Terapia Periodontal Não Cirúrgica.....	20
3.O Microbioma Oral.....	24
3.1 Formação do Biofilme Bacteriano.....	27
3.1.1 Película Adquirida.....	27
3.1.2 Microbioma Supra-gengiva.....	29
3.1.3 Microbioma Infra-gengival.....	31
4. Microbiologia a Doença Periodontal.....	32
4.1 Bactérias associadas à Doença Periodontal.....	34
4.1.1 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	35
4.1.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	36
4.1.3 <i>Prevotella sp.</i> .....	37
4.1.4 <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	37
4.1.5 <i>Campilobacter rectus</i> .....	37
4.1.6 <i>Eikenella corrodens</i> .....	38
4.1.7 <i>Treponema sp.</i> .....	38
4.1.8 <i>Capnocytophaga ochracea</i> .....	39

**A utilização do Gel de Metronidazol numa concentração de  
25% de aplicação local no Tratamento Periodontal Não Cirúrgico**

---

4.1.9 <i>Actinomyces sp</i> .....	39
4.1.10 <i>Tannerella forsythia</i> .....	39
4.2 Fatores de virulência bacterianos associados à Doença Periodontal.....	40
4.2.1 Cápsula.....	41
4.2.2 Fímbrias.....	41
4.2.3 Adesinas.....	41
4.2.4 Presença de recetores de reconhecimento.....	41
4.2.5 Produção de polissacarídeos.....	42
4.2.6 Colagenases.....	42
4.2.7 Endotoxinas.....	42
4.2.8 Proteases.....	43
4.2.9 Epiteliotoxinas.....	43
4.2.10 Hemaglutininas.....	43
5. Antibioticoterapia na Doença Periodontal.....	44
5.1 O Metronidazol.....	46
5.2 Modo de ação do Metronidazol.....	47
5.3 Elyzol.....	47
5.3.1 Estudos e ensaios clínicos da aplicação do gel de metronidazol numa con- centração de 25% em bolsas periodontais.....	48
III. CONCLUSÃO.....	55
IV. BIBLIOGRAFIA.....	57

## ÍNDICE DE IMAGENS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Estruturas histológicas e macroscópicas do periodonto.....	06
<b>Figura 2:</b> Início e progressão da doença periodontal.....	09
<b>Figura 3:</b> Nichos ecológicos da cavidade oral.....	25
<b>Figura 4:</b> Adesão bacteriana à película adquirida.....	28
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do metronidazol.....	47
<b>Figura 6:</b> Aplicação de gel de metronidazol a 25% (Elyzol).....	48
<b>Tabela 1.</b> Géneros bacterianos com maior representação no microbioma oral.....	26
<b>Tabela 2.</b> Espécies de bactérias detetadas com maior frequência na doença periodontal.....	33
<b>Tabela 3.</b> Antibióticos recomendados segundo a patogenicidade bacteriana.....	45

## SIGLAS E ABREVIATURAS

**16Srna** - 16S ribossomal RNA

**BANA** - Benzoil Arginina Naftilamida

**AAP** - Academia Americana de Periodontologia

**CIM** - Concentração Mínima Inibitória

**DP** - Doença Periodontal

**DPs** - Doenças Periodontais

**EJ** - Epitélio Juncional

**ES** - Epitélio Sulcular

**FGC** - Flúido Gengival Crevicular

**IgA** - Imunoglobulina A

**IgG** - Imunoglobulina G

**IgM** - Imunoglobulina M

**IL-1** - Interleucina 1

**IL-1 $\alpha$**  - Interleucina 1 Alfa

**IL-1 $\beta$**  - Interleucina 1 Beta

**IL-2** - Interleucina 2

**IL-4** - Interleucina 4

**IL-6** - Interleucina 6

**IL-8** - Interleucina 8

**IL-10** - Interleucina 10

**LPS** - Lipopolissacarídeos

**LTB4** - Leucotrieno B4

**MMPs** - Matriz Metaloproteinases

**MMP-8** - Matriz Metaloproteinase-8

**PA** - Periodontite Agressiva

**PC** - Periodontite Crónica

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase

**PGE-2** - Prostaglandina E2

**PMN** - Leucócitos Polimorfonucleares

**RAR** - Raspagem e Alisamento Radicular

**SLIBT** - Sistema de Libertação de Fármaco Intra Bolsa Periodontal

**TGF- $\beta$**  - Fator de Transformação do Crescimento Beta

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral Alfa

**TNF- $\beta$ 1** - Fator de Necrose Tumoral Beta 1

**TXB2** - Tromboxano B2

**UV** - Ultravioleta

## I. INTRODUÇÃO

O caráter destrutivo das doenças periodontais (DPs) e a sua progressão estão diretamente relacionadas com a presença de agentes bacterianos nos microbiomas supra e infra-gengivais e dos fatores de virulência que lhe estão associados, em particular as espécies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Em resposta a estes, o hospedeiro representa um papel importante na patogenia da DP através da produção de enzimas e outros mediadores endógenos de resposta inflamatória, sendo responsável pela progressão e destruição tecidual observada pelos parâmetros clínicos e radiográficos (Highfield J. 2009; Mohammad Tariq *et al.* 2012).

A terapia periodontal não cirúrgica, realizada através da remoção de depósitos calcificados de origem bacteriana e aderidos às superfícies dentárias supra e infra-gengivais, concomitantes com a RAR dos dentes afetados pela DP, com o intuito de remover também o cimento radicular impregnado de toxinas e endotoxinas bacterianas, representa um pré-requisito para o tratamento e controlo das DPs, sendo na maioria dos casos suficiente para devolver ao periodonto condições compatíveis com saúde periodontal. No entanto, algumas variáveis podem estar presentes e associadas ao insucesso da terapia periodontal: como a falha da eliminação dos principais agentes periodontopatogénicos devido à dificuldade do acesso dos instrumentos de RAR à base das bolsas periodontais, devido às variações anatómicas radiculares, fatores sistémicos modificadores da resposta do hospedeiro, para além de que alguns agentes periodontopatogénicos subjugam a capacidade de invasão das células epiteliais ao ultrapassar o epitélio sulcular para o tecido conjuntivo, e recolonizar as superfícies dentárias após a terapia de controlo da doença, principalmente quando o controlo bacteriano de alguns nichos ecológicos da cavidade oral por parte do hospedeiro é insuficiente (Adriaens *et al.* 1998; Highfield J. 2009).

Com fim a minimizar a ocorrência desses insucessos terapêuticos, a utilização de antimicrobianos de libertação local (SLIBT) podem reduzir o número dos agentes periodontopatogénicos, alterar a composição do microbioma infra-gengival, ou modular a resposta inflamatória por parte do hospedeiro, levando assim a uma diminuição da progressão da

destruição tecidual e elevar o sucesso da terapia periodontal (Marcos Brushi *et al.* 2006; Yadav *et al.* 2015).

O interesse científico do tema desta Dissertação de Mestrado Integrado, justifica-se primeiramente, à minha formação académica inicial ser a de Higienista Oral, com 12 anos de atividade dedicados à prática clínica exclusiva dentro da especialidade da Periodontologia, desde o diagnóstico ao tratamento das doenças periodontais, via tratamento periodontal não cirúrgico, mas não só. E ser comum com outros colegas Higienistas Oraís, os comentários em simpósios e congressos da área, sobre a utilização de uma variedade de antissépticos para irrigação de bolsas periodontais, com fim a obter resultados clínicos sublimes, mas sem ter suporte científico para tal na utilização de alguns agentes. Neste âmbito e aquando da minha formação ter surgido no mercado o SLIBP Elyzol (gel de benzoato de metronidazol na formulação de 40%, equivalente a 25% de metronidazol), o qual prometia resultados clínicos promissores, mas que, no entanto, deixou de ser comercializado em Portugal poucos anos depois, foi de todo o meu interesse realizar uma pesquisa bibliográfica de carácter científico atual, com fim a chegar à real conclusão das vantagens, ou não, da utilização do Elyzol.

Atualmente os SLIBP's utilizados concomitantemente com a terapia periodontal não cirúrgica são: o Gel de Metronidazol 25%, o Chip de Clorhexidina 2,5%, as Fibras de Tetraciclina 25%, as Esferas de Minociclina 2% e o Hiclato de Doxiciclina 10% (Marcos Brushi *et al.* 2006; Ana Meira. *et al.* 2007; Yadav *et al.* 2015).

Entre estes agentes antimicrobianos, muitos têm demonstrado eficácia clínica em algumas formas de DP. Sendo assim, é comum, em outros países, associar à terapia periodontal não cirúrgica, o uso de SLIBT's. No entanto este facto não é unânime e alguns estudos sustentam o contrário, levando a que atualmente os laboratórios farmacêuticos e a comunidade científica estejam a desenvolver a inclusão de novas tecnologias como: biofilmes, nanomateriais como: lipossomas, lípidos, nanopartículas poliméricas, nanocristais, dendrímeros e nanofibras como veículos que elevam o tempo de libertação dos fármacos.

Alguns agentes demonstram um grande potencial, estando na atualidade a ser clinicamente testados em pacientes com DP (Zupancic *et al.* 2015; Yadav *et al.* 2015).

Atualmente nenhum destes fármacos de aplicação local está disponível no mercado Português, apesar de alguns anos atrás o Elyzol ter estado disponível e autorizada a sua comercialização em Portugal. O seu preço elevado devido à sua não participação pelo serviço nacional de saúde português aliado a uma fraca adesão por parte dos Médicos Dentistas e Higienistas Orais, pois encarecia o custo do tratamento ao doente, talvez sejam os fatores responsáveis pela descontinuidade da venda do produto pela empresa comercial que o representava em Portugal.

Sendo assim, é comum os Estomatologistas, Médicos Dentistas e Higienistas Orais, utilizarem concomitantemente com a RAR, soluções de agentes antissépticos como: hexetidina, iodopovidona, peróxido de hidrogénio e digluconato de clorhexidina para irrigação das bolsas periodontais, assim como a solução de metronidazol 5 mg/ml, este, utilizado apenas em meio hospitalar. São utilizados com o intuito de diminuir a carga bacteriana periodontopatogénica do microbioma das bolsas periodontais, alterando a sua composição, e assim, melhorar os parâmetros clínicos do periodonto.

## OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo principal realizar uma revisão bibliográfica atual sobre a real eficácia do Elyzol na diminuição da carga bacteriana do microbioma das bolsas periodontais, e na melhoria dos parâmetros clínicos do periodonto. Foram também objetivos deste estudo, uma caracterização da doença periodontal, assim como uma caracterização do próprio microbioma oral e dos principais agentes periodontopatogénicos, assim como, dos fatores de virulência associados a estas bactérias.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 1. Materiais e Métodos

Com o intuito de clarificar se a utilização do gel de Metronidazol numa concentração de 25% de aplicação local, nomeadamente o medicamento de denominação comercial Elyzol, nos oferece vantagens nos resultados de índole clínica, assim como na redução das estirpes bacterianas com maior patogenicidade na doença periodontal, em comparação com a sua utilização concomitantemente com o tratamento periodontal não cirúrgico, ou simplesmente realizando o tratamento tradicional de raspagem e alisamento radicular, foi realizada uma vasta pesquisa bibliográfica.

Em termos metodológicos e tendo por base os objetivos delineados neste trabalho, procedeu-se à pesquisa de artigos científicos e outras publicações entre janeiro de 2015 e fevereiro de 2016, através de fontes de pesquisa científica como: *MEDLINE*, *B-on*, *PubMed*, *Scielo (Scientific Electronic Library Online)*, e em motores de busca como o *Google Académico*.

Assim sendo, esta dissertação é de índole teórica, estando desta forma isenta de qualquer tipo de trabalho prático experimental, tratando-se apenas de uma revisão sistemática de artigos científicos que estudaram o tema nos últimos 25 anos.

Os critérios de inclusão utilizados para a escolha dos artigos passaram por incidir, apenas nos artigos que se referem à doença periodontal, sua etiologia, o microbioma oral, desenvolvimento de biofilmes bacterianos, os fatores de virulência que levam as bactérias periodontopatogénicas do microbioma infra-gengival à destruição tecidual dos tecidos do periodonto, a resposta imunológica do hospedeiro, o tratamento periodontal não cirúrgico, assim como, a antibioticoterapia na doença periodontal.

Como critérios de exclusão, os artigos científicos que se referiam a estudos onde comparavam as possíveis vantagens clínicas da utilização do Metronidazol de aplicação local que não fosse na concentração de 25% foram excluídos.

Para além de consultados livros e revistas científicas da área da Periodontologia, Microbiologia Oral e Farmacologia, as pesquisas bibliográficas online nos motores de busca supracitados foram as que me revelaram a maioria dos dados para a elaboração deste trabalho.

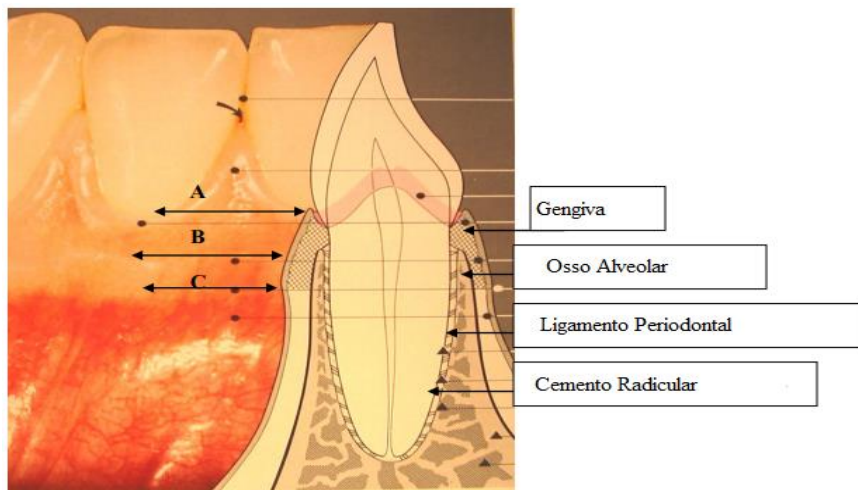
As palavras-chave utilizadas foram: metronidazole, Elyzol, oral microbiome, periodontal disease, gingivitis, periodontitis, virulence factor, acquired pellicle, local antimicrobial therapy, GFC, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campilobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola*, *Capnocytophaga ochracea*, *Actinomyces sp* e *Tannerella forsythia*.

A seleção dos artigos baseou-se na conformidade dos limites dos assuntos aos objetivos deste trabalho, limitando a pesquisa para artigos científicos e estudos escritos em inglês, português e espanhol, com data de publicação de um período de 15 anos ou de anos anteriores cujo conteúdo é relevante e ainda com evidências experimentais acerca do tema.

## 2. A Doença Periodontal

### 2.1 Características do Periodonto Saudável

Com o intuito de entender o desenvolvimento e progressão das doenças periodontais, e diagnosticá-las o mais precoce possível, é necessário compreender e inteirar-se de como são constituídos os tecidos periodontais e as alterações clínicas que estes sofrem perante um agente agressor. Num periodonto clinicamente saudável as peças dentárias estão sustentadas no osso alveolar pelo ligamento periodontal, constituído por fibras de colagénio classificadas por fibras de Sharpey, que se encontram inseridas no cemento radicular e no osso alveolar por toda a extensão radicular. O epitélio juncional (EJ), ou epitélio de união sulcular insere-se ao nível da linha amelo-cementária, onde o tecido gengival está normalmente localizado entre 1 a 3 mm coronalmente ao EJ (podemos observar na Figura 1 as estruturas do periodonto clinicamente saudável) (Angelo Mariotti, Arthur Hefti 2015; P. Batchelor 2014).



