



DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA

NEILA SUMIE TAMASHIRO

**ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO CEGO E CONTROLADO POR
PLACEBO TESTANDO O EFEITO ADJUNTO DO METRONIDAZOL E AMOXICILINA
NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA E DIABETES
TIPO 2: RESULTADOS DE 2 ANOS EM PARÂMETROS CLÍNICOS E
MICROBIOLÓGICOS**

Guarulhos
2015

NEILA SUMIE TAMASHIRO

**ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO CEGO E CONTROLADO POR
PLACEBO TESTANDO O EFEITO ADJUNTO DO METRONIDAZOL E AMOXICILINA
NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA E DIABETES
TIPO 2: RESULTADOS DE 2 ANOS EM PARÂMETROS CLÍNICOS E
MICROBIOLÓGICOS**

Tese apresentada à Universidade Guarulhos para obtenção do
título de Doutor em Odontologia
Área de Concentração: Periodontia
Orientadora: Profa. Dra. Magda Feres
Co-orientadora: Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte

Guarulhos
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

T153e

Tamashiro, Neila Sumie

Estudo clínico randomizado duplo cego e controlado por placebo testando o efeito adjunto do metronidazol e amoxicilina no tratamento de pacientes com periodontite crônica e diabetes tipo 2: resultados de 2 anos em parâmetros clínicos e microbiológicos / Neila Sumie Tamashiro. -- 2015.

88 f.; 31 cm.

Orientadora: Prof^a. Dra. Magda Feres

Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2015.

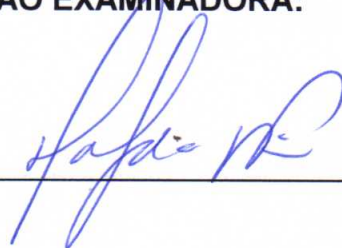
1. Doença Periodontal 2. Metronidazol 3. Amoxicilina 4. Periodontite crônica 5. Diabetes tipo 2 6. Microbiologia I. Título II. Duarte, Poliana Mendes, (Orientadora). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO CEGO E CONTROLADO POR PLACEBO TESTANDO O EFEITO ADJUNTO DO METRONIDAZOL E AMOXICILINA NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA E DIABETES TIPO 2: RESULTADOS DE 2 ANOS EM PARÂMETROS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS" em sessão pública realizada em 20 de maio de 2015 considerou a candidata Neila Sumie Tamashiro aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Magda Feres (UnG)



2. Profa. Dra. Elaine Cristina Escobar (FMU)



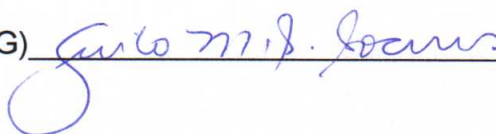
3. Prof. Dr. Renato Correa Viana Casarin (UNIP)



4. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (UnG)



5. Profa. Dra. Geisla Mary Silva Soares (UnG)



Guarulhos, 20 de maio de 2015.

*Dedico este trabalho aos meus filhos amados Luiz Fernando Tamashiro
Mocellin e Victor Kenzo Tamashiro Mocellin, que me dão razão
para sempre continuar.*

*Dedico à minha mãe, Tomi Tamashiro, que compartilha comigo todos os
momentos de alegria e dificuldades, sempre com muito amor.*

*Dedico ao meu irmão Sergio Tamashiro, que sempre estendeu a mão nos
momentos necessários.*

Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por guiar e iluminar meus passos, abençoando e cuidando da minha vida.

Ao meu pai Koshim Tamashiro (*in memorian*), que tanto me ensinou a nunca desistir dos meus sonhos, ser perseverante mas sempre com muito caráter e ética.

À minha mãe Tomi Tamashiro, que sempre esteve ao meu lado dando condições para poder me dedicar aos estudos.

Ao Luiz Mocellin (*in memorian*) pelos filhos maravilhosos que me deu.

Ao meu irmão Sergio e minha cunhada Deise que sempre me deram o apoio para prosseguir.

À minha orientadora, professora Magda Feres, por quem tenho um carinho imenso. Obrigada pelos ensinamentos, amizade, dedicação e humildade. Você é um exemplo de mulher, competente e talentosa que admiro muito!

À minha co-orientadora Poliana Mendes Duarte, pela confiança e oportunidade que me deu em participar deste seu trabalho. Extremamente capacitada e comprometida naquilo que faz! Adorei te conhecer!

À Tamires Szeremeske Miranda, pela amizade, carinho, ensinamentos, e pela sua grande contribuição neste estudo. Sem você não estaria aqui!

À Izilvânia, um agradecimento especial pela sua dedicação, paciência e competência. Obrigada pelos bons momentos que passei com você!

Ao Dr. Ulisses Fernando Lodi Salgado, que sempre me guiou e me estendeu a mão dentro da Periodontia.

À minha parceira de consultório, Ana Paula Rosendo da Silva.

À minha amiga Marisa Santos da Rocha, pela dedicação e contribuição neste estudo.

Aos meus pacientes de consultório que tiveram paciência e compreensão durante a minha ausência.

Aos meus colegas de equipe da APCD de SBC, Roberto Resende Campos Salles e Renata Cardoso de Souza, que “tocaram o curso com muita maestria”!

Ao professor Marcelo Faveri, pela sua enorme competência e colaboração nos trabalhos estatísticos.

À professora Luciene Figueiredo, pela seus ensinamentos durante o curso, e sua enorme contribuição neste trabalho.

À professora Marta Ferreira Bastos, pelo carinho e por seus ensinamentos, com a sua brilhante didática me fez entender imunologia!!!

Aos professores do Centro de Pós-Graduação e Pesquisa do Curso de Odontologia, Jamil Awad Shibli, Leandro Chambrone, Alessandra Cassoni, André Figueiredo Reis e José Augusto Rodrigues, por contribuírem com seus ensinamentos.

À Camila Daguani, obrigada pela ajuda com a clínica e com os pacientes.

Aos colegas Elvis, Antonio Carlos e Wanessa, pela companhia durante os módulos.

À aluna de iniciação, Suellen pela ajuda.

À Samanta, pelos serviços prestados na secretaria.

Aos todos os meus queridos pacientes que participaram dessa pesquisa, pela confiança e por terem contribuído para a realização desse estudo.

Às minhas grande amigas Áurea e Eneide, que sempre me apoiaram nos momentos difíceis.

É impossível citar todas as pessoas que eu gostaria de agradecer... Obrigada a todos que estiveram direta ou indiretamente ligados a mim durante esta jornada!!!

RESUMO

Objetivo: Avaliar os dados clínicos de 2 anos de acompanhamento e as mudanças que ocorreram nos níveis e proporções de 40 espécies bacterianas subgengivais de indivíduos com periodontite crônica (PC) e diabetes mellitus (DM) tipo 2, tratados por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR) somente, ou em associação com metronidazol (MTZ) e amoxicilina (AMX). **Método:** Sessenta indivíduos com PC e DM foram aleatoriamente distribuídos para receber RAR somente ou com MTZ (400 mg / 3 X dia) + AMX (500mg/ 3 X dia) durante 14 dias. Seis amostras de placa subgengival por indivíduo foram avaliadas por *checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 espécies bacterianas nos tempos iniciais e em 3 meses, 1 ano e 2 anos pós-tratamento. **Resultados:** Aos 2 anos, o grupo tratado com antibiótico apresentou uma menor média de número de sítios com profundidade de sondagem (PS) ≥ 5 mm (3.5 ± 3.4) em comparação com o grupo tratado apenas com a RAR somente (14.7 ± 13.1 , $p < 0.05$). 22% dos indivíduos do grupo controle e 76% do grupo teste alcançaram o objetivo final do tratamento clínico aos 2 anos pós-tratamento, e a administração de MTZ+AMX foi a única variável capaz de aumentar, com significância estatística, as chances de se alcançar esse objetivo clínico em 2 anos (*odds ratio*, 20.9; $p=0.0000$). O grupo teste teve menor média na proporção (5.5%) dos patógenos do complexo vermelho comparado ao grupo controle (12.1%) aos 2 anos. **Conclusão:** O uso adjunto do MTZ+AMX melhora os resultados clínicos e microbiológicos da RAR no tratamento de indivíduos com PC e DM.

Palavras-chave: Doença Periodontal; Metronidazol; Amoxicilina; Periodontite Crônica; Diabetes tipo 2; Microbiologia

ABSTRACT

Aim: To assess clinical data up to 2 years of follow-up and the changes occurring in the levels and proportions of 40 subgingival bacterial species of subjects with chronic periodontitis (ChP) and type 2 diabetes mellitus (DM) treated by means of scaling and root planning (SRP) alone or with metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX). **Methods:** Sixty subjects with ChP and DM were randomly assigned to receive SRP-only or with MTZ [400 mg/thrice a day (TID)] and AMX (500 mg/TID) for 14 days. Six subgingival plaque samples/subject were analyzed by checkerboard DNA–DNA hybridization for 40 bacterial species at baseline, 3 months, 1 and 2 years post-therapy. **Results:** At 2 years, the antibiotic-treated group had a lower mean number of sites with probing depth (PD) \geq 5 mm (3.5 ± 3.4 , $p < 0.05$) than the SRP-treated group (14.7 ± 13.1 , $p < 0.05$). 22% of subjects in the control group and 76% in the test group reached the clinical endpoint for treatment at 2 years post-therapy, and MTZ+AMX intake was the only significant predictor for subjects achieving this endpoint at 2 years (odds ratio, 20.9; $p = 0.0000$). The test group had lower mean proportions (5.5%) of red complex pathogens than the control group (12.1%) at 2 years ($p < 0.05$). **Conclusion:** The adjunctive use of MTZ+AMX improves the clinical and microbiological outcomes of SRP in the treatment of subjects with generalized chronic periodontitis and type 2 DM.