- A: Margem gengival
- B: Gengiva aderida
- C: União muco-gengival

**Figura 1: Estruturas histológicas e macroscópicas do periodonto**

(Importada do documento <https://odonto42012.files.wordpress.com/2011/01/periodonto-normal.pdf>)

Segundo Angelo Mariotti e Arthur Hefti (2015) a condição de saúde periodontal é definida num modelo de bem-estar modificado. Esse modelo consiste em quatro características fundamentais: uma dentição funcional, função indolor da dentição, a estabilidade do complexo de inserção periodontal, e o bem-estar psicológico e social do indivíduo. Estes autores referem que o indivíduo que está satisfeito com a estética e função do seu aparelho estomatognático, reflete-se num equilíbrio entre a mente, a cavidade oral e o espírito, resultando também numa condição de saúde periodontal.

Um periodonto clinicamente saudável apresenta características clínicas específicas como: gengivas cor rosa-pálido de consistência firme e resiliente, forma dependente do volume e do contorno gengival, sendo a margem fina e terminando contra o dente em forma de lâmina de faca, ausente de hemorragia, ausente de perda de inserção conjuntiva e de mobilidade dentária. No entanto, histologicamente estão presentes PMN em número reduzido adjacentes ao EJ e presentes no FGC, portanto segundo os autores Marcus Brushi *et al.* (2006), Lockart *et al.* (2012), Batchelor P. (2014) e Mansur *et al.* (2014), num periodonto clinicamente saudável está sempre presente uma resposta imune instalada, com baixas taxas do FGC ( $0,03 \text{ mm}^3$  a  $0,04 \text{ mm}^3$ ) e uma concentração de proteínas similar ao fluído extracelular.

Do ponto de vista microbiológico, bactérias de Gram-positivas anaeróbias facultativas relacionadas com a saúde periodontal, bactérias pertencentes ao microbioma oral, em particular os géneros *Streptococcus* e *Actinomyces* (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius* e *Actinomyces naeslundii*) (Fábio Eto *et al.* 2003; Alex Berezow, Richard Darveau 2011; Angelo Mariotti, Arthur Hefti 2015).

Algumas espécies bacterianas encontradas no sulco gengival saudável como o *Streptococcus sanguis*, *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga ochracea* e *Lactobacillus sp.* são consideradas protetoras ou benéficas ao hospedeiro, por inibir o crescimento de bactérias

periodontopatogénicas como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Fábio Eto *et al.* 2003; Alex Berezow, Richard Darveau 2011).

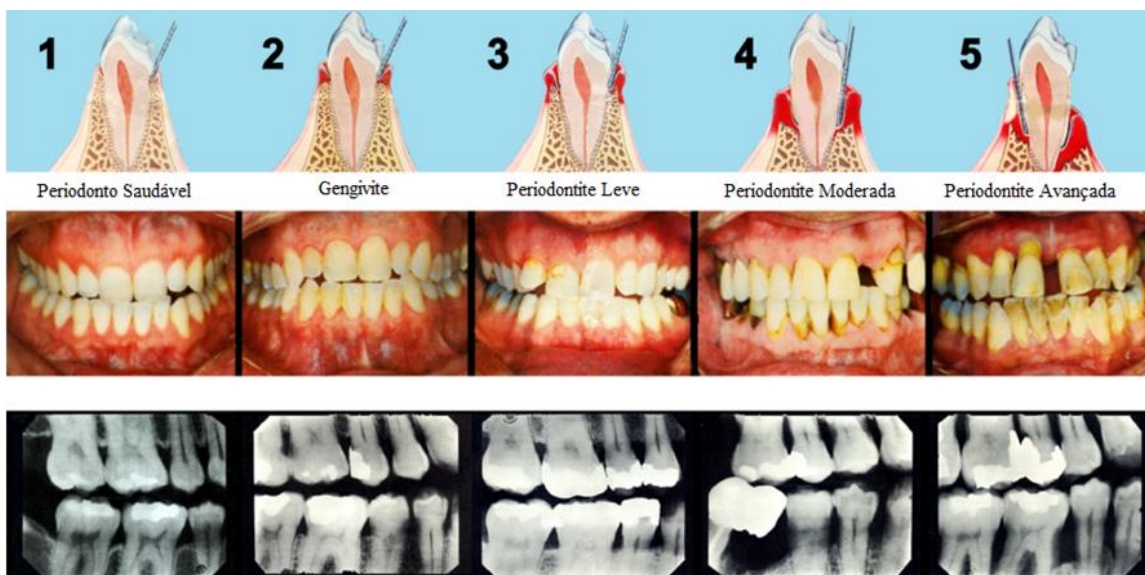
## **2.2 Definição da Doença Periodontal**

A doença periodontal (DP) está classificada como um conjunto de processos inflamatórios de origem infecciosa e de carácter multifatorial, que envolvem os tecidos periodontais resultante de um processo interativo entre estes e as bactérias do microbioma das superfícies dentárias e do microbioma do sulco gengival ou bolsa periodontal. Quando estes apresentam elevada maturação e complexidade, permitindo a proliferação de um número elevado de estirpes bacterianas periodontopatogénicas capazes de induzir uma resposta inflamatória por parte de um hospedeiro suscetível, apresentando-se com alterações vasculares, respostas celulares e imunológicas, podendo resultar num processo inflamatório restringindo-se apenas aos tecidos moles do periodonto (Gengivite), ou levar à perda progressiva de inserção conjuntiva, destruição do ligamento periodontal e à reabsorção do osso alveolar, ou seja, levar à destruição tecidual do periodonto de forma irreversível (Periodontite) (Escudero- Castaño *et al.* 2008; Highfield J. 2009; Ana Szpilman *et al.* 2012; P. Batchelor 2014; Angelo Mariotti, Arthur Hefti 2015).

Diversas formas de DP estão associadas à presença de agentes bacterianos presentes no microbioma infra-gengival, resultante do crescimento, proliferação e maturação do microbioma das superfícies dentárias, em especial na interface entre estas e o tecido gengival, ou seja, a nível da margem gengival. Esta maturação leva a uma mudança estrutural e organizada dos respetivos microbiomas, tanto da superfície dentária (supra e infra-gengival) como do tecido epitelial do sulco gengival e do tecido epitelial oral. Esta mudança torna a estrutura complexa, com maior patogenicidade para os tecidos periodontais, dado que a proliferação de espécies bacterianas de Gram-negativas anaeróbias ou espécies facultativas, nomeadamente espécies consideradas periodontopatogénicas podem representar 70% do microbioma das bolsas periodontais. Deste ponto de vista, a principal etiologia das DPs é acometida pela presença destas estirpes bacterianas num microbioma estruturalmente complexo, que se encontra principalmente interno desde a margem gengival ao

EJ. No entanto, para que ocorra doença não é necessário, em exclusivo, uma atividade bacteriana elevada, mas sim, a combinação desta com um hospedeiro suscetível (José Liébana *et al.* 2004; Marcus Brushi *et al.* 2006; Rita Carvalho, Ricardo Almeida 2009; Highfield J. 2009; Jane Manakil 2012; Ana Szpilman *et al.* 2012).

As DPs estão assim agrupadas em duas formas: Gengivite e Periodontite. Na gengivite não existe perda estrutural irreversível dos tecidos periodontais, nem migração apical do EJ, portanto considera-se uma doença reversível, com a cicatrização dos tecidos moles após eliminação dos principais agentes etiológicos. Já a periodontite caracteriza-se por uma resposta à infeção bacteriana, onde os fatores de virulência bacterianos e o hospedeiro representam um papel importante na patogenia da DP, através da produção de enzimas proteolíticas e outros mediadores endógenos de resposta inflamatória, sendo responsável por grande parte da destruição tecidual progressiva observada através dos parâmetros clínicos e radiográficos. Na Figura 2 podemos verificar os vários estágios da doença periodontal (Jane Manakil 2012; Angelo Mariotti, Arthur Hefti 2015).



**Figura 2: Início e progressão da doença periodontal**

(Importada do documento <http://www.wtbyperio.com/periodontal-disease/about-periodontal-disease>)

Do ponto de vista histológico, são características comuns à gengivite e à periodontite a destruição e perda de fibras de colagénio, devido a uma elevada concentração de PMN no microbioma do sulco gengival e o aumento da taxa de fluxo do FGC que pode ser de um volume de (0,5 mm<sup>3</sup> a 0,9 mm<sup>3</sup>) até valores de 150 mm<sup>3</sup>/h dependente do grau de inflamação (Marcus Brushi *et al.* 2006; Escudero- Castaño *et al.* 2008; Ana Szpilman *et al.* 2012; Willer Osorio *et al.* 2012; Mansur *et al.* 2014).

Ademais das bactérias periodontopatogénicas, outros fatores de risco quer sejam inerentes ao hospedeiro ou ambientais, contribuem para o desenrolar das doenças periodontais, uma vez que expressam a valência de modificar a vulnerabilidade do hospedeiro em desenvolver a doença, tais como: má posição dentária, respiração oral, impactação alimentar, trauma oclusal, má higiene oral, hábitos tabágicos, o sexo, a raça e o stress. Fatores sistémicos que incluem alterações sistémicas, influências hormonais, imunossupressão e fatores genéticos (polimorfismos genéticos), são igualmente importantes para o início, desenrolar, progressão e severidade da patologia periodontal (Willer Osorio *et al.* 2012; Dentino *et al.* 2013; Angelo Mariotti, Arthur Hefti 2015).

Nos últimos anos, e devido aos avanços científicos, o fator genético através de diversos marcadores genéticos tem sido amplamente estudado, no sentido de determinar a suscetibilidade de um indivíduo à DP, em particular à periodontite. As citocinas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1, por serem fortes mediadores da resposta inflamatória do hospedeiro, e serem relativamente comum encontradas em elevadas concentrações no FGC, em particular a IL-1, têm merecido atenção por parte da comunidade científica no estudo dos polimorfismos genéticos, e nas variações que se acredita apresentarem (Mansur *et al.* 2014; Chatzopoulos *et al.* 2016).

Em todas as fases da DP encontram-se neutrófilos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e plasmócitos, compondo o infiltrado inflamatório, com a produção e libertação de mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , tanto na gengivite estabelecida como nas formas de periodontite. A periodontite além de evidenciar reabsorção óssea, há tecido conjuntivo com características inflamatórias semelhantes à gengivite estabelecida,

porém com uma intensa população de plasmócitos e elevadas quantidades de IL-1 e TNF- $\alpha$  tendo um efeito sinérgico no processo de reabsorção óssea alveolar. Sugere-se que nas lesões periodontais estáveis predominam os linfócitos T, e nas lesões periodontais ativas em progressão os linfócitos B e plasmócitos maduros. O conhecimento das células e mediadores inflamatórios que participam na patogénia da doença periodontal é importante para que se possa chegar a métodos terapêuticos mais específicos (Virginia Silveira *et al.* 2009; Javier Botero 2009; Mansur *et al.* 2014).

### **2.3 Definição de Gengivite**

A gengivite induzida pela atividade periodontopatogénica pode difundir-se por toda a unidade gengival remanescente, sendo este o início da DP, caso não seja tratada adequadamente, concomitante com uma higiene oral diária e eficaz por parte dos indivíduos, converte-se numa gengivite crónica podendo evoluir para uma forma de periodontite, e ser na realidade, o início da história natural da periodontite. No entanto, este processo não ocorre em todos os indivíduos, pois a intensidade dos sinais e sintomas clínicos variam entre indivíduos e entre locais numa mesma dentição (José Liébana *et al.* 2004; Luis Lopes *et al.* 2009; Highfield J. 2009).

Os primeiros sinais clínicos da inflamação gengival são eritema, edema, aumento da temperatura do sulco gengival, alteração da sensibilidade, aumento da taxa de fluxo do FGC e hemorragia gengival marginal. É reversível após a remoção do fator etiológico sendo que a hemorragia é manifestada por fenómenos de vascularização, mediados pela resposta imunológica do hospedeiro e o aumento do epitélio do sulco gengival, onde pequenos estímulos levam à rutura vascular junto à margem gengival. O quadro histopatológico da gengivite caracteriza-se por não estar associado nem com a migração apical do EJ, nem com reabsorção óssea alveolar e a destruição das fibras do ligamento periodontal, mas sim com características inflamatórias dos tecidos moles e alterações imunológicas detetadas pelos testes bioquímicos do FGC (Highfield J. 2009; Luís Lopes *et al.* 2009; Jane Manakil 2012).

Na gengivite induzida por agentes periodontopatogénicos, a composição bacteriana do microbioma do sulco gengival, é de cerca de 50% de bactérias anaeróbias facultativas, onde predominam espécies como: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, 45% de anaeróbios estritos: como *Peptostreptococcus anaerobius*, *Capnocytophaga*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella parvula*, *Haemophilis*, *Campylobacter rectus* e *Eikenella corrodens*, e cerca de 5% de bactérias do género *Treponema sp*, em particular o *Treponema denticola* (Fabio Eto *et al.* 2003; José Liébana *et al.* 2004, Jane Manakil 2012).

Os fatores de virulência apresentados por estas estirpes bacterianas, assim como a resposta inflamatória por parte do hospedeiro, com a produção de citocinas, leucotoxinas, endotoxinas, mucopeptídeos, ácidos lipoteicos, LPS e agentes proteolíticos que penetram no tecido epitelial e conjuntivo, além do aumento da taxa do FGC que contém fatores que promovem o crescimento de uma vasta gama de bactérias, nomeadamente (uma complexa mistura de substâncias derivadas do soro sanguíneo: eletrólitos e moléculas orgânicas, isto é, albuminas, globulinas, lipoproteínas e células estruturais do periodonto e de fibrinogénio, peptídeos, enzimas, fosfatase alcalina,  $\beta$ -glucuronidase, aspartato aminotransferase e prostaglandinas). No entanto, na gengivite a cicatrização dos tecidos do periodonto é possível caso o tratamento da gengivite seja bem sucedido, aliado a uma higiene oral eficiente que permita manter um microbioma sulcular e da superfície dentária não patogénico, por parte do hospedeiro (José Liébana *et al.* 2004; Virginia Silveira *et al.* 2009, Jane Manakil 2012; Mansur *et al.* 2014).

No entanto, distúrbios endócrinos e imunológicos, tanto em adolescentes como na gravidez, assim como alguns fármacos como: fenitoína (antiepiléptico), nifedipina (bloqueador dos canais de cálcio) e imunossuppressores, podem agravar os parâmetros clínicos da gengivite, apresentando-se muitas vezes com o tecido gengival hipertrofiado e uma exacerbação inflamatória por vezes associada a sintomatologia dolorosa, como no caso da gravidez onde o desenvolvimento e agravamento da DP pode manifestar-se (Novak 2002; Dias *et al.* 2006).

## **2.4 Definição de Periodontite**

A periodontite é definida como uma doença crónica, de etiologia infecciosa e de carácter multifatorial, observando-se a migração apical do EJ, destruição gradual das fibras do ligamento periodontal, do tecido conjuntivo e do osso alveolar de forma irreversível. Menos prevalente do que a gengivite, é o resultado da atividade de microrganismos considerados periodontopatogénicos que produzem uma variedade de enzimas e toxinas que além de interferir com muitas funções celulares de defesa, e na presença de um hospedeiro suscetível associado aos fatores de risco, levam a uma progressão mais rápida na destruição tecidular. A formação de bolsas periodontais, devido à migração apical do EJ facilita a proliferação de bactérias anaeróbias, colonizando a camada mais externa do cemento radicular levando à destruição dos tecidos periodontais, à consequente recessão gengival e aumento da mobilidade dentária aliada à hemorragia dos tecidos moles (Marcus Brushi *et al* 2006; Carlos Carvalho *et al.* 2007; Angélica Madeiro *et al.* 2008; Highfield J. 2009; Dentino *et al.* 2013; Mansur *et al.* 2014).