Key-words: Periodontal disease; Metronidazole; Amoxicillin; Chronic periodontitis; Type II diabetes; Microbiology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Colocação das travas de segurança nos tubos contendo as amostras	36
Figura 2	Fervura das amostras	36
Figura 3	Preparo do Acetato de Amônia	37
Figura 4	Colocação dos filtros e da membrana no Minislot	37
Figura 5	Colocação das amostras no Minislot	37
Figura 6	Representação gráfica do Minislot 30 e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon	38
Figura 7	Representação gráfica do Miniblotter 45 e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival.	39
Figura 8	Lavagem das membranas em banho-maria a 65°C	40
Figura 9	Lavagem das membranas à 37°C com agitação	40
Figura 10	Lavagem das membranas com agitação em temperatura ambiente	40
Figura 11	Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (Socransky et al., 1998; Socransky & Haffajee, 2002)	33
Tabela 2	Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgingival	41

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1. Periodontite: definição e etiologia	12
1.2. Raspagem e alisamento radicular associado à antibióticos sistêmicos	15
1.3. MTZ e AMX sistêmicos como adjuntos à RAR	19
1.4. Diabetes Melito (DM) e as doenças periodontais	23
1.5. Microbiota periodontal em indivíduos portadores de DM	26
1.6. Antibióticos sistêmicos como adjunto à RAR em diabéticos tipo2 com periodontite crônica	29
1.7. MTZ e AMX sistêmicos como adjunto à RAR em diabéticos tipo 2 com periodontite crônica	30
2 Proposição	32
3 Material e Métodos	33
3.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento	33
3.2. Isolamento do DNA e preparo das sondas	35
3.3. Técnica checkerboard DNA-DNA hybridization	35
3.3.1. Preparo da membrana e colocação das amostras	35
3.3.2. Hibridização da membrana com as sondas de DNA	38
3.3.3. Lavagem	39
3.3.4. Detecção dos sinais	41
3.3.5. Leitura dos resultados	42
4. Artigo científico	43
Referências	76
Anexo (Miranda et al. 2014)	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Periodontite: definição e etiologia

Periodontite crônica é uma doença infecciosa e inflamatória mais prevalente em adultos cujos agentes etiológicos são microrganismos específicos presentes no biofilme dental (LÖE et al. 1965, SOCRANSKI & HAFFAJEE 1994a). A mesma é decorrente da complexa interação entre os microrganismos orais e a exacerbação das respostas inflamatórias e imunes, caracterizada pela secreção de diversos mediadores inflamatórios que degradam as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, podendo levar à perda do elemento dental (KINANE & MARK BARTOLD, 2007).

Muitas investigações científicas vêm sendo realizadas nas últimas décadas com o objetivo de compreender melhor a estrutura e a composição do biofilme polimicrobiano associado à saúde e às doenças periodontais, juntamente com a melhor compreensão da etiologia e patogênese das diferentes formas de periodontite. A identificação dos agentes etiológicos de qualquer doença auxilia diretamente na seleção de condutas terapêuticas mais adequadas. Em relação à periodontite, apesar de grandes avanços no campo da microbiologia nas últimas décadas, ainda existem muitas lacunas em relação sua etiologia para serem desvendadas. Um exemplo disso é que ainda existem vários casos refratários e recorrentes nos quais a doença continua a progredir apesar do tratamento periodontal atualmente empregado .

A microbiota oral é um dos microbiomas mais complexos que colonizam o corpo humano. Mais de 500 espécies bacterianas foram identificadas na cavidade oral por meio de diversas técnicas de cultivo e de biologia molecular. No entanto, apenas uma pequena parcela destas espécies tem relação direta com a doença periodontal. A microbiota na periodontite é diferente daquela associada ao periodonto saudável, sendo que as principais diferenças entre a placa supra e subgingival, assim como entre os pacientes saudáveis e com periodontite são as

proporções das espécies patogênicas e das espécies compatíveis com o hospedeiro. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram detectadas em amostras de placa supragengival tanto em pacientes saudáveis como em pacientes com periodontite. As espécies de *Actinomyces* apresentaram taxas dominantes tanto na placa supragengival como na subgengival em pacientes saudáveis e com periodontite. No entanto, proporções aumentadas de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, de espécies de *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* e *Treponema* foram detectadas na placa subgengival de pacientes com periodontite (XIMENEZ-FYVIE et al., 2000).