Do ponto de vista clínico: alterações de cor, de consistência e de contorno do tecido gengival, hemorragia espontânea ou à sondagem periodontal, são indicadores da presença de inflamação ativa podendo potenciar ainda mais a perda de inserção clínica em diversos locais de doença ativa (Novak 2002; Highfield J. 2009).

Em bolsas periodontais com DP são detetadas facilmente através do teste bioquímico do FGC a deteção de moléculas que nos podem indicar a gravidade da doença periodontal, tais como: IgA, IL-1 $\beta$ , antagonistas do recetores de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ . PGE 2, TXB2, LTB4, MMP's, catepsinas B, D e G, para além de inibidores de elastases e catepsinas. Também pode ser detetado fosfatases alcalinas (ativadores de osteoclastos) e aspartato aminotransferase que indicam destruição tecidular. Outros produtos de degradação do tecido conjuntivo como collagenases, sulfato de condroitina e hidroxiprolina podem ser avaliados através do FGC para além de indicar a presença de várias estirpes bacterianas através dos testes microbiológicos, tais como, *Porphyromonas gin-*

*givalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella Intermedia*. O teste PerioScan também pode ser utilizado com amostras do FGC, para a detecção de bactérias que contêm peptidase tripsina (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* e *Campylobacter sp.*) através da reação enzimática BANA. Os testes bioquímicos do FGC é um método não invasivo e que nos fornece uma desmedida de informações acerca do processo inflamatório periodontal, sua progressão e etiologia específica (Mansur *et al.* 2014).

Os principais agentes periodontopatogénicos do microbioma infra-gengival estruturalmente complexo, organizado e desenvolvido, associados à periodontite ativa consistem principalmente num número elevado de: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola* e *Fusobacterium nucleatum* (Carlos Carvalho *et al.* 2007; Jane Manakil 2012).

#### **2.4.1 Definição de Periodontite Crónica**

Classificada durante muitos anos como a periodontite do adulto, até 1999, quando a AAP a reclassificou como periodontite crónica (PC), é a mais comum de todas as formas de periodontite. Tem uma maior expressão na idade adulta, a partir dos 35 anos e surge em consequência de uma gengivite crónica precursora, no entanto, nem todas as gengivites crónicas evoluem para uma PC. Clinicamente caracteriza-se pela presença de bolsas periodontais (profundidade de sondagem maior que 4 mm) e perda de inserção clínica, reabsorção do osso alveolar observada radiograficamente e a presença de dentes com mobilidade. Apresenta um padrão de destruição tecidual bilateral e simétrico, com um padrão de perda óssea horizontal contínua e com maior incidência nas zonas interproximais e sem sintomatologia na maior parte dos casos. Têm como característica uma progressão de destruição tecidual lenta, mas contínua, no entanto pode apresentar períodos de progressão rápida, possivelmente associada a fatores de risco sistémicos e ambientais (stress, hábitos tabágicos, diabetes e imunossupressão), a fatores genéticos e o contato com fato-

res locais predisponentes a gerar inflamação. É diferenciada das outras formas de periodontite por a função de defesa dos neutrófilos e linfócitos ser normal (Dias *et al.* 2006; Escudero-Castaño *et al.* 2008; Highfield J. 2009; Norma Botello *et al.* 2011).

A acumulação de depósitos de origem microbiana e de compostos salivares, normalmente em forma de cálculos salivares, recobertos por um microbioma vital com alta patogenicidade fortemente aderidos às superfícies dentárias, tanto a nível supra-gengival, mas em particular nas zonas infra-gengivais (bolsas periodontais), estão associados com a gravidade da doença. Embora a PC possa ocorrer de forma localizada ou generalizada, ambas as formas são idênticas na sua etiologia e patogénese. No que respeita à sua etiologia bacteriana as espécies mais prevalentes na periodontite crónica constam na Tabela 2 (pág. 33) (Norma Botello *et al.* 2011; Jane Manakil 2012).

A PC é classificada como localizada ou generalizada, com um grau de severidade leve, moderada ou avançada, dependendo da percentagem dos locais afetados e do nível de perda de inserção clínica, nomeadamente o padrão de reabsorção óssea diagnosticado através do cálculo da perda de inserção clínica e observada radiograficamente (Dias *et al.* 2006; Norma Botello *et al.* 2011).

A terapia periodontal não cirúrgica concomitante com bons hábitos de higiene oral, associada ao controlo dos fatores de risco é o tratamento de eleição desta forma de DP, não obstante nos casos mais severos a abordagem cirúrgica não é de desprezar aliada à antibióticoterapia (Dentino *et al.* 2013).

#### **2.4.2 Definição de Periodontite Agressiva**

A periodontite agressiva (PA), anteriormente classificada como periodontite juvenil pela AAP, é uma forma de doença periodontal rara, com maior prevalência e incidência em jovens e jovens adultos. Difere da PC por apresentar uma rápida destruição dos tecidos

periodontais e uma consequente perda de inserção clínica elevada, com o aparecimento de bolsas periodontais infra-ósseas geralmente com mais de 5 mm de profundidade (Virginia Hepp *et al.* 2007; Highfield J. 2009; Virginia Silveira *et al.* 2013; Jane Manakil 2012).

A PA pode ser classificada como localizada ou generalizada. Como consequência da agressividade da PA a reabsorção óssea só termina com uma terapia eficaz. A melhor forma de controlar a progressão da PA é pelo diagnóstico precoce, aumentando desta forma a possibilidade de sucesso com uma terapia adequada. É característica comum ter uma incidência em indivíduos clinicamente saudáveis e um padrão de perda óssea vertical (Virginia Hepp *et al.* 2007; Highfield J. 2009; Virginia Silveira *et al.* 2013; Jane Manakil 2012).

Segundo a AAP, a PA localizada apresenta uma: perda de inserção interproximal em pelo menos dois dentes permanentes, sendo eles os 1<sup>os</sup> molares ou incisivos, podendo ser maior que 4 mm e apresentar lesões de furca. A PA generalizada apresenta uma perda de inserção clínica interproximal nos primeiros molares e incisivos e em mais dentes permanentes. Radiograficamente observa-se perda óssea vertical alveolar nos primeiros molares e incisivos, parâmetro radiográfico fortemente associado com a PA, sendo aliás, um critério utilizado para o diagnóstico da doença em associação com o exame clínico (Virginia Hepp *et al.* 2007; Highfield J. 2009; Virginia Silveira *et al.* 2013; Orit Oettinger-Barak *et al.* 2013).

A presença de um microbioma estruturalmente complexo, desenvolvido e fino, sem estar associado a fatores locais de retenção de agentes bacterianos, ou à presença de cálculos salivares infra-gengivais é comum em ambas as formas de PA. A composição deste mesmo microbioma pode ser comparado na Tabela 2 (pág. 33) com o microbioma responsável pela PC. São poucas as espécies que mostram especificidade única entre PC e PA generalizada. Já os agentes periodontopatogénicos mais fortemente associados à PA localizada são *Aggregatibacter actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* que se encontram em número expressivo nas bolsas

periodontais. Vários autores têm defendido que a presença destes agentes periodontopatogénicos, em particular o *Aggregatibacter actinomycescomitans*, associado a um indivíduo geneticamente suscetível e com familiares com história de PA, ou por apresentarem anomalias na função fagocitária e um fenótipo de macrófagos híper-responsivos anormal, que induzem a altos níveis de PGE-2, são os fatores etiológicos principais desta forma de DP (Virginia Hepp *et al.* 2007; Jane Manakil 2012; Virginia Silveira *et al.* 20013).

Recentemente um estudo comparativo realizado por Carola Aberg *et al.* (2014), através de um estudo de pesquisa qualitativa demonstrou que, em determinados indivíduos adolescentes, a rápida destruição tecidual na PA está associada ao genótipo JP2 de *Aggregatibacter actinomycescomitans*, tendo a capacidade de produzir quantidades substanciais de toxinas e leucotoxinas, que acometem o seu efeito sobre as células de defesa imunitárias de formas diferentes: ligando-se à função do linfócito-associado-antígeno 1 (LFA-1) e a moléculas de células hematopoiéticas, induzindo à ativação e secreção de proteases lisossómicas a partir dos neutrófilos e a IL-1Beta a partir dos macrófagos, provocando uma elevada perda dos níveis de inserção clínica.

Requer como tratamento, para além do tratamento periodontal não cirúrgico, terapia antibiótica sistémica ou local, uma vez que a terapia de remoção de depósitos microbianos aliada à RAR é ineficaz para a completa eliminação do *Aggregatibacter actinomycescomitans*, podendo também ser necessário uma abordagem cirúrgica para correção de defeitos ósseos (Virginia Hepp *et al.* 2007; Jane Manakil 2012; Virginia Silveira *et al.* 2013, Orit Oettinger-Barak *et al.* 2013).

## **2.5 Resposta do Hospedeiro**

A ativação do sistema imunológico pelos antígenos periodontopatogénicos é decisiva no desenrolar e progressão da DP, uma vez que os processos patogénicos são em grande parte mediados pela resposta do hospedeiro aos fatores de virulência bacterianos e pela produção de enzimas proteolíticas das estirpes presentes no microbioma das superfícies

radiculares, do ES e EJ induzindo a destruição tecidual. Essa resposta imune que por um lado é protetora, em alguns momentos contribui para uma rápida progressão da perda estrutural do periodonto (Diana Correia *et al.* 2010; Priscilla Naiff *et al.* 2012).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) são responsáveis pela resposta inata perante agressão bacteriana. Na DP os leucócitos PMN estão presentes nas bolsas periodontais sendo os principais responsáveis pela interrupção ou redução do processo infeccioso. Iniciam a sua função através de mediadores químicos, nomeadamente a IL-8, produzida em especial pelas células do EJ. Muitos PMN atravessam o EJ e são atraídos aos locais onde estão presentes os agentes periodontopatogénicos (Javier Botero 2009; Diana Correia *et al.* 2010).

Na consequência das interações entre os PMN e as bactérias, estes libertam a enzima metaloproteinase, uma protease designada (MMP-8). No entanto, níveis desta enzima podem levar a uma destruição tecidual e a um aumento da progressão da DP, uma vez, que a MMP-8 tem como função a degradação de proteínas constituintes das células do tecido conjuntivo (elastina e colagénio). De igual modo a catepsina G, lactoferrina, defensinas e mieloperoxidasas, também libertadas pelos PMN, são nocivas para os tecidos periodontais (Javier Botero 2009; Diana Correia *et al.* 2010).

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  secretadas por diversos tipos de células são responsáveis pela iniciação e a manutenção da resposta imune, para além de sinalizar os fibroblastos a produzir PGE-2 e MMPs. A PGE-2 estão envolvidas na reabsorção óssea alveolar por desencadear a ativação da função osteoclástica (Diana Correia *et al.* 2010; Priscilla Naiff *et al.* 2012).

Das diferentes classes de imunoglobulinas, três tem influência no microbioma oral por interferir na adesão microbiana ou inibindo o metabolismo celular do agente patogénico. Essas classes são as imunoglobulinas A, G e M (IgA, IgG e IgM), pacientes com DP ativa

apresentam na saliva uma concentração maior destas imunoglobulinas do que um paciente com periodonto saudável. Apesar da imunidade mediada por IgA, IgM e IgG ser protetora, podem também ter efeitos prejudiciais ao periodonto, onde os anticorpos podem dar início a atividades indiretas como internalização mediada por recetores Fc (opsonização) e à ativação da via clássica do Sistema Complemento. O sistema imunológico humoral, controlado primariamente por plasmócitos, é considerado por alguns autores como fator predominante na progressão da doença periodontal. A concentração sérica de IgG surge como uma reação à presença específica de bactérias periodontopatogénicas, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Além disso, foi evidenciado que o nível sérico de IgG está diretamente relacionado à gravidade da doença medida por meio dos parâmetros clínicos como a profundidade de sondagem e a hemorragia pós sondagem (Javier Botero 2009; Priscilla Naiff *et al.* 2012).

## **2.6 Tratamento das Doenças Periodontais**

O tratamento das doenças periodontais tem como objetivo principal a redução da inflamação dos tecidos periodontais, através da remoção de depósitos de origem microbiana calcificados e recobertos por um biofilme vital (cálculos salivares), através do tratamento mecânico e desbridamento supra e infra-gengival, aliado a um doente participativo (instruído e motivado) no que toca aos cuidados do controlo microbiológico minucioso dos locais afetados pela DP, concomitante com a RAR (no caso da periodontite), com o intuito de promover uma desinfeção local e inibir os processos inflamatórios. Por vezes associado a agentes antissépticos e/ou antimicrobianos com o objetivo de promover uma alteração do microbioma supra e infra-gengival para uma composição compatível com saúde periodontal, para além de que alguns fármacos, como a doxiciclina, acometem para além da sua actividade antibacteriana uma modelação da resposta imune (Paola Palacio *et al.* 2008; Larry Sweeting *et al.* 2008; Willer Osorio *et al.* 2012, Jane Manakil 2012).

Este é o tratamento de eleição para o início do tratamento das doenças periodontais, conhecido como tratamento periodontal não cirúrgico, no entanto, em bolsas periodontais

mais profundas onde a eficiência da RAR é menor, a administração de antibióticos coadjuvantes à terapia clássica, como: Tetraciclina (Minociclina e Doxiciclina), Amoxicilina, Amoxicilina associada ao Ácido Clavulânico, Clindamicina, Eritromicina, Ampilicina e os compostos do Nitroimidazol: Metronidazol e Ornidazol, podem levar a uma resposta mais eficiente na cicatrização dos tecidos periodontais, diminuindo as unidades formadoras de colónias de espécies periodontopatogénicas e modular a resposta do hospedeiro. No entanto em situações de DP mais avançada, a terapia periodontal poderá passar por uma abordagem cirúrgica, essencialmente em casos de PA localizada ou generalizada e na PC avançada (Paola Palacio *et al.* 2008; Willer Osorio *et al.* 2012, Jane Manakil 2012).

Em resultado do tratamento, os parâmetros clínicos obtidos devem ser compatíveis com um periodonto ausente de inflamação, ou seja, profundidade de sondagem até 3 mm, ausência de hemorragia à sondagem, manutenção ou ganho dos níveis de inserção clínicos, diminuição da mobilidade dentária e uma melhor arquitetura dos tecidos moles de forma a tornar mais eficaz a higiene oral por parte do doente (Larry Sweeting *et al.* 2008; Highfield J. 2009; Alex Berezow, Richard Darveau 2011; Dentino *et al.* 2013).

### **2.6.1 Protocolo da Terapia Periodontal Não Cirúrgica**

Independentemente dos avanços recentes acerca da etiologia e patogenia da DP a avaliação da história clínica (alterações sistémicas e medicação atual), além dos fatores de risco que possam estar associados e os registos dos parâmetros clínicos periodontais tradicionais são basilares para o diagnóstico das várias formas de DP. Estes parâmetros incluem: profundidade de sondagem, índice de hemorragia à sondagem, presença de supuração, o registo da presença, grau e distribuição dos depósitos microbianos em forma de cálculos ou não, o registo dos níveis de inserção clínica, o grau de envolvimento de furca e de mobilidade dentária, a extensão da recessão gengival, avaliação da arquitetura gengival e do biótipo gengival, a avaliação de restaurações que possam ser fatores de retenção bacteriana, avaliação de fatores oclusais aliado a meios de diagnóstico, nomeadamente o status radiográfico que permita avaliar o padrão de reabsorção alveolar e quantificar a perda

óssea alveolar, para além, de testes microbiológicos e bioquímicos (Larry Sweeting *et al.* 2008).

Larry Sweeting *et al.* (2008) de acordo com a modificação realizada pela American Academy of Periodontology (2008), sugeriram as guidelines dos registos basilares para um exame periodontal amplo, completo e sumário com fim ao correto diagnóstico da forma de DP. No entanto a AAP em novembro de (2010) reviu estas mesmas guidelines acrescentando a necessidade de avaliação de mais parâmetros clínicos, como possíveis lesões endo-perio, avaliação dos tecidos peri-implantares quando presentes, e a avaliação da necessidade de reabilitação com implantes dentários.

Tem sido claramente demonstrado que diferentes interpretações no diagnóstico da DP, podem ter um impacto dramático sobre as decisões da terapia periodontal a adoptar (Larry Sweeting *et al.* 2008; Highfield J. 2009).

Os registos dos parâmetros clínicos permitem um correto diagnóstico, prognóstico e estabelecer um plano lógico de tratamento com fim a aliviar, diminuir e eliminar os sinais inflamatórios do periodonto, de forma a protelar a progressão da destruição tecidual. O plano de tratamento periodontal deve estabelecer métodos, uma sequência da terapia periodontal a cumprir, podendo ser baseado apenas na abordagem não cirúrgica ou considerar uma abordagem cirúrgica para correção de defeitos ósseos, permitir o acesso a locais onde os instrumentos da RAR não conseguem chegar, regenerar tecidos perdidos em algumas formas de DP e/ou abordar técnicas de cirurgia plástica periodontal (American Academy of Periodontology 2010).

Nesta fase ainda há que ponderar, a necessidade do controlo de doenças sistémicas, realização de tratamentos dentários restauradores, protéticos e endodônticos, análise e interpretação dos testes de diagnóstico que possam incluir testes microbiológicos, avaliação bioquímica com fim avaliar a suscetibilidade genética do doente, e considerar os fatores

de risco presentes que possam alterar o programa de avaliação, reavaliação e manutenção periodontal (American Academy of Periodontology 2010).

Antes do início da terapia, é fundamental possuir todos os parâmetros clínicos e radiológicos inicialmente registados, seja informaticamente ou em ficha própria, pois sem eles não conseguimos avaliar as reais necessidades do doente, consciencializá-lo e torná-lo parte integrante da terapia periodontal, assim como o prognóstico para algumas peças dentárias sem alternativa possível de manutenção. Informar o doente de outros tratamentos orais necessários, assim como a necessidade de uma terapia periodontal de suporte para o controlo da DP a longo prazo (American Academy of Periodontology 2010).

Segundo Dentino *et al.* (2013), este estabelece 5 fases para o tratamento de diversas formas de doença periodontal, sendo que neste trabalho apenas é alvo de estudo o tratamento periodontal não cirúrgico, segundo o mesmo autor, a terapia dividida em 3 fases é geralmente suficiente para o tratamento de pacientes com formas de DP assintomática:

- Fase I: Fase sistémica:
- Fase II: Fase higiénica ou dirigida à causa
- Fase III: Fase de terapia de suporte periodontal

A fase sistémica implica o controlo de doenças sistémicas por parte do médico assistente, que possam por em causa a saúde geral e oral do paciente, em consequência do tratamento que será realizado. Avaliar a necessidade de pré-medicação, assim como tomar medidas para o controlo da ansiedade que o paciente possa apresentar, para além de o motivar a modificar alguns fatores de risco modificáveis (ex. cessão tabágica) (Dentino *et al.* 2013).

A fase higiénica compreende a motivação, instrução e a referência dos métodos de higiene oral através das técnicas que mais se adequam ao doente para controlo dos microbiomas dento-gengivais, e estabelecer metas que sejam aceitáveis para o sucesso da terapia. A implementação de estratégias de redução de risco, o tratamento de lesões cariosas pro-

fundas e determinar a sua restaurabilidade associado à exodontia de dentes periodontalmente comprometidos concomitante com o desbridamento, remoção dos depósitos bacterianos mineralizados, ou não, do microbioma supra e infra gengival, juntamente com RAR das peças dentárias são realizadas nesta fase (Dentino *et al.* 2013).

A administração de antimicrobianos sistémicos ou locais pode ser ponderada nesta fase aliada à utilização de antissépticos em forma de colutório e/ou dentífricos. A remoção de fatores locais retentivos de agentes bacterianos, a necessidade de tratamentos endodônticos e de terapia oclusal podem ser cruciais para o sucesso da terapia periodontal. A reavaliação dos parâmetros clínicos pós-tratamento até restabelecer condições de saúde periodontal é requisito para se iniciar o protocolo de terapia de suporte periodontal (Dentino *et al.* 2013).

Na fase de manutenção periodontal: é estabelecido um intervalo de tempo entre consultas por parte do profissional de saúde consoante as necessidades do paciente, entre 2 e 6 meses. Nesta fase são avaliados os parâmetros clínicos e radiográficos, para descartar uma possível reinfeção de algum local, aplicadas medidas terapêuticas quando necessárias ou de suporte se a DP controlada, se necessário reforçar a motivação ou alterar métodos de higiene oral com fim a promover um microbioma das superfícies dentárias compatível com saúde periodontal (Dentino *et al.* 2013).

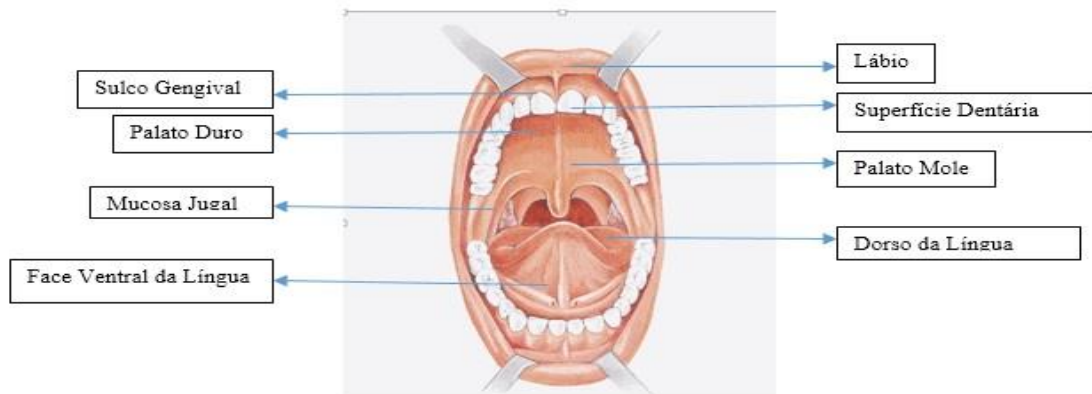
### 3. O Microbioma Oral

Compreender o papel das comunidades microbianas no ser humano saudável está a ser nos últimos anos como um dos mais importantes e fascinantes desafios biomédicos. O corpo humano abriga uma enorme quantidade de células microbianas, estimando-se ultrapassar o número de células do corpo humano. Estes microrganismos estão organizados em comunidades complexas especificamente adaptadas para colonizar os vários nichos ecológicos do ser humano, como na cavidade oral (Bo Liu *et al.* 2012).

O microbioma oral (termo mais recente para definir os biofilmes orais) são funcionalmente e estruturalmente organizados em comunidades polimicrobianas que estão incorporadas numa matriz extracelular de exopolímeros nas mucosas orais e nas superfícies dentárias. Estes diferentes microbiomas encontram-se naturalmente no hospedeiro saudável proporcionando benefícios para o mesmo. No entanto quando ocorre um desequilíbrio entre os microrganismos dos microbiomas e o hospedeiro, as bactérias ditas comensais podem se tornar bactérias patogénicas levando à ocorrência de patologias na cavidade oral (Thuy Do *et al.* 2013).

A cavidade oral alberga vários nichos ecológicos, apresentados na Figura 3, tais como, lábios, mucosa jugal, língua, palato duro e palato mole, sulco gengival e superfícies dentárias. Na verdade, devido à existência dos dentes e do periodonto, além das outras estruturas da cavidade oral, esta não é um local ecológico único, mas apresenta vários nichos ecológicos, cada qual com características ambientais próprias e, conseqüentemente, cada qual com o seu microbioma específico. Temos o microbioma das superfícies mucosas lisas, o microbioma da mucosa do dorso da língua que não apresenta características lisas, o microbioma das superfícies dentárias saudáveis, o microbioma da superfície dentária cariada, o microbioma do sulco gengival saudável e o microbioma da bolsa periodontal inflamada. Portanto a cavidade oral apresenta no seu microbioma alterações conforme a sua localização e composição. Cada superfície abriga uma diversificada microflora bacteriana com características próprias, quer na composição, quer no seu metabolismo que é

ditado pelas propriedades biológicas de cada local (Socransky *et al.* 2002; Biswajit Batabyal *et al.* 2012).



**Figura 3: Nichos ecológicos da cavidade oral** (Importada do documento: <http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/Study%20Guides/APII%20Study%20Guide%20K%20Digestive%20Anatomy.htm>).

Segundo Floyd *et al.* (2010) e Igor Andrade *et al.* (2011) a cavidade oral alberga mais de 700 espécies bacterianas das quais cerca de 50% são bactérias não cultiváveis. Assim, a identificação da flora microbiana oral realiza-se tanto através de métodos de microbiologia clássica, como através dos métodos de biologia molecular usando principalmente estudos baseados no gene 16S rRNA. Os géneros bacterianos com maior representação no microbioma oral, como podemos observar na Tabela 1, já classificados são: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilis*, *Lactobacillus*, *Capanocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* e *Propionibacterium*.

A maioria destas bactérias mantem uma relação simbiótica com o hospedeiro, beneficiando de benefícios mútuos, não causando doenças ao hospedeiro (população comensal) e de certa forma evitam que bactérias patogénicas proliferem e adiram ao microbioma dos vários nichos ecológicos da cavidade oral (Maria Avila *et al.* 2009).

**Tabela 1: Géneros bacterianos com maior representação no microbioma oral**

Género Bacteriano	<i>Streptococcus</i>
	<i>Actinomyces</i>
	<i>Veillonella</i>
	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Porphyromonas</i>
	<i>Prevotella</i>
	<i>Neisseria</i>
	<i>Haemophilis</i>
	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Capnocytophaga</i>
	<i>Eikenella</i>
	<i>Leptotrichia</i>
	<i>Peptostreptococcus</i>
	<i>Staphylococcus</i>
<i>Propionibacterium</i>	

À nascença a cavidade oral do ser humano é estéril e a colonização da cavidade inicia-se após o parto, essencialmente por bactérias facultativas aeróbias, considerando-se que nas primeiras 4 a 12 horas o microbioma oral é composto principalmente *por Streptococcus viridans*, no entanto dias depois podem ser encontradas bactérias anaeróbias facultativas. Após a erupção dentária a diversidade bacteriana aumenta, pois, a cavidade oral apresenta mais áreas de retenção para biofilmes bacterianos. Ou seja, o microbioma oral durante a fase onde não existe a presença de peças dentárias caracteriza-se pela presença de estafilococos, diplococos de Gram-positivos, difteroides e lactobacilos. A partir da erupção do 1º dente o microbioma oral altera-se estando presentes espécies como espiroquetas anaeróbias, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, espécies de *Rothia* e *Capnocytophaga*, assim como, vibrões anaeróbios e lactobacilos, sendo na sua maioria espécies de Gram-negativo (Anne Leite *et al.* 2008; Maritza Sisto *et al.* 2012).

Segundo Paul Kolenbrander (2000) e Jane Manakil (2012), as comunidades microbianas orais são compostas por várias espécies de bactérias que vivem em estreita justaposição nas diversas superfícies que se encontram na cavidade oral. Estas bactérias comunicam entre si através de interações físicas, de co-adesão e de co-agregação, bem como outras interações metabólicas e fisiológicas. Os géneros *Streptococcus* e *Actinomyces* são os principais colonizadores iniciais das superfícies dentárias, e as interações entre eles e os seus substratos ajudam no desenrolar de outras espécies no microbioma das superfícies dentárias.

### **3.1 Formação do Biofilme Bacteriano**

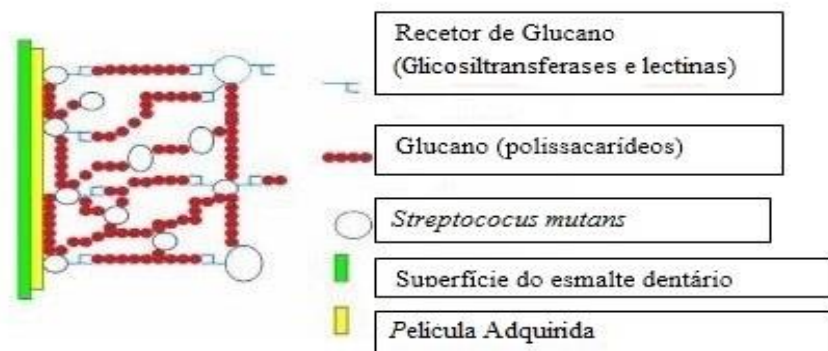
A formação do biofilme bacteriano é o resultado de uma série de processos complexos que envolvem uma multiplicidade de espécies bacterianas e compostos presentes na cavidade oral. Estes processos compreendem em primeiro lugar, a formação da película adquirida sobre as superfícies dentárias e as demais presentes na cavidade oral, seguindo-se a colonização por microrganismos específicos aderidos à película adquirida e a consequente formação da matriz extracelular do biofilme bacteriano (Garcia Bernardo *et al.* 2014).

#### **3.1.1 Película Adquirida**

A película adquirida é uma fina membrana biológica de dimensões (0,1 a 0,3 micrómetros) que se desenvolve pós-eruptivamente nas superfícies dentárias como resultado da absorção de proteínas e glicoproteínas que se encontram na saliva, no FGC, dos alimentos ingeridos, assim como também de outros produtos bacterianos e de células descamativas. No entanto, a absorção destas biomoléculas não se dá apenas no esmalte dentário, mas ocorre também no cimento e dentina radicular quando presente recessão gengival, nas mucosas, no epitélio oral queratinizado e não queratinizado, assim como em restaurações, próteses dentárias e aparelhos ortodônticos, no entanto com uma composição química diferente (Francia Melchora *et al.* 2006, Mansur *et al.* (2014).

Segundo alguns autores, a formação da película adquirida dá-se por forças físicas entre as superfícies orais e os compostos orgânicos e inorgânicos presentes nos fluídos da cavidade oral. A composição desta película é composta essencialmente pelos componentes da saliva e do FGC, a qual é composta por eletrólitos (potássio (K<sup>+</sup>), cloreto (Cl<sup>-</sup>), cálcio (Ca<sup>2+</sup>), Magnésio (Mg<sup>2+</sup>), fósforo, Sódio (Na<sup>+</sup>) e bicarbonato) e por uma componente orgânica de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, mucinas, proteínas ricas em prolina e glicoproteínas, estaterina, alfa-amílases, peroxidases, lactoferrina, lisozima, IgA secretora, fibronectina e lectinas (Francia Melchora *et al.* 2006; Maria Nunes *et al.* 2007).

A adesão bacteriana à película adquirida dá-se por algumas espécies bacterianas possuírem na sua superfície estruturas proteicas denominadas de fímbrias, que têm a função de adesão à proteína salivar rica em prolina, lactoferrina e estaterina contidas na película adquirida. As fímbrias podem ser encontradas em várias espécies bacterianas, tais como: *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, na Figura 4 podemos observar as primeiras adesões de agentes bacterianos, nomeadamente do género *Streptococcus* (Maria Nunes *et al.* 2007).