No trabalho de HAFFAJEE & SOCRANSKY (1994) foi levantada a hipótese de que os seguintes fatores são necessários para o início e a progressão das doenças periodontais: (1) grau de virulência do patógeno periodontal; (2) características do meio local; e (3) susceptibilidade do hospedeiro. Os autores demonstraram que os patógenos periodontais mais virulentos e altamente patogênicos são *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, sendo essas bactérias denominadas “marcadoras da periodontite”, e consideradas os verdadeiros agentes etiológicos das doenças periodontais.

O termo virulência é definido como a habilidade relativa de um organismo causar doença ou interferir no metabolismo ou na função fisiológica do hospedeiro. A associação de um microrganismo com a doença é um dado relevante para a comprovação de sua patogenicidade. Além disso, a atenuação da doença após eliminação do patógeno mediante tratamento, a ativação da resposta específica do hospedeiro contra o agente infeccioso, a detecção de possíveis fatores de virulência e o desenvolvimento em modelos experimentais de quadros patológicos semelhantes ao da periodontite também são aspectos relevantes para identificação de microrganismos associados às doenças periodontais (postulados de SOCRANSKY, 1979).

A técnica de biologia molecular denominada *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, foi introduzida na periodontia por SOCRANSKY et al., em 1994. Este método de diagnóstico oferece algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultura microbiana como, por exemplo, a detecção de microrganismos

de desenvolvimento lento, nutricionalmente exigentes ou fastidiosos, além da detecção de microrganismos não cultiváveis. Além disso, esse método utiliza várias sondas de DNA durante o processamento de várias amostras concomitantemente, permitindo uma melhor compreensão da etiologia da doença periodontal como um biofilme polimicrobiano (SIQUEIRA et al., 2000). O *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi utilizado no estudo de SOCRANSKY et al., em 1998, onde foram identificados agrupamentos bacterianos, divididos em cinco complexos microbianos que se instalam sequencialmente na placa subgengival de indivíduos adultos. Neste trabalho, foram examinadas 13.321 amostras de placa subgengival de 185 adultos. Foi demonstrado que as coagregações bacterianas não ocorrem aleatoriamente, mas sim de forma sequencialmente organizada e específica. Os complexos consistiram em agrupamentos bacterianos (*clusters*) nomeados de violeta, amarelo, verde, laranja e vermelho, além do grupo dos *Actinomyces*. Os complexos amarelo, violeta e verde e o grupo dos *Actinomyces* não estão relacionados à doença e são considerados os colonizadores iniciais, capazes de se aderir à superfície dental, formando a base da pirâmide do biofilme. O complexo amarelo é composto pelos *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius* e *Streptococcus oralis*. O complexo violeta engloba a *Veillonella parvula* e o *Actinomyces odontolyticus*, e o complexo verde compreende o *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a. Esses complexos iniciais criam condições ecológicas para a implantação das bactérias do complexo laranja, que é composto pelas espécies *Fusobacterium nucleatum ssp.*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus*, que estão implicadas na patogênese das doenças periodontais. O complexo laranja cria condições para a implantação do complexo vermelho, que abrange as principais espécies periodontopatogênicas, constituído por *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, que são considerados os verdadeiros agentes etiológicos da doença periodontal, relacionados ao aumento da profundidade de bolsa e presença de sangramento à sondagem (SS). O *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b, por sua vez, é uma espécie bacteriana Gram-negativa anaeróbia que não está relacionada a nenhum desses complexos. Sua alta virulência nas periodontites foi observada por diversos autores, sendo considerado um

importante integrante da etiologia das doenças periodontais, especialmente as periodontites agressivas (SLOTS et al., 1980; ZAMBON et al., 1983; MANDELL, 1984; CORTELLI et al., 2005; FAVERI et al. 2009; CHAHBOUNI et al., 2013).

Além das espécies já estabelecidas como periodontopatógenos, avanços mais recentes nas técnicas moleculares permitiram a identificação de novas espécies bacterianas associadas à periodontite crônica. Recentemente o grupo de pesquisa da Universidade de Guarulhos realizou a primeira revisão sistemática de novos patógenos, onde foram identificados 3 principais domínios: Bactéria, Arquea e Eucariotas (representados pelos fungos). Bactéria foi o principal domínio identificado, e incluiu 10 filós: *Bacteroidetes*, *Espiroquetas*, *Firmicutes*, *Sinergistetes*, *Proteobactéria*, *Actinobactéria*, *Fusobactéria*, *Chloroflexi*, *Tenericutes* e *Candidatus Saccharibactéria*. O filo *Firmicutes* apresentou o maior número de espécies associadas à periodontite, enquanto que o filo *Chloroflexi* apresentou a menor associação com as doenças periodontais. Segundo os autores, ainda são necessárias maiores investigações para conhecer o verdadeiro papel desses novos patógenos no início e/ou progressão das doenças periodontais (PEREZ-CHAPARRO et al., 2014).

1.2 Raspagem e alisamento radicular (RAR) associada à antibióticos sistêmicos

Diante do reconhecimento da importância das diversas espécies bacterianas no desenvolvimento e progressão das doenças periodontais, diversos estudos têm utilizado diferentes técnicas microbiológicas para caracterizar o perfil das diferentes formas de doenças periodontais e para monitorar suas reduções após diversos tipos de terapias (SOCRANSKY & HAFFAJEE 1994; WINKEL et al., 2001; FERES et al., 2001; QUIRYNEN et al., 2003; HAFFAJEE et al., 2008; FAVERI et al. 2009).

Uma terapia periodontal eficiente presume a redução de patógenos periodontais específicos para a obtenção da “cura” da doença periodontal (SLOTS et al., 1979; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002). Clinicamente, o principal objetivo do tratamento periodontal é reduzir profundidade de sondagem (PS), SS, supuração, promover ganho no nível clínico de inserção (NCI) e manter esses parâmetros estáveis em longo prazo. Esses objetivos só são alcançados quando os níveis, as proporções e o percentual dos sítios colonizados por patógenos do complexo laranja e principalmente do vermelho são

reduzidos após a terapia, de forma que uma comunidade compatível com a saúde seja estabelecida (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005; TELES et al., 2006).

Estudos clínicos controlados têm demonstrado que as diferentes modalidades de tratamento periodontal diferem sobremaneira na eficácia de eliminação dos patógenos periodontais. Neste contexto, têm sido documentado que, embora a raspagem e alisamento radicular (RAR) seja efetiva no tratamento periodontal, esse procedimento apresenta certas limitações em alterar profundamente os parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos, principalmente em casos de doença avançada (SOARES et al., 2014). Sendo assim, outras terapias coadjuvantes à RAR têm sido investigadas.

Neste contexto, a efetividade de antibióticos sistêmicos como coadjuvantes à RAR para o controle da microbiota específica associada à periodontite vem sendo demonstrada há décadas (SLOTS, 1996). Os antibióticos sistêmicos entram nos tecidos periodontais por meio da corrente circulatória, sendo liberados pelo fluido gengival e fluxo salivar e atingindo áreas relativamente inacessíveis como bolsas profundas, furcas, túbulos dentinários, mucosas e tonsilas (MÜLLER et al., 1998).

A eficiência de diversos tipos de antibióticos como as penicilinas, tetraciclina, nitroimidazóis, clindamicinas e quinolonas tem sido frequentemente testada para as doenças periodontais. Os grupos farmacológicos pertencentes às tetraciclina e lincosamidas são considerados bacteriostáticos pois inibem reversivelmente a síntese proteica. Os grupos pertencentes às penicilinas, nitroimidazóis, macrolídeos e quinolonas são bactericidas pois inibem a síntese do DNA e agem sobre a parede celular bacteriana (KOROKOLVAS, 2012).

A tetraciclina é um antibiótico bacteriostático, que age sobre a inibição da síntese proteica. Portanto, sua ação é dependente de sua penetração à região interna bacteriana e ligação à subunidade ribossômica 30S, causando uma inibição da replicação do DNA (PALLASCH 2004). Tanto a doxiciclina como a minociclina são drogas mais lipossolúveis que a tetraciclina clorada, atravessando com mais facilidade a membrana bacteriana bilipídica e aumentando a eficiência bacteriostática (PATIL et al., 2013). As tetraciclina têm ainda a propriedade farmacológica de inibição da colagenase pelo ligação aos íons de cálcio e zinco (GOMES et al., 1984; GOLUB et al.,

1994). O efeito da doxiciclina sistêmica (100 mg) na placa subgingival foi avaliado por FERES et al. (1999). Os resultados demonstraram que não houve diminuição estatisticamente significativa nas proporções dos periodontopatógenos como *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* e *A. actinomycetemcomitans* após uso diário de doxiciclina por 14 dias.

Entre os macrolídeos, a eritromicina foi o primeiro descrito e possui atuação contra as bactérias Gram-positivas facultativas e anaeróbias. Porém, bactérias Gram-negativas não são efetivamente sensibilizadas pelas eritromicinas, pois essa medicação não tem a capacidade de penetrar na complexa parede lipopolissacarídea das espécies Gram-negativas, diminuindo a chance de atuação deste medicamento no tratamento das doenças periodontais (GOODSON, 1994). A azitromicina é uma nova geração de macrolídeos denominada de azalida. Apresenta amplo espectro de ação e é capaz de atingir os sítios infectados e manter altas concentrações teciduais (HOEPELMAN & SCHNEIDER, 1995). A mesma tem demonstrado benefícios clínicos no tratamento periodontal quando comparados somente à RAR (SMITH et al. 2002, HAFFAJEE et al. 2007, 2008, OTEO et al. 2010), além de apresentar efetividade *in vitro* contra os diversos sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* (PAJUKANTA et al., 1992) e também contra *P.gingivalis* (PAJUKANTA et al., 1993). Os efeitos clínicos e microbiológicos da azitromicina sistêmica associada à RAR foi avaliado pelo grupo de pesquisa da Universidade Guarulhos (SAMPAIO et al. 2011) por meio de um estudo clínico, randomizado e duplo cego com 40 pacientes. Um grupo de pacientes recebeu apenas RAR enquanto o outro recebeu RAR associada à azitromicina (500 mg/dia) durante 5 dias. Os exames clínicos e microbiológicos pela técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foram realizados no início do estudo, aos 6 meses e aos 12 meses após os tratamentos. Os resultados não demonstraram diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que a azitromicina não promoveu benefícios adicionais à RAR no tratamento da periodontite crônica generalizada.