**Figura 4: Adesão bacteriana à película adquirida**

(Importada do documento <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABaEMAE/ecossistema-bucal?part=2>)

Outro aspeto importante no desenvolvimento da película adquirida é o fator da co-agregação de interação de espécies bacterianas em suspensão entre pares de microrganismos orais tornando-se este fator importante para o desenvolvimento do microbioma dentário. Segundo a literatura atual, são reconhecidos seis grupos de espécies bacterianas associadas intimamente: o complexo azul de *Actinomyces*, o complexo amarelo formado por *Streptococcus*: *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *Streptococcus sp*, *S. gordini* e *S. intermedius*, o complexo verde formado por *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga concisus*, *Selenomonas sputigena* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. O complexo roxo formado por *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. Estes grupos são considerados os primeiros colonizadores do microbioma da superfície dentária e geralmente precede a multiplicação do complexo predominante de Gram-negativo o complexo laranja onde são encontradas espécies bacterianas tais como *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Polymorphum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella micros*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, e o complexo vermelho formado por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Estudos tem demonstrado que cada grupo tem um outro para se co-agregar. (Maria Nunes *et al.* 2007; Maritza Sisto *et al.* 2012).

### **3.1.2 Microbioma Supra-gengival**

Os microrganismos responsáveis pelas doenças periodontais que se encontram-se coronalmente à margem gengival, fortemente aderidos ao microbioma da superfície dentária, são compostos essencialmente por *Actinomyces*. Na sua fase inicial, onde a predominância é de *Streptococcus* (grupo *viridans*) em conjunto com uma pequena porção de bacilos de Gram-positivos, essencialmente *Actinomyces viscosus* e *Actinomyces naeslundii* que se aderem à película adquirida através de adesinas, que interagem com recetores específicos da película adquirida (Maria Nunes *et al.* 2007).

Outro mecanismo determinante na seletividade inicial na colonização da película adquirida são as fímbrias que algumas bactérias apresentam. Após o primeiro dia de desenvolvimento do microbioma dentário a proporção de *Streptococcus* diminui para cerca de 45%, enquanto a proporção de cocos de Gram-negativos anaeróbios (*Veillonella*) tem um aumento aproximadamente de 20%. Após o terceiro dia verifica-se que espécies anaeróbias facultativas de *Actinomyces sp* rondam os 25% do microbioma supra-gengival, enquanto bacilos de Gram-negativos anaeróbios (*Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella* e *Porphyromonas*) já representam cerca de 50%. A maturação deste vai permitindo cada vez mais a multiplicação de microrganismos anaeróbios com a proliferação de bacilos de Gram-negativos nas camadas mais profundas do microbioma fortemente aderido à superfície dentária, na mesma medida que a matriz de exopolissacarídeos se desenvolve estruturalmente (Fabio Eto *et al.* 2003; Maria Nunes *et al.* 2007).

A matriz de exopolissacarídeos secretada para o meio externo, é composta por proteínas, ácidos nucleicos, entre outros. Tendo como função impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos, a proteção contra radiações UV, alterações de pH e choques osmóticos (Fabio Eto *et al.* 2003; Maria Nunes *et al.* 2007).

Segundo Fabio Eto *et al.* (2003) na colonização secundária, as diferentes espécies de microrganismos (*Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, espécies de *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*) aderem às bactérias que colonizam inicialmente a película adquirida. Segundo o autor as interações microbianas são importantes nas diferentes condições periodontais, podendo estar presentes num período saudável ou na presença de doença periodontal ativa. Parece provável que determinadas associações podem favorecer a colonização por espécies consideradas periodontopatogénicas (associação positiva), ou serem antagonistas a esta colonização (associação negativa), considerando os fatores de proteção do hospedeiro, como o epitélio, o fluxo do FGC, a imunidade celular e a rápida reposição dos tecidos, dificultando assim a adesão de microrganismos periodontopatogénicos.

### 3.1.3 Microbioma Infra-gengival

A natureza do microbioma infra-gengival torna-se mais complexa, uma vez que existe um microbioma associado às peças dentárias, outro associado ao epitélio oral e outro ao tecido epitelial do sulco gengival. No entanto, o microbioma infra-gengival assemelha-se ao microbioma supra-gengival nos casos de saúde periodontal. Estas bactérias compreendem-se entre microrganismos de Gram-positivos (85%), nomeadamente *Streptococcus* e *Actinomyces* (Maria Nunes *et al.* 2007).

Com o desenrolar da gengivite, o microbioma infra-gengival eleva a sua complexidade em comparação com o microbioma compatível com saúde periodontal. A composição bacteriana do microbioma infra-gengival responsável pela DP, está bem documentada na literatura e é alvo de análise constante pela comunidade científica. Sendo assim acentua-se o aumento de espécies de Gram-negativos anaeróbios estritos (45%) especialmente *Fusobacterium nucleatum*, espécies do género *Tannerella* e *Prevotella intermedia*, enquanto que nos casos de DP mais avançada (periodontite) são encontrados bacilos de Gram-negativos e microrganismos anaeróbios (cerca de 75%) incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, e mais recentemente *Filifactor alocis*, *Staphylococcus aureus* e espécies do género *Desulfobulbus* foram identificadas como possíveis agentes periodontopatogénicos, uma vez que o desenvolvimento de bolsas periodontais apresentam um ambiente propício à proliferação destas bactérias (Maria Nunes *et al.* 2007; Marja Pöllänen *et al.* 2013).

A não remoção do microbioma infra-gengival (complexo e patogénico) por parte dos pacientes que sofram de doença periodontal, associado à resposta inflamatória leva a um aumento do fluxo do FGC. Este fluído proteico é uma fonte de nutrientes para várias espécies de microrganismos, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, e *Treponema sp.* Estes microrganismos são reconhecidos por periodontopatogénicos capazes de ultrapassar a barreira tecidual e alojar-se dentro das células epiteliais e conjuntivas (Maria Nunes *et al.* 2007).

#### 4. Microbiologia da Doença Periodontal

A elevada prevalência e incidência das doenças periodontais representa um enorme problema de saúde pública. Na cavidade oral humana encontramos diversos locais ecológicos, o que torna este ecossistema distinto de outras áreas do corpo, devido à presença de dentes, mucosas, saliva e do FGC. Assim, é observada uma comunidade microbiana bastante complexa, com aproximadamente 700 espécies bacterianas (Kolenbrander *et al.* 2010).

O desequilíbrio ecológico leva a que diversos microrganismos sejam capazes de agredir o hospedeiro devido aos seus fatores de virulência e induzirem a resposta inflamatória por parte do hospedeiro, desencadeando assim o processo de inflamação periodontal e promover a destruição dos tecidos periodontais (Periodontite) (Bartold *et al.* 2010).

Descrever e enumerar as principais bactérias implicadas na etiologia das várias formas das doenças periodontais, não é uma tarefa fácil, uma vez que a revisão extensa da literatura sobre o tema, por vezes é contraditória. Há estudos que confirmam que determinadas espécies bacterianas estão diretamente relacionadas com o início e progressão das doenças periodontais, e outros autores classificam várias espécies bacterianas como “possíveis agentes periodontopatogénicos”. Podemos verificar na Tabela 2 as espécies bacterianas com maior frequência em algumas formas de doença periodontal como a Gengivite, a Periodontite Crónica e a Periodontite Agressiva (Francisco Rodriguez *et al.* 2004; Jane Manakil 2012).

**Tabela 2 Espécies de bactérias detetadas com maior frequência na doença periodontal** (Importada do documento: Manakil, J. (2012). *Periodontal Disease - A Clinician's Guide*. Croatia, InTech, p.14).

Espécie Bacteriana	Gengivite	Periodontite Crónica	Periodontite Agressiva	
			Localizada	Generalizada
<i>Aggregatibacter</i>				
<i>Actinomycecomitans (Aa)</i>		+	+	+
<i>Campylobacter rectus</i>	+	+		+
<i>Capnocytophaga</i>	+		+	+
<i>Cryptobacterium curtum</i>		+		
<i>Eikenella corrodens</i>	+	+	+	+
<i>Enterobacteriaceae</i>		+	+	
<i>Eubacterium saphenum</i>		+		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	+	+	
<i>Micromonas</i> <i>(Peptostreptococcus) micros</i>		+	+	
<i>Mogibacterium (Eubacterium)</i>		+		
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+	+		
<i>Porphyromonas endodontalis</i>		+		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+	+		+
<i>Prevotella intermedia</i>	+	+	+	+
<i>Slakia (Eubacterium) exigua</i>		+		
<i>Tannerella Forsythia</i>		+		
<i>Treponema amylovorum</i>		+		+
<i>Treponema denticola</i>	+	+		
<i>Treponema lacithinolyticum</i>				+
<i>Treponema maltophilum</i>		+		
<i>Treponema medium</i>	+	+		
<i>Treponema pectinovorum</i>	+	+		+
<i>Treponema socranskii</i>	+	+		+
<i>Treponema vincentii</i>	+	+		+
<i>Veillonella parvula</i>	+			

Segundo Priscilla Naiff *et al.* (2012) um estudo realizado por Socransky e colaboradores (1998), as estirpes bacterianas que geralmente estão associadas à doença periodontal são na sua maioria, de Gram-negativas anaeróbias estritas ou facultativas, tais como, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Parvimonas micra*, *Treponema denticola*, *Selenomonas spuitigea*, *Eubacterium sp* e algumas espécies de espiroquetas.

As primeiras reações dos tecidos periodontais perante o biofilme bacteriano, são inflamatórias e imunológicas com o intuito de proteger a invasão bacteriana dos tecidos periodontais. Bolsas periodontais profundas alojam um número expressivo de microrganismos, a maioria espécies de Gram-negativos anaeróbios onde três espécies se destacam: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, devido à sua alta frequência encontrada em lesões periodontais e também do seu potencial periodontopatogénico (Fabio Eto *et al.* 2003; Francisco Rodríguez *et al.* 2007; Virginia Silveira *et al.* 2013).

#### **4.1 Bactérias associadas à Doença Periodontal**

Consideram-se agentes periodontopatogénicos as estirpes bacterianas anaeróbias, entre as quais configuram: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens* e *Capnocytophaga ochracea*. Estas espécies estão fortemente associadas aos diferentes tipos de periodontite, no entanto, existem outros microrganismos associados às doenças periodontais com menor frequência (Maritza Sisto *et al.* 2012, Jane Manakil 2012).

Segundo Myriam M. *et al.* (2010) estão estabelecidas três categorias de espécies marcador da DP, as quais apresentam fortes fatores de virulência, como a produção de metabolitos, de endotoxinas, de leucotoxinas, de epiteliotoxinas, de enzimas proteolíticas, da

capacidade da inibição de fibroblastos, além da presença de adesinas, fímbrias, e da cápsula bacteriana. Dentro das que apresentam fortes fatores de virulência configuram espécies como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Tannerella forsythia*. As que apresentam alguns fatores de virulência como produção de endotoxinas, de adesinas, de fatores supressores de linfócitos B, além da presença da cápsula e de fímbrias, configuram espécies como *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*, sendo que as menos patogênicas são *Fusobacterium nucleatum* e *Campylobacter rectus*. Segundo a mesma autora, e tendo em conta o papel destas estirpes bacterianas na iniciação e perpetuação do processo inflamatório, a sua identificação seria muito importante para definir a etiologia e um tratamento mais adequado, através da utilização de antimicrobianos.

#### **4.1.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Este microrganismo foi isolado pela primeira vez por Klinger em 1912, estava classificado como *Bacterium actinomycetum comitans*, Lieske em 1921 denominou-o por *Bacterium Comitans* e mais tarde, Topley e Wilson em 1929 denominaram-no com o nome mais conhecido que perdurou durante várias décadas *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Donalds Perfecto 2011).

Neils e Mogens, através de estudos de biologia molecular, encontraram uma grande semelhança com quatro bactérias: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* e *Haemophilus segnis*, reclassificando estas bactérias num novo género chamado *Aggregatibacter*, pertencendo à família Pasteurellaceae (Donalds Perfecto 2011).

Esta bactéria é um cocobacilo de Gram-negativo com dimensões de 0,4-0,5 x 1,0-1,5 um, sem motilidade, não esporulado, capsulado, com fímbrias, e um microaerófilo. A sua parede celular apresenta as chamadas endotoxinas, lipolissacarídeos características dos Gram negativos, e também é um produtor de uma variedade de enzimas. Apresenta como

fatores de virulência: resistência à fagocitose, produção de toxinas que lhe dão grande virulência na patologia periodontal, como leucotoxinas, collagenases, epiteliotoxinas, e bacteriocinas, a toxina de distensão citoletal, endotoxinas, proteínas unidas aos recetores Fc e inibição de fibroblastos. Outros fatores que podem aumentar a sua virulência são a produção de bacteriocinas, alteração quimiotaxia de neutrófilos, produção de catalases leucocitárias e superóxido dismutase inibindo a morte intracelular e apresentar plasmídeos e bacteriófagos, além da capacidade de invadir os tecidos do hospedeiro e possui fatores de imunossupressão (Donalds Perfecto 2011; María Cárdenas-Perea *et al.* 2014; Orit Oettinger-Barak *et al.* 2013).

#### **4.1.2 *Porphyromonas gingivalis***

*Porphyromonas gingivalis* é um cocobacilo de Gram-negativo anaeróbio estrito e está presente em diversas formas de DP, sendo por isso um importante agente etiológico da DP. A colonização por esta bactéria resulta em lesão tecidular através de peptidases, endotoxinas metabólicas que levam à desregulação do sistema imunitário e inflamatório do hospedeiro. Esta bactéria parece ter um papel significativo na progressão e agravamento da PC, para além de estar envolvida em abscessos periodontais e no insucesso da regeneração tecidular guiada, muito associada à destruição do tecido conjuntivo e à reabsorção alveolar por ativação dos osteoclastos e provocar a libertação de PGE-2, IL-8 e IL-1B. Apresenta como outros fatores de virulência a sua capacidade inicial de adesão e coagregação através de fímbrias que se comportam como adesinas, possuem cápsula, produzem proteases, collagenases semelhantes à tripsina, hialuronidase e fosfatases alcalinas. Devido à sua estrutura química, os LPS que apresenta são dos mais patogénicos para os tecidos periodontais, além de possuir atividade hemaglutinante e possuem vesículas superficiais para a captação de nutrientes (Howard K. Kuramitsu 2001; Carlos Carvalho *et al.* 2007).

#### 4.1.3 *Prevotella sp*

É neste género onde se incluem as espécies *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella melaninogenica*, consideradas pela extensa literatura como bactérias periodontopatogénicas. São cocobacilos pleomórficos de Gram-negativos, anaeróbios estritos, capsulados, fimbriados, sensíveis aos sais biliares e moderadamente fermentativos. Como fatores de virulência possuem endotoxinas, cápsula, fimbrias, produzem adesinas e complementases. Apresentam epiteliotoxinas, produzem fatores supressores de linfócitos B e de fibroblastos, têm ação fibrinolítica e de degradar imunoglobulinas, no entanto, e em virtude da sua cápsula é resistente à fagocitose, estes fatores são menos potentes que as pertencentes às espécies *Porphyromonas* (Jane Manakil 2012).

#### 4.1.4 *Fusobacterium nucleatum*

Bacilo grande, fusiforme, com extremidades pontiagudas, de Gram-negativo, fimbriado, anaeróbio estrito, imóvel e não capsulado. É um importante agente patogénico, particularmente no início da doença periodontal progressiva. Possuem escassos fatores de virulência, no entanto os seus LPS são extremamente nocivos, bem como o ácido butírico que produz. Apresentam fimbrias, endotoxinas, adesinas e um fator solúvel inibidor da quimiotaxia leucocitária, levam à estimulação de colagenases e um aumento da migração e sobrevivência das células epiteliais infetadas (Veli-Jukka Uitto *et al.* 2005; Ljiljana Kesic *et al.* 2008).

#### 4.1.5 *Campilobacter rectus*

É um bacilo ligeiramente curvo de Gram-negativo-negativo, móvel, microaerófilo suportando pequenas quantidades de oxigénio e necessita de uma elevada concentração de di-

óxido de carbono para o seu crescimento. Apresenta como fatores de virulência endotoxinas, fimbrias, flagelos (móvel), além da produção de leucotoxinas (Francisco *et al.* 2004; Jane Manakil 2012).

#### **4.1.6 *Eikenella corrodens***

É um bacilo de Gram-negativo, anaeróbio facultativo, capnófilo, não flagelado, no entanto, pode mover-se por movimentos deslizantes. Pode habitar diversas partes do organismo humano, e considera-se periodontopatogénico, uma vez que em estudos experimentais em ratos gnotobióticos (livres de microrganismos ou com microbiota conhecida) é capaz de induzir reabsorção óssea (Francisco Rodriguez *et al.* 2004).

#### **4.1.7 *Treponema sp***

São espiroquetas de forma espirolada, de Gram-negativas, não capsuladas, anaeróbias estritas e de grande mobilidade, devido a um filamento axial denominado endoflagelo. Apesar de se encontrar em grande número nas lesões periodontais, os seus fatores de virulência conhecidos ainda são escassos. Acredita-se que incluem fatores de adesão, motilidade, mecanismos de evasão de defesas do hospedeiro e fatores citotóxicos para acolhimento dos tecidos, no entanto a espécie *Treponema denticola* pertencente a este género, são conhecidos fatores de virulência como grande motilidade, fatores de adesão a *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* através de adesinas, detém peptidases e proteases, ação hemaglutinante, fosfatases e produz LPS, tendo fortes mecanismos de evasão de defesas e tecidos do hospedeiro (Francisco Rodriguez *et al.* 2004; Kazuyuki Ishihara 2010; Dentino *et al.* 2013).

#### 4.1.8 *Capnocytophaga ochracea*

É um bacilo fusiforme de Gram-negativo, sem flagelos, no entanto move-se por deslizamento, não capsulado, anaeróbico facultativos e capnófilo. Como fatores de virulência possuem uma endotoxina, produz um fator inibidor da quimiotaxia leucocitária e apresenta fatores inibidores da atividade linfoblástica (Francisco Rodriguez *et al.* 2004).

#### 4.1.9 *Actinomyces sp:*

São muitas as espécies de *Actinomyces* microaerófilos e anaeróbios facultativos, sendo bacilos de Gram-positivos, capnófilos, ramificados, fimbriados, não capsulados, imóveis, proteolíticos e heterofermentativos (produzem mais do que um ácido). Possuem vários fatores de virulência, entre os quais se incluem fimbrias e a produção de adesinas, dando-lhe a capacidade de se agregar e co-agregar a outras bactérias, formando um aglomerado de *Actinomyces* recobertas por cocos e cocobacilos, tornando difícil a fagocitose e a penetração de antimicrobianos, são exemplo das espécies de *Actinomyces*: *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces viscosus* (Francisco Rodriguez *et al.* 2004).

#### 4.1.10 *Tannerella forsythia*

É um bacilo anaeróbico estrito de Gram-negativo, que para o seu crescimento necessita de se co-agregar com *Porphyromonas gingivalis* para crescer no microbioma das bolsas periodontais. Apresenta como fatores de virulência a capacidade secretora de enzimas proteolíticas nomeadamente tripsina, sialidasas (neuraminidasas). Tem a capacidade de penetrar nas células dos tecidos periodontais e de induzir a apoptose (Ljiljana Kesic *et al.* 2008; Jane Manakil 2012).

## 4.2 Fatores de virulência bacterianos associados à Doença Periodontal

Para que se passe de uma situação de saúde periodontal para o início da doença periodontal terá que haver um desequilíbrio entre os agentes microbianos do microbioma infra-gengival e as defesas do hospedeiro. Para que tal aconteça, os agentes microbianos envolvidos precisam de, inicialmente, aglutinar-se aos tecidos periodontais, de seguida multiplicarem-se e competirem com outras bactérias no nicho ecológico infra-gengival e por fim, defenderem-se dos mecanismos de agressão por parte do hospedeiro (Fabio Eto *et al.* 2003; Francisco Rodríguez *et al.* 2007).

A presença destes microrganismos capazes de induzir inflamação gengival é necessária, mas também que estes possuam propriedades capazes de induzir tal inflamação, ou seja, vencer as defesas orgânicas do hospedeiro e multiplicarem-se (colonizar) o sulco gengival. Estas propriedades são chamadas de fatores de virulência, como a produção de metabolitos (amónio, compostos sulfurados voláteis, ácidos gordos), produção de enzimas proteolíticas (colagenases, queratinases, hialuronidase, proteases, nucleases, neuraminidases, hemolisinas, coagulases, sulfatases, glicuronidases) e exotoxinas (leucotoxinas que afetam os PMN ou as epiteliotoxinas que destroem o epitélio sulcular, e endotoxinas (que são componentes estruturais das espécies de Gram-negativas libertadas depois da lise bacteriana) ( Fabio Eto *et al.* 2003; Francisco Rodríguez *et al.* 2007; Jane Manakil 2012)

A destruição tecidual periodontal é causada tanto pelos fatores de virulência das bactérias, como alguns constituintes bacterianos que danificam diretamente os tecidos através da produção de toxinas ou indiretamente através da indução da resposta imunopatológica por parte do hospedeiro. Os lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular das bactérias de Gram-negativo, contribuem para danos tecidulares, outros componentes da parede celular, como a existência da cápsula servem como barreira protetora às bactérias, ativando o sistema do complemento e interferindo na fagocitose. De uma forma geral, os fatores de virulência das bactérias induzem à reação inflamatória e à resposta imunológica do hospedeiro (Howard K. Kuramitsu 2001; Fabio Eto *et al.* 2003; Francisco Rodríguez *et al.* 2007).

**4.2.1 Cápsula** é uma rede de polímeros que recobre a superfície bacteriana, servindo como uma barreira físico-química, a maioria é composta por LPS, e a sua principal função é a proteção da bactéria à resposta inflamatória do hospedeiro, como a proteção contra a dissecação e aumentar a resistência à fagocitose pelos neutrófilos e macrófagos. Além destas importantes funções, também possuem capacidade adesiva. Possuem estas características espécies de *Prevotella sp*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides sp* (Jane Manakil 2012; Maritza Sisto *et al.* 2012; María Cárdenas-Perea *et al.* 2014).

**4.2.2. Fímbrias** são apêndices compostos pela proteína pilina, que permite às bactérias aderirem-se fortemente às superfícies que melhores condições de nutrientes e de defesa orgânica lhes oferecem. São estruturas proteicas, longas e finas, podendo ser rígidas ou flexíveis, que se estendem a partir da membrana externa de bactérias de Gram-negativas, possuem estas estruturas: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Capnocytophaga*. Estes apêndices são capazes de aderir a uma variedade de componentes do hospedeiro como células epiteliais, fibroblastos, macromoléculas da saliva, hemoglobina, na matriz extracelular e servem de suporte às adesinas (Carlos Carvalho *et al.* 2007; Francisco Rodríguez *et al.* 2007).

**4.2.3. Adesinas** são geralmente lectinas (proteínas com afinidade com os açúcares) substâncias de natureza glucopeptídica que permitem às bactérias aderirem-se quimicamente à fibronectina (proteína orgânica que recobre os tecidos), contribuem também na agregação e co-agregação. A maioria das bactérias expressa mais de um tipo de adesinas que podemos encontrar em algumas estruturas como, as pili, as fímbrias e flagelo, expressando proteínas de membrana externa de bactérias de Gram-negativas, ácidos lipoteícos de Gram-positivas e proteínas F e M de *Streptococcus sp* (Francisco Rodríguez *et al.* 2007; Donalds Perfecto 2011; María Cárdenas-Perea *et al.* 2014).

**4.2.4 Presença de recetores de reconhecimento** são consideradas proteínas de carga negativa que as bactérias possuem na sua superfície, que também possuem função de aderência aos tecidos orgânicos de cargas positivas. Estes recetores possibilitam que estes

microrganismos evitem forças de deslize a que podem ser submetidas, sendo assim mais um mecanismo de adesão bacteriana por parte destas bactérias, estes recetores têm elevada importância na resposta imunológica por parte do hospedeiro, a apresentam esta característica a maioria das bactérias consideradas periodontopatogénica (Páez Glenda et al. 2006, Francisco Rodriguez *et al.* 2007, Uceró, C. *et al.* 2014).

**4.2.5 Produção de polissacarídeos extracelulares de alto peso molecular** por parte de algumas bactérias, tais como *Lactobacilos* e *Actinomyces* a partir da sacarose, permitem uma maior capacidade de adesão dentro do microbioma do sulco gengival, permitindo muitas bactérias resistir às forças de deslize, para além de ser uma reserva de a (Fabio Eto *et al.* 2003; Francisco Rodríguez *et al.* 2007).

**4.2.6 Colagenase** é uma enzima com grande potencial de destruição do tecido conjuntivo pela capacidade de destruição das fibras de colagénio dos tecidos periodontais, têm capacidade de produzir colagenases: *Capnocytophaga*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Treponema vincentii* e *Porphyromonas gingivalis* (Donalds Perfecto 2011, Jane Manakil 2012).

**4.2.7 Endotoxinas** são polissacarídeos que formam parte integral da parede celular das bactérias de Gram-negativas e ao libertarem-se com a morte destes microrganismos, produzem, efeitos tóxicos para os tecidos periodontais. As enzimas líticas (colagenases, hialuronidases, lecitinas, condroitinsulfatase, entre outras) levam à destruição dos tecidos vivos e permitem às bactérias invadirem os mesmos, razão pela qual são chamados fatores de invasão. Muitas bactérias do microbioma oral, produzem estas enzimas líticas, especialmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Capnocytophaga*, *Peptostreptococcus magnum* e espécies de *Bacteroides sp* (Francisco Rodríguez *et al.* 2007, Jane Manakil 2012).

**4.2.8 Proteases** têm como função a degradação proteica, de modo a fornecer nutrientes para o crescimento bacteriano, como aminoácidos e peptídeos, os quais poderão servir de substratos para adesão bacteriana. A atividade proteolítica é muito importante na destruição dos tecidos e por isso tem um papel relevante na doença periodontal, possuem estas características *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* e *Treponema denticola* (Carlos Carvalho *et al.* 2007; Jane Manakil 2012).

**4.2.9 Epiteliotoxinas** destroem os hemidesmossomas da união intercelular, sendo um mecanismo de invasão e exacerbação da inflamação, uma vez que levam à imunossupressão localizada, apresenta esta característica *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Donalds Perfecto 2011).

**4.2.10 Hemaglutininas** reconhecido como um fator de virulência que tem como papel principal mediar a ligação entre as estirpes bacterianas aos recetores celulares humanos, é reconhecida a atividade hemaglutinante às espécies *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* (Jane Manakil 2012).

## 5. Antibioticoterapia na Doença Periodontal

Hoje em dia temos à disposição uma variedade de fármacos pertencentes ao grupo dos antimicrobianos, de administração sistémica e aplicação local cujo seu objetivo é eliminar as bactérias consideradas periodontopatogénicas. A utilização pela via sistémica permite não só o tratamento simultâneo de múltiplas bolsas periodontais, mas também, chegar a outros nichos ecológicos da cavidade oral que podemos considerar um reservatório de agentes microbianos. No entanto, esta via de utilização tem como desvantagens a possibilidade de criar reações adversas ao hospedeiro assim como provocar resistências bacterianas. Por sua vez, os antimicrobianos de aplicação local permitem alcançar uma concentração do fármaco 10 a 100 vezes superior em comparação com a via sistémica, tendo como vantagem uma redução significativa do número de reações adversas e um menor risco de criar resistências microbianas (Falcão Costa *et al.* 2001; Peter Eickholz *et al.* 2005; Paola Palacio *et al.* 2008).

Dos fármacos disponíveis aqueles que mais são utilizados no tratamento das doenças periodontais são: Tetraciclinas (Minociclina e Doxiciclina), Amoxicilina, Amoxicilina associada ao Ácido Clavulânico, Clindamicina, Eritromicina, Ampilicina e os compostos do Nitroimidazol: Metronidazol e Ornidazol (Falcão Costa *et al.* 2001; Peter Eickholz *et al.* 2005; Paola Palacio *et al.* 2008).

A bolsa periodontal é um reservatório natural que permite a inserção de um dispositivo de libertação prolongada, sendo que os benefícios que podem ser adquiridos baseiam-se na libertação do agente terapêutico no local a ser tratado e a manutenção dos níveis adequados de fármaco (CMI) por um período estabelecido de tempo, apesar da constante renovação do FGC (Marcos Brushi *et al.* 2006; Mansur *et al.* 2014).

A RAR são as abordagens terapêuticas iniciais para o tratamento das doenças periodontais. No entanto, esta abordagem pode não ser suficiente em determinados casos para uma

**A utilização do Gel de Metronidazol numa concentração de  
25% de aplicação local no Tratamento Periodontal Não Cirúrgico**

evolução positiva no controlo da doença periodontal, devido à invasão de espécies bacterianas, consideradas periodontopatogénicas, nos tecidos periodontais. Portanto, nestes casos a terapia periodontal associada a antimicrobianos é utilizada com alguma frequência. Os antibióticos podem ser escolhidos com base nos agentes periodontopatogénicos específicos identificados pelos exames microbiológicos: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, e *Treponema denticola* são bactérias alvo comuns. A Tabela 3 mostra os antibióticos de acordo com as recomendações para cada tipo de agente bacteriano (Jane Manakil 2012).

**Tabela 3: Antibióticos recomendados segundo a patogenicidade bacteriana** (importada do documento: Manakil, J. (2012). *Periodontal Disease - A Clinician's Guide*. Croatia, InTech, p. 63.)

	Complexo vermelho: <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Treponema denticola</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Complexo laranja: <i>Prevotella intermedia</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>
Patogenicidade	Alta	Alta	Moderada
Amoxicilina	-	+	-
Clindamicina	+	-	+
Doxiciclina	+	+	+
Minociclina	+	+	+
Azitromicina	-	+	-
Ciprofloxacina	-	+	-
Metronidazol	+	-	+
Amoxicilina + Metronidazol	+	+	+

Ainda existe muita controvérsia com respeito à melhor alternativa de tratamento em pacientes que sofrem de DP. Na década de noventa propulsionou-se a utilização de antimicrobianos de libertação local controlada em locais que não respondiam favoravelmente à terapia periodontal convencional. Entre as opções de antimicrobianos de libertação controlada, encontravam-se colutórios, géis, sistemas de irrigação sub-gengival, aparelhos de

irrigação mecânica e mais recentemente, dispositivos de libertação de agentes antimicrobianos incorporados em veículos que permitem uma libertação prolongada infra-gengival, mantendo níveis de concentração terapêuticos apropriados para a eliminação das bactérias periodontopatogénicas (Marcos Brushi *et al.* 2006; Paola Palácio *et al.* 2008).