A amoxicilina (AMX) é um antibiótico semi sintético de amplo espectro, bactericida, pertencente ao grupo das penicilinas, que atua sobre espécies anaeróbias estritas e facultativas, cocos e bacilos Gram-positivos e Gram-negativos (KULIK et al., 2008). A AMX apresenta alta disponibilidade no fluido crevicular sendo capaz de atuar

sobre patógenos Gram-positivos, como os *Streptococcus* e *Actinomyces*. De maneira geral, as penicilinas agem sobre a síntese da parede celular, hidrolisando o anel β -lactâmico pela quebra da ligação amida, inibindo a síntese da parede celular. Porém, algumas espécies bacterianas desenvolvem uma enzima denominada β -lactamase capaz de inativar a ação desse antibiótico. Logo, o mesmo tem demonstrado ser inefetivo contra algumas espécies somente quando associado à um inibidor da β -lactamase, como o ácido clavulânico (TENENBAUM et al., 1997).

O metronidazol (MTZ) é um nitromidazol sintético com propriedades bactericidas, que age sobre a síntese de DNA, através do desmembramento dos radicais de nitrogênio em seus ânions, quebrando a cadeia de DNA (EDWARDS, 1993). Possui um espectro de ação capaz de atingir bactérias Gram-negativas e anaeróbias estritas (ABU-FANAS et al., 1991), característica dos principais patógenos associados ao início e à progressão das doenças periodontais. Esse medicamento foi descoberto na década de 50, quando pesquisadores do laboratório Frances Rhone-Poulenc tentavam criar um produto sintético para agir sobre o *Trichomonas vaginalis*. O MTZ se apresentou efetivo contra esse protozoário e, em um caso clínico, uma paciente com *T. vaginalis* e gengivite ulcerativa necrosante teve “cura dupla” após a utilização do MTZ durante 1 semana (SHINN, 1962). Esta observação estimulou estudos que determinaram o MTZ como um importante antibiótico para as infecções periodontais. Os benefícios da utilização do MTZ como adjunto ao tratamento periodontal foi inicialmente reportado por LOESCHE et al., em 1984, 1987, 1991, que também demonstraram a diminuição da necessidade de tratamento cirúrgico após a aplicação deste medicamento (LOESCHE et al., 1992). Mais tarde, outros estudos também demonstraram os benefícios clínicos da utilização do MTZ como adjunto à RAR no tratamento da periodontite crônica, quando comparados à terapia mecânica sozinha (CARVALHO et al., 2004; HAFFAJEE et al. 2007; MATARAZZO et al. 2008; SILVA et al. 2011).

Em 2001, um estudo avaliou os efeitos clínicos e microbiológicos da AMX (500mg 3x/dia/14 dias) ou MTZ (250mg 3x/dia/14 dias) adjuntos à RAR (FERES et al. 2001). Foram realizadas avaliações clínicas e dos níveis de 40 espécies bacterianas subgengivais em 1 ano após a terapia. As médias de profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI) foram reduzidos em 1 ano em ambos os grupos. Os

níveis e proporções de *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* foram significativamente reduzidos durante a administração dos antibióticos e se apresentaram inferiores ao nível basal aos 360 dias. Os níveis do *T. forsythia* foram reduzidos drasticamente em todos os tempos no grupo que ingeriu AMX. A contagem das espécies *Campylobacter*, *E. nodatum*, *F. nucleatum* sp., *F. periodonticum* e *P. nigrescens* estavam em níveis mais baixos durante e imediatamente após a terapia; porém, foram gradualmente aumentando após o fim do uso dos antibióticos. Os membros dos gêneros *Actinomyces*, *Streptococcus* e *Capnocytophaga* foram minimamente afetados pelo MTZ. A AMX diminuiu os níveis e a proporção das espécies *Actinomyces* durante e após a terapia. Os resultados desse estudo sugeriram que o MTZ ou a AMX podem ser úteis na diminuição inicial dos patógenos periodontais quando associados à RAR.

1.3 MTZ e AMX sistêmicos como adjuntos à RAR

Devido à complexidade da microbiota presente nas infecções periodontais, a combinação de antibióticos vem ganhando grande importância nas pesquisas clínicas. Os efeitos da combinação de AMX e MTZ foi primeiramente demonstrado por VAN WINKELHOFF et al., em 1989, no tratamento de pacientes com periodontite refratária e periodontite agressiva portadores de *A. actinomycetemcomitans*.

Em 2003, HAFFAJEE et al. realizaram uma revisão sistemática sobre os efeitos dos antibióticos sistêmicos no tratamento da doença periodontal, verificando que os pacientes que utilizaram algum tipo de antibiótico apresentaram maiores reduções no NCI quando comparados aos que não receberam antibióticos. Além disso, os pacientes que receberam tetraciclina e MTZ apresentaram melhoras estatisticamente significantes, enquanto que os pacientes que receberam a associação de MTZ e AMX apresentaram um benefício limítrofe de significância estatística. Esta revisão despertou uma preocupação com os desenhos experimentais, que deveriam atender critérios científicos rígidos (randomização, uso de placebos, cegamento, etc.) para melhor elucidar o verdadeiro impacto do uso da combinação de MTZ e AMX como adjunto à RAR.

O primeiro estudo clínico randomizado placebo-controlado avaliando os efeitos clínicos da RAR associado ao MTZ e AMX foi publicado por GUERREIRO et al., em 2005. Os resultados demonstraram que essa modalidade de tratamento proporciona melhor resposta clínica comparada à RAR sozinha no tratamento da periodontite agressiva. Em uma revisão sistemática, realizada por SGOLASTRA et al. (2012a), foram reportados dados de 6 estudos clínicos randomizados que encontraram maior ganho de inserção clínica e redução na PS com o uso de MTZ e AMX, reforçando a importância da utilização dessa combinação adjunta à RAR no tratamento da periodontite agressiva. Dessa forma, a associação de MTZ e AMX foi estabelecida como um dos protocolos mais promissores para tratamento da periodontite agressiva (GUERREIRO et al., 2005; XAJIGEORGIOU et al., 2006; KANER et al., 2007; YEK et al., 2010; MESTNIK et al., 2010; MESTNIK et al., 2012; AIMETTI et al., 2012; LIMA OLIVEIRA et al., 2012; SGOLASTRA et al. 2012a).

Assim como na periodontite agressiva, diversos estudos também demonstraram que a combinação antibiótica de MTZ e AMX como coadjuvante à RAR é efetiva no tratamento da periodontite crônica (BERGLUNDH et al., 1998; WINKEL et al., 2001; ROONEY et al., 2002; PAHKLA et al., 2006; MOEINTAGHAVI et al., 2007; MATARAZZO et al., 2008; CIONCA et al., 2009; SILVA et al., 2011; SGOLASTRA et al., 2012b; FERES et al., 2012; SOARES et al., 2014).

O primeiro estudo clínico randomizado sobre os efeitos clínicos do uso de MTZ ou MTZ e AMX no tratamento da periodontite crônica foi realizado por RONEY et al. 2002. Sessenta e seis indivíduos receberam RAR e foram aleatorizados em 4 grupos: administração de AMX (250 mg, 3x/dia/7dias) e MTZ (200 mg, 3x/dia/7dias), placebo e MTZ (200 mg, 3x/dia/7dias), placebo e AMX (250 mg, 3x/dia/7dias) e somente placebo. De acordo com os resultados, os grupos que receberam algum tipo de antibiótico apresentaram melhoras clínicas mais significativas. Além disso, os maiores benefícios clínicos foram observados no grupo que recebeu a associação antibiótica de MTZ e AMX.

Com o objetivo de verificar os efeitos somente da administração do MTZ e AMX, LÓPEZ et al. (2006), realizaram uma avaliação clínica e microbiológica em 22 pacientes com periodontite crônica. Um grupo recebeu MTZ + AMX como monoterapia

durante 7 dias, e o outro grupo recebeu RAR e placebos. Foram avaliados parâmetros clínicos e microbiológicos (contagem de 40 espécies por meio *Checkerboard DNA-DNA hybridization*) no tempo inicial e aos 3, 6, 9 e 12 meses pós-terapias. Os resultados demonstraram melhoras nos parâmetros clínicos e microbiológicos em 12 meses para ambas as terapias, sem diferenças estatisticamente significantes.

SGOLASTRA et al. (2012b), realizaram outra revisão sistemática com meta-análise de 4 estudos clínicos aleatorizados sobre os efeitos da RAR associada ao uso adjunto do MTZ e AMX no tratamento da periodontite crônica. Os resultados demonstraram evidentes benefícios clínicos, como maior ganho de inserção clínica e redução da PS com o uso desta combinação antibiótica.

Um dos principais focos de estudo do grupo de pesquisa da Universidade Guarulhos é a avaliação dos efeitos clínicos e microbiológicos da combinação de MTZ e AMX adjunta à RAR nos diferentes tipos de periodontites, associada ou não à fatores de riscos. A fim de se obter a melhor dose/efeito do medicamento, tem sido utilizado o protocolo de MTZ (400mg 3x dia/14 dias) e AMX (500mg 3xdia/14 dias) administrados concomitantemente ao período de RAR.