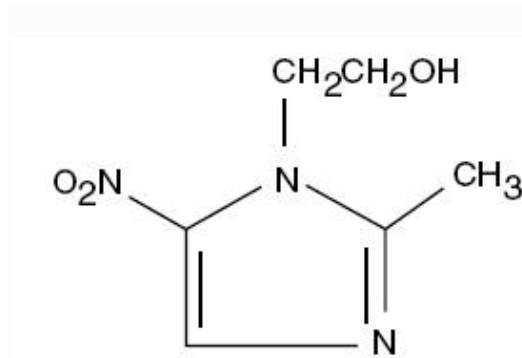
Os veículos que permitem uma libertação prolongada dos agentes antimicrobianos são: polímeros poli-2hidroxi, etil-metacrilato, lovinil-alcool, polidimetilsiloxanos, etileno-vinilacetato, colagénio, derivados de celulose e biocerâmicas-hidroxiapatite, fosfato tricálcico e fosfato cálcico de alumínio. (Paola Palacio *et al.*, 2008).

No entanto novos métodos estão a ser desenvolvidos com o intuito de prolongar a concentração dos fármacos no interior das bolsas periodontais (exemplo: nanotransportadores ou nanomateriais, tais como lipossomas, lípidos e nanopartículas poliméricas, nanocristais, dendrímeros e nanofibras (Zupancic *et al.* 2015; Yadav. *et al.* 2015).

## **5.1 O Metronidazol**

O metronidazol foi desenvolvido em França, na década de 50. É um composto sintético derivado do Nitroimidazol, Figura 5, e tinha inicialmente a função de tratar infeções por protozoários (triconomíase) tendo-se mais tarde verificado a sua atividade antibacteriana. É um antibiótico de pequeno espectro de ação e atua especificamente contra microrganismos anaeróbios associados às doenças periodontais, possibilitando que o microbioma oral não patogénico permaneça relativamente intacta. Estudos microbiológicos têm demonstrado que o metronidazol apresenta efeitos marginais em relação ao decréscimo de unidades formadoras de colónias de bactérias anaeróbias no microbioma infra-gengival. Este facto pode ser atribuído ao pequeno número de bactérias suscetíveis ao metronidazol e/ou à presença de biofilmes bacterianos. Devido à suscetibilidade das espiroquetas é eficaz em casos de periodontite ulcerativa necrosante. É eficaz na eliminação da *Porphyromonas gingivalis* e da *Prevotella intermedia*. No entanto, parece relativamente ineficaz contra o

*Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (Andrej Aurer *et al.* 2004; Anusha Rajagopalan *et al.* 2014).



**Figura 5: Estrutura química do metronidazol**

(Importada do documento <http://medlibrary.org/lib/rx/meds/vitazol/>)

## 5.2 Modo de ação do Metronidazol

O Metronidazol provoca a morte celular bacteriana interferindo na síntese do ácido nucleico, atuando na degradação e inibição da síntese do DNA bacteriano provocando o seu enrolamento e por consequência a sua morte. É muito eficaz contra os anaeróbios estritos como *Porphyromonas gingivalis* e espiroquetas sendo por isso utilizado para o tratamento da PA e Periodontite Ulcerativa Necrosante. A combinação de Metronidazol e Amoxicilina tem se mostrado capaz de inibir o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, pois o Metronidazol tem-se revelado ineficaz contra esta bactéria quando utilizado unicamente (Andrej Aurer *et al.* 2004).

## 5.3 Elyzol

O Metronidazol de libertação local em gel (gel de benzoato de metronidazol na formulação de 40%, equivalente a uma concentração de 25% (denominado comercialmente de Elyzol, é um gel de base oleosa (mono-oleato de glicerol e óleo de gergelim), facilmente

aplicado no interior da bolsa periodontal através de uma seringa, Figura 6, adere ao ES e, ao entrar em contacto com o FGC ou saliva, transforma-se num estado cristalino líquido de consistência semissólida. Este sistema foi muito estudado e testado pela comunidade científica e encontra-se disponível no mercado de vários países sob o nome comercial atrás descrito, distribuído pela empresa Dumex (Copenhaga, Dinamarca). A terapia recomendada é de duas aplicações em cada bolsa periodontal, com um intervalo de uma semana. Podemos observar na Figura 6 a forma de aplicação dentro das bolsas periodontais (Marcus Brushi *et al.* 2006; Paola Palacio *et al.* 2008).



**Figura 6: Aplicação de gel de Metronidazol a 25% (Elyzol)**

(Importada do documento <http://www.cram.com/flashcards/perio-osce-5626592>)

### **5.3.1 Estudos e ensaios clínicos da aplicação do gel de metronidazol numa concentração de 25% em bolsas periodontais**

Segundo Silvia Q. *et al.* (2004) comparando estudos microbiológicos realizados desde 1983 a 2000, demonstrou que o metronidazol de aplicação local apresentou efeitos marginais em relação ao decréscimo de unidades formadoras de colónias de bactérias anaeróbias no microbioma infra-gengival. O gel de metronidazol numa concentração de 25% mostrou ser tão efetivo quanto os procedimentos de RAR, em pacientes em terapia de manutenção periodontal, no que toca à redução dos agentes periodontopatogénicos e na melhoria dos parâmetros clínicos (índice de hemorragia e diminuição da profundidade de

sondagem). A mesma autora refere também que segundo Needleman *et al.* (2000) nenhum benefício adicional foi obtido quando o gel de metronidazol a 25% foi utilizado durante a cirurgia de retalho de Widman modificado. De acordo com a American Academy of Periodontology (2000), não está claro se o gel de metronidazol promove melhoras clínicas significativas quando utilizado com a terapia tradicional de RAR.

Kaj Stolte (1992) realizou um estudo com o intuito de monitorizar a concentração do metronidazol no FGC das bolsas periodontais inflamadas após uma aplicação de gel de metronidazol a 25%. Estudou 12 pacientes com doença periodontal aos quais administrou o gel de Metronidazol nas bolsas periodontais de 10 dentes com profundidades de sondagem  $\geq 5$  mm. As amostras do FGC foram obtidas com Periopaper® antes da aplicação e 4, 8, 12, 24 e 36 h após a aplicação. Por meio de um Periotron® calibrado, o volume do FGC foi recolhido e medido. Através da cromatografia líquida de alta resolução determinaram a quantidade de metronidazol. Neste estudo, a concentração obtida foi maior do que 1 ug / ml em todas as amostras após 4 e 8 horas, em 92% após 12 h, de 50% após 24 h e 8% após 36 h. Assim, as concentrações de metronidazol nas bolsas periodontais encontravam-se geralmente acima da CIM para agentes periodontopatogénicos sensíveis ao metronidazol, 24 h após a aplicação do Elyzol.

Segundo Marcus Brushi *et al.* (2006) refere um estudo realizado em 1997, onde realizaram um estudo comparativo entre a utilização sistémica do metronidazol (Flagyl) e o (Elyzol). Pacientes com doença periodontal foram tratados através da terapia periodontal convencional concomitantemente com o fármaco metronidazol nas suas 2 vias de utilização, por 10 dias e monitorizados por 42 dias. Ambas as modalidades de tratamento apresentaram melhorias tanto clínicas como na redução do número de bactérias anaeróbias. No entanto, o grupo tratado através da RAR aliado ao Elyzol mostrou-se mais prático, com menos efeitos colaterais para os pacientes, portanto mais efetivo. Sendo assim os autores afirmaram que para o tratamento de bolsas periodontais mais profundas através da RAR associado ao uso do Elyzol era a alternativa mais eficaz.

Noutro estudo realizado por A. Rudhart *et al.* (1998) que teve como objetivo avaliar o efeito clínico e microbiológico da antibioticoterapia local em comparação com a terapia tradicional, num estudo randomizado semi-mascarado. Foram escolhidos 46 pacientes em manutenção periodontal que completaram a terapia periodontal sistemática 6 a 24 meses. Os requisitos de inclusão foram pelo menos apresentarem um local com profundidade de sondagem  $\geq 5$  mm em cada quadrante e sem combinarem terapia antibiótica durante os últimos 6 meses. Após a aleatorização, cada paciente recebeu tratamentos diferentes. Em 2 quadrantes foi aplicado o Elyzol nas bolsas periodontais ao dia 0 e dia 7; a RAR foi realizada nos outros 2 quadrantes (um ao dia 0 e no outro ao dia 7). As amostras microbiológicas infra-gengivais foram recolhidas de cada paciente antes do tratamento e nos dias 21, 91 e 175 após o tratamento. Em todos os locais tratados, a profundidade de sondagem, o nível clínico de inserção e o índice de hemorragia à sondagem foram registados nos dias 0, 21, 91 e 175. Ambos os tratamentos resultaram em redução da profundidade de sondagem e ganhos de inserção clínica onde a profundidade de sondagem obteve uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) para ambas as modalidades de tratamento após 6 meses. O ganho de inserção clínica não foi significativo para um ou outro tratamento. *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* foram reduzidos significativamente após a terapia; no entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Se *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* estava presente antes da terapia, também estava presente depois do tratamento em ambos os grupos. A conclusão é que, nos pacientes em manutenção periodontal, a aplicação local de metronidazol a 25% associado à RAR mostrou efeitos clínicos e microbiológicos semelhantes, sem diferenças estatisticamente significativas.

Marcus Brushi *et al.* (2006) relataram um outro estudo comparativo no que confere ao comportamento clínico e recolonização microbiológica em pacientes tratados através da RAR isoladamente e outros pacientes tratados com associação do Elyzol. Os resultados demonstraram uma redução significativa de microrganismos periodontopatogénicos, principalmente no grupo onde foi associado à terapia o Elyzol, melhorias clínicas no que toca ao índice de hemorragia e à profundidade de sondagem durante 24 meses. O grupo tratado com o dispositivo Elyzol foi o que demonstrou melhorias mais rápidas. No entanto os autores do estudo afirmaram, que quando bem realizadas, as duas modalidades podem

oferecer bons resultados, pois a longo prazo, não houve diferenças significativas entre os grupos tratados.

Segundo um estudo clínico comparativo e randomizado, realizado por Al-Mubarak *et al.* (2000), com o intuito de comparar o efeito do Elyzol e a terapia adjuvante no tratamento da PC, avaliou clinicamente os resultados obtidos. Um único examinador, cego para o estudo, realizou avaliações clínicas. 14 pacientes foram envolvidos, cada um recebeu quatro tratamentos diferentes (incluindo o tratamento controlo). Os quatro tratamentos foram aplicados aleatoriamente para pelo menos um dente em cada quadrante de cada paciente. Os exames clínicos foram realizados antes do tratamento e 90 dias após o tratamento. Todos os pacientes apresentavam pelo menos um dente em cada quadrante com profundidade de sondagem  $\geq 5$  mm. Os quatro grupos de tratamento foram: (I) uma sessão de uma hora de RAR, (II) monoterapia com metronidazol 25% (Elyzol) aplicado no dia 0 e no dia 7, (III) uma sessão de uma hora de RAR concomitantemente com aplicação ao (Elyzol) e (IV) sem qualquer tratamento (grupo controlo). Todos os pacientes foram motivados e instruídos para cuidados de higiene oral diários meticolosos.

No final do estudo (dia 90), todos os grupos obtiveram uma melhoria estatisticamente significativa no que toca à profundidade de sondagem ( $p < 0,02$ ), aos índices de depósitos microbianos e de hemorragia gengival ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o dia 0. No entanto, o grupo III obteve uma melhoria estatisticamente significativa ( $< 0,03$ ) no que toca à profundidade de sondagem em relação aos grupos I, II e IV. Ambos os grupos I e II obtiveram uma melhoria estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no que concerne à profundidade de sondagem que o grupo controle. Por outro lado, ambos os grupos não apresentavam diferenças estatisticamente significativas na melhoria da profundidade de sondagem. Sugere-se então, que o tratamento tópico com Elyzol pode melhorar a saúde periodontal, bem como a terapia de RAR sub-gengival, no entanto, no tratamento adjuvante foi possível obter um efeito terapêutico adicional.

Num estudo realizado por Stelzel M. e Flores-de-Jacoby L. no ano (2000) com fim a investigar o efeito de 2 aplicações de um gel de metronidazol a 25% associado a terapia

periodontal não cirúrgica. 59 pacientes com periodontite crónica foram observados por um período de 9 meses, num estudo duplamente-cego randomizado. Cada paciente tinha que ter pelo menos 2 locais com uma profundidade de sondagem de  $>$  ou  $=$  5 mm em cada quadrante. Os parâmetros clínicos: profundidade de sondagem, nível de inserção, e hemorragia à sondagem foram registradas em todos os dentes nos dias 0, 91, 175 e 259. Além disso, foram retiradas amostras da composição do microbioma das bolsas periodontais de 45 pacientes, e foram analisadas por meio de microscopia de campo escuro. O tratamento periodontal não cirúrgico foi realizado em todos os quadrantes, enquanto a associação do gel de metronidazol a 25%, foi aplicado em apenas 2 quadrantes. O tratamento foi confinado tendo como linha de base a profundidade de sondagem  $>$  ou  $=$  5 mm. Os 2 métodos de comparação tiveram como base principal avaliar a eficácia do gel de metronidazol a 25% na profundidade de sondagem.

No dia 259, com a avaliação dos parâmetros clínicos, estes revelaram uma melhoria estatisticamente significativa nos parâmetros clínicos para ambos os métodos de tratamento durante o período de estudo. Entre o início e o dia 259, as diferenças registadas entre locais onde foi aplicado o gel de metronidazol a 25 % e os que foram alvo apenas da terapia periodontal não cirúrgica, a profundidade de sondagem na terapia combinada diminuiu entre 6,00 a 4,63 milímetros, enquanto na terapia não combinada a diminuição foi de 6,02 a 4,83 mm. No âmbito microbiológico ambos os métodos revelaram uma mudança na composição do microbioma sub-gengival para um microbioma compatível com saúde periodontal.

Os autores concluíram com os resultados que a terapia combinada teve maior relevância em pacientes previamente não tratados, concluindo assim que a terapia combinada nestes pacientes pede uma investigação mais aprofundada.

No ano de (2001) Yang H *et al.* realizaram um estudo para avaliar os efeitos clínicos da aplicação do metronidazol de aplicação local como adjuvante à terapia convencional no tratamento da periodontite. O estudo indicou que a aplicação local do metronidazol numa

concentração 25% como um complemento à terapia convencional pode conduzir a um resultado mais vantajoso para o tratamento da periodontite.

No ano de 2004 Jansson H *et al.* realizaram um estudo com intuito de avaliar as alterações na composição do microbioma infra-gengival em pacientes com doença periodontal recorrente após o tratamento com gel de metronidazol a 25%. Vinte indivíduos em terapia periodontal de manutenção, mas com doença periodontal recorrente, foram monitorizados durante 3 meses após RAR num total de 40 locais. Duas bolsas periodontais em cada paciente, com profundidade de sondagem de  $>$  ou  $=$  5 mm foram selecionados. Numa bolsa selecionada aleatoriamente foi aplicado gel de metronidazol a 25% (grupo de estudo) e na outra bolsa o gel placebo (grupo controlo).

Uma amostra microbiológica foi recolhida em paperpoint de cada local de estudo e de controlo no início do estudo e 12 semanas após o tratamento. Os seguintes agentes periodontopatogénicos foram analisados: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens*. A principal diferença após o tratamento com gel de metronidazol a 25% foi a diminuição das percentagens de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens*. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas com os resultados recolhidos nos locais de controlo. Este estudo demonstrou que o tratamento periodontal não cirúrgico associado com gel de metronidazol a 25% não parece influenciar a composição do microbioma infra-gengival em pacientes com doença periodontal recorrente.

No ano de (2007) Leiknes T. *et al.*, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar se aplicação do Elyzol após a RAR obtinha parâmetros clínicos mais vantajosos em comparação com terapia de RAR isoladamente, a longo prazo, em bolsas periodontais com sintomas de inflamação crónica recorrente. Ambos os tratamentos obtiveram um resultado a 6 meses estatisticamente significativo ( $p=0,001$ ) na redução na profundidade de sondagem (1,9 e 1,8 mm), no ganho de nível de inserção clínica (1,6 e 1. 0 mm), e na redução da hemorragia pós-sondagem (38,1% e 33,3%) para os locais de estudo e os locais de controlo, respetivamente. No entanto não houve diferenças estatisticamente significante

entre ambos os tratamentos para qualquer um dos parâmetros clínicos. Logo, os autores concluíram que o Elyzol não provoca melhorias em locais de inflamação periodontal crónica recorrente.

No ano de (2012) Kadkhoda, Z. *et al.* realizaram um estudo com o intuito de avaliar o efeito da terapia periodontal não cirúrgica, associado à aplicação do Elyzol, no número de colónias de *Porphyromonas gingivalis* em pacientes com PA. O estudo durou 12 semanas, e para além da contagem de colónias de *Porphyromonas gingivalis* foram avaliados outros parâmetros clínicos, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e hemorragia à sondagem. No final das 12 semanas, o grupo de estudo obteve melhorias estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem e na redução do número de colónias de *Porphyromonas gingivalis*. Concluindo que o uso do Elyzol concomitante com a terapia não cirúrgica da PA eleva a redução do número de colónias de *Porphyromonas gingivalis*.

Num estudo realizado por Paula Pérez *et al.* (2013) conclui que o uso do metronidazol de aplicação local numa concentração de 25% (Elyzol) é o sistema de libertação prolongada que menos eficácia obteve em comparação com outros sistemas com princípios ativos diferentes, e em comparação com o grupo controlo os resultados clínicos no que toca à profundidade de sondagem apenas melhoraram entre 0.1 e 0,4 mm.

### III. CONCLUSÃO

Podemos concluir que o uso do metronidazol de aplicação local numa concentração de 25% (Elyzol) é ainda muito controverso na comunidade científica. Para alguns autores continua a ser um tema que necessita de um maior aprofundamento científico, uma vez que ainda existe alguma controvérsia sobre os resultados terapêuticos obtidos. Serão necessários mais estudos para avaliar em que situações se torna mais vantajoso o uso do metronidazol de aplicação local a 25% para que este seja benéfico no tratamento das doenças periodontais em comparação com a via sistémica, assim como, a inclusão de novos materiais que permitam uma maior retenção do fármaco dentro da bolsa periodontal.

O metronidazol não é eficaz em todas as estirpes bacterianas com maior patogenicidade na doença periodontal. Verifica-se uma diminuição significativa no que toca à *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e espiroquetas, mas o metronidazol não têm qualquer eficácia sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (espécie bacteriana com elevada patogenicidade para os tecidos periodontais). Deste modo os resultados clínicos podem não ser os desejados pelos operadores, quando esta espécie se encontra em grandes quantidades nas bolsas periodontais.

Quando usado concomitantemente com a terapia convencional em bolsas de maior profundidade, o gel de metronidazol numa concentração a 25% provoca um efeito terapêutico adicional, no que toca aos resultados microbiológicos, parâmetros clínicos: índice de hemorragia e profundidade de sondagem, no entanto a longo prazo os resultados são semelhantes quando comparados com os pacientes que foram alvo do tratamento periodontal não cirúrgico isoladamente (RAR).

O metronidazol de aplicação local a 25% revelou que em pacientes em terapia de manutenção periodontal não traz benefícios no que toca aos parâmetros clínicos e microbiológicos, no entanto em pacientes que sofram de periodontite ulcerativa necrosante o uso do metronidazol de aplicação local a 25%, é benéfico, uma vez que altera substancialmente

o microbioma do sulco gengival, diminuindo o nº de colónias das estirpes causadoras desta forma de DP, em particular espécies do género *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Treponema*). Nestes casos, revela-se em melhorias clínicas e microbiológicas significativas, especialmente uma redução significativa de espiroquetas.

Em pacientes com vários locais de doença periodontal ativa beneficiam de resultados terapêuticos satisfatórios, com a aplicação do gel de metronidazol numa concentração de 25%, em comparação com os que são submetidos ao tratamento com metronidazol por via sistémica devido a não apresentarem efeitos colaterais adversos provocados pela via sistémica.

A terapia com o metronidazol de aplicação local tem como desvantagem o encarecer do custo total do tratamento pelo facto, de o dispositivo Elyzol ter um custo mais elevado em comparação com o metronidazol de uso sistémico, sendo este ponto muito importante nas escolhas que o médico poderá realizar ao paciente.

#### IV. BIBLIOGRAFIA

Aberg, C. *et al.* (2014). Leukotoxic Activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and Periodontal Attachment Loss. *Public Library of Science*, Vol. 9, n.º 8, pp. 1-11.

Adriaens, P. *et al.* (1988). Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology*. Vol. 59, n.º. 4, pp. 222-230.

American Academy of Periodontology (2011). Comprehensive Periodontal Therapy: A Statement by the American Academy of Periodontology. *Journal of Periodontology*, Vol. 82, n.º 7, pp. 943-949.

Andrade, I. *et al.* (2011). Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microrganismos da cavidade oral. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*, Vol. 13, n.º 3, pp. 10-16.

Avila, M. *et al.* (2009). The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA and Cell Biology*, Vol. 28, n.º 8, pp. 405-411.

Barak, O. *et al.* (2013), Antibiotic susceptibility of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 in a biofilm. *Journal of Oral Microbiology*, Vol. 8, n.º, pp-34-42.

Bartold, P. *et al.* (2010). Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000*, Vol. 53, n.º 1, pp. 55-69.

Batabyal, B. *et al.* (2012). Role of the oral micro flora in human population: A brief review. *International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, Vol. 3, n.º 12, pp. 2220-2227.

Berezow, A. B., Darveau, R. P. (2011). Microbial Shift and Periodontitis. *Periodontology 2000*, Vol. 55, n.º 1, pp. 36-47.

Bernardo, G. *et al.* (2014). La Placa Dental y su Relación con la Periodontitis. *Revista Europea de Odontoestomatologia* [Em linha]. Disponível em <<http://www.redoe.com/ver.php?id=155>>. [Consultado em 10/06/2015].

Bruschi, M. *et al.* (2006). Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 42, n.º 1, pp. 29-47.

Campos, V., Carlos F. (2005). A importância dos fatores de virulência do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no desenvolvimento da doença periodontal agressiva. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, Vol. 4, n.º 1, pp. 54-62.

Carvalho, C., Cabral, C. (2007). Papel da *Porphyromonas Gingivalis* na Doença Periodontal. *Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia Maxilofacial*, Vol. 48, n.º 3, pp.167-171.

Chatzopoulos, S. *et al* (2016). Association of susceptible genotypes to periodontal disease with the clinical outcome and tooth survival after non-surgical periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis. *Oral Medicine and Pathology*, Vol. 21, n.º 1, pp. 14-29.

Cortelli, J., Cortelli. S., (2003). Periodontite Crônica E Agressiva:Prevalência Subgingival e Frequência Deocorrência de Patógenos Periodontais. *Revista Biociências*, Vol. 9, n.º.2, pp. 91-96.

Cosyn, J. *et al.* (2005) A chlorhexidine varnish implemented treatment strategy for chronic periodontitis: short-term clinical observations. *Journal of Clinical Periodontology*, Vol. 32, n.º 7, pp. 750-756.

Dentino, A. *et al.* (2013). Principles of periodontology. *Periodontology 2000*, Vol. 61, n.º 1, pp. 16-53.

Dewhirst, F. *et al.* (2010). The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology*, Vol. 192, n.º 19, pp. 5002–5017.

Dias, L. *et al.* (2006). Atual classificação das doenças periodontais. *UFES Revista de Odontologia*. Vol. 8, n.º 2, pp. 59-65.

Díaz, J. *et al.* (2012). Virulence and variability on Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans and their association to periodontitis. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, Vol. 5, n.º 1, pp. 40-45

Do, T. *et al.* (2013). Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clinical Cosmetic and Investigational Dentistry*, n.º 5, pp. 11-19.

Eto, F. *et al.* (2003). Características microbianas na saúde periodontal. *Revista Brasileira de Biociências*, Vol. 9, n.º2, pp. 45-51.

Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, Vol.54, Supplement 1, pp-s11-s26.

Ishihara, K. (2010). Virulence factors of Treponema denticola. *Journal of Periodontology*, Vol. 54, n.º1, pp. 117–135.

Jansson, H. *et al.* (2004). The microbial outcome observed with polymerase chain reaction in subjects with recurrent periodontal disease following local treatment with 25% metronidazole gel. *Swedish Dental Journal*, Vol. 28, n.º 2. pp. 67-76.

Kadkhoda, Z. *et al.* (2012). Comparison of 1-Periodontal Indices and Cultural Porphyromonas Gingivalis Colony Count in Aggressive Periodontitis Patients Treated by Scaling and Rootplanning with or Without Metronidazole Gel. *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences*, Vol. 9, n.º 1, pp. 50-58.

Kesic, L. *et al.* (2008). Microbial Etiology of Periodontal Disease – Mini Review. *Medicine and Biology*, Vol. 15, n.º 1, pp. 1-6.

Kolenbrander, P. (2000). Oral Microbial Communities: biofilms, interactions and genetic systems. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 54, n.º 1, pp. 413-437.

Kolenbrander, P. *et al.* (2010). Oral multispecies biofilm development and the Key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 8, n. ° 7, pp. 471-480.

Kuramitsu, H. (2001). Virulence Properties of Oral Bacteria: Impact of Molecular Biology. *Current Issues in Molecular Biology*, Vol. 3, n. ° 2, pp. 35-36.

Leiknes, T. *et al* (2007). Topical use of a metronidazole gel in the treatment of sites with symptoms of recurring chronic inflammation. *Journal of Periodontology*, Vol. 78, n.° 8, pp. 1538-1544.

Leite, A. *et al.* (2008). Transmissão de Bactérias Periodontais. *Revista Periodontia*, Vol. 18, n.° 3, pp. 28-33.

Liu, B. *et al.* (2012). Deep Sequencing of the Oral Microbiome Reveals Signatures of Periodontal Disease. *Public Library of Science*, Vol. 7, n.° 6, pp. 1-33.

Lotufo, R *et al.* (2001) Bacteroides forsythus: sensibilidade antimicrobianos em amostras de pacientes portadores de periodontite. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, Vol. 15, n.° 1, pp 47-50

Manakil, J. (2012). *Periodontal Disease - A Clinician's Guide*. Croatia, InTech, pp. 14-63.

Mariotti, A., Hefti, A. (2015). Defining periodontal health. *Bio Med Central Oral Health*, Vol. 15, Supplement 1, pp. 1-39.

Medina, A. (2010). Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, Vol. 22, n.° 1, pp. 27-35.

Medina, M. *et al.* (2010). Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol. 30, n.° 3, pp. 83-90.

Meira, A. *et al.* (2007). Uso de Antimicrobianos Locais em Periodontia: Uma Abordagem Crítica. *Revista Periodontia*, Vol. 17 , n.º 1, pp. 83-89.

Melchora, F. *et al.* (2007). Película Adquirida Salival: Revision De La Literatura. *Acta Odontológica Venezolana* , Vol. 45 , n.º 3, pp. 479-486.

Naiff, P. *et al.* (2012). Imunologia da Periodontite Crónica: Uma Revisão da Literatura. *Scientia Amazonia*, Vol. 1, n.º 2, pp. 28-36.

Novak, J. (2002). Classification of diseases and conditions affecting the periodontum. *In*: Carranza, F. A., Newman, M. G. e Takei, H. H. *Carranza's Clinical Periodontology*. Ninth edition, Danvers, Walters Burns Saunders Company, pp. 64-73.

Nunes, M. *et al.* (2007). Contribuição do estudo do biofilme dentário para o tratamento das doenças Periodontais. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*, Vol. 25, n.º 1, pp. 55-61.

Páez, G., Farias, F. (2006). El Surco Gingival. Aspectos Clínicos y Anatomofisiomicrobiológicos. *Odus Científica*, Vol. 7, n.º 2, pp. 16-26.

Perea, M. *et al.* (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, Vol. 21, n.º 94, pp. 35-43.

Pérez, P. *et al.* (2013). A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, Vol. 40, n.º 3, pp. 227-241.

Perfecto, D. (2011). *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* Important Pathogen in Aggressive Periodontitis. *Revista Kiru*, Vol. 8, n.º 2, pp. 115-121.

Pozhitkov, A. *et al.* (2015). Towards microbiome transplant as a therapy for periodontitis: an exploratory study of periodontitis microbial signature contrasted by oral health, caries and edentulism. *Bio Med Central Oral Health*, Vol. 15, n.º 1, pp. 1-11.

Querido, S., Cortelli, J. (2003). Local Antimicrobials as an adjunct to Mechanical Therapy. *Revista Brasileira de Biociências*, Vol 9, n° 2, pp. 27-34.

Rahnama, M. *et al.* (2014). Gingival crevicular fluid – composition and clinical importance in gingivitis and periodontitis. *Polish Journal of Public Health*, Vol. 124, n.º 2, pp. 96-98

Rodríguez, F. *et al.* (2004). Enfermedad Periodontal y Microorganismos Periodontopatógenos. *Odus Científica*, Vol. 4, n°1, pp.1-22.

Silveira, V. *et al.* (2013). Leukotoxicity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in generalized aggressive periodontitis in Brazilians and their family members. *Journal of Applied Oral Science*, Vol. 21, n.º 5, pp. 430-436.

Sisto, M *et al.* (2012). Periodontal pathogens and their relationships with systemic diseases. *MEDISAN*, Vol 16, n° 7, pp. 1047-1058.

Slots, J. (2013). Periodontology: past, present, perspectives. *Periodontology 2000*. Vol. 62, n.º 1, pp. 7-19.

Socransky, S., Haffajee, D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, Vol. 28, n.º 1, pp. 12-55.

Stelzel, M., Florès-de-Jacoby, L. (2000). Topical metronidazole application as an adjunct to scaling and root planing. *Journal of Periodontology*, Vol. 27, n.º 6, pp. 447-452.

Sweeting, A. *et al.* (2008). Periodontal Treatment Protocol (PTP) for the General Dental Practice. *International journal of dental hygiene*, Vol. 82, Supplement 3, pp. 16-26.

Szpilman, A. *et al.* (2012). Condição periodontal de hipertensos e diabéticos: impacto da atuação da equipe de saúde da família. *Revista Juiz de Fora*, Vol. 38, n.º 1, pp. 45-51.

Tariq, M. *et al.* (2012). Treatment modalities and evaluation models for periodontitis. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, Vol. 2, n.º 3, pp. 106-122.

Ucero, T. *et al.* (2014). Fibroblasto: Célula Fundamental En La Salud Y En La Enfermedad Periodontal. *Acta Odontologica Venezolana*, Vol. 52, n.º 3, [Em linha]. Disponível em <<http://www.actaodontologica.com/ediciones/2014/3/art11.asp>>. [Consultado em 19/08/2015].

Uitto, V. *et al.* (2005). Fusobacterium nucleatum Increases Collagenase 3 Production and Migration of Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, Vol. 73, n.º 2, pp. 1171-1179.

Varela-Centelles, P. *et al.* (2015). Periodontitis Awareness Amongst General Public: A Critical Systematic Review to Identify Gaps of Knowledge. *Journal of Periodontology*, Vol. 6, n.º 1, pp. 1-19.

Yadav, K. *et al.* (2015). Advances in patents related to intrapocket technology for the management of periodontitis. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, Vol. 9, n.º 2, pp.129-145.

Zupancic, S. *et al.* (2015). Contribution of Nanotechnology to Improved Treatment of Periodontal Disease. *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 21, n.º 22, pp. 3257-3271.