MATARAZZO et al. (2008) realizaram um estudo clínico randomizado, placebo-controlado para avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos da RAR combinada ao MTZ ou MTZ e AMX no tempo inicial e em 3 meses, em pacientes fumantes com periodontite crônica. Resultados superiores na redução da PS e ganho de inserção clínica foram obtidos para o grupo que utilizou o MTZ e AMX como adjunto à RAR, quando comparado ao grupo que utilizou somente MTZ e RAR. A combinação antibiótica também proporcionou resultados superiores no perfil microbiológico subgingival, com maior redução dos periodontopatógenos *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, e maior aumento nas proporções das espécies compatíveis com o hospedeiro.

FAVERI et al. (2014) compararam os efeitos do MTZ e AMX como adjuntos à RAR no tratamento de fumantes e não-fumantes com periodontite crônica. Melhoras clínicas e microbiológicas foram observadas em ambos os grupos. No entanto, independente do hábito de fumar, não-fumantes apresentaram um menor número de

sítios com PS \geq 5mm, bem como maiores reduções da média de PS e ganho de inserção após 3 meses. Quanto à microbiota subgengival, as alterações mais favoráveis também foram observadas nos não-fumantes.

Com o objetivo de avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos associação de MTZ e AMX, em pacientes com periodontite crônica não-fumantes SILVA et al. (2011) realizaram um estudo com 51 pacientes, separados aleatoriamente em 3 grupos: RAR, RAR + MTZ e, RAR + MTZ + AMX. Exames clínicos e microbiológicos foram realizados no início do estudo e após 3 meses após os tratamentos. Foram analisadas 9 amostras por paciente pelo método molecular *Checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 espécies bacterianas. Os resultados demonstraram a RAR + MTZ + AMX resultou em maiores reduções nos níveis e proporções dos patógenos do complexo vermelho e um aumento significativo na proporção de espécies compatível com a saúde, em comparação ao tratamento apenas com RAR.

Corroborando esses resultados, FERES et al. (2012) realizaram um estudo clínico longitudinal, placebo-controlado e duplo cego em 118 pacientes com periodontite crônica. Os participantes da pesquisa foram alocados em um dos 3 grupos terapêuticos: RAR + placebo, RAR + MTZ, RAR + MTZ + AMX. Uma segunda alocação foi realizada para que metade dos pacientes recebessem ainda bochechos de clorexidina (0,12%) ou bochechos placebos. Parâmetros clínicos periodontais foram obtidos no tempo inicial, em 3, 6 e 12 meses pós-terapias. Foi demonstrado que os dois grupos que receberam antibióticos apresentaram menor número de sítios com PS \geq 5mm e menor número de pacientes com “Alto Risco” de progressão de doença, isto é, com \geq 9 sítios residuais após 1 ano de tratamento. A regressão múltipla linear demonstrou que somente a utilização de MTZ ou MTZ + AMX foram capazes de prever o “Baixo risco” de progressão da doença nestes pacientes com periodontite crônica generalizada. Mais tarde, a avaliação do perfil microbiológico subgengival desses mesmos pacientes foi realizada por SOARES et al. (2014), por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 espécies bacterianas. Os resultados demonstraram que os três tratamentos conduziram à uma diminuição estatisticamente significativa das espécies do complexo vermelho e um aumento das espécies compatíveis com o hospedeiro em 12 meses. No entanto, aos 12 meses, os grupos que receberam antibióticos abrigaram

menores contagens e proporções de patógenos em bolsas inicialmente rasas e profundas, quando comparado ao grupo controle.

1.4 Diabetes Melito (DM) e as doenças periodontais

Embora o perfil microbiológico seja o fator etiológico determinante das periodontites, diversos fatores sistêmicos e ambientais têm sido apontados como importantes moduladores da progressão das doenças periodontais. Neste contexto, o DM é um reconhecido fator de risco para as doenças periodontais, capaz de influenciar negativamente o curso das mesmas (DUARTE et al.2007,2011, SANTOS et. al.2010, RIBEIRO et al.2011).

Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), o DM afeta atualmente 382 milhões de pessoas no mundo e apresenta uma estimativa de aumentar em prevalência para 592 milhões em 2035. Essa patologia consiste em um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante na falha da secreção ou ação da insulina, podendo ser divididas em três tipos principais: tipo 1, anteriormente denominado insulino-dependente, tipo 2, anteriormente denominado não-insulino dependente, e gestacional, que ocorre durante o período da gravidez. O DM tipo 1 está relacionada à destruição auto-imune das células β pancreáticas, perda praticamente total de secreção de insulina e, geralmente, acomete indivíduos jovens. O DM tipo 2, por sua vez, está relacionado à resistência celular à ação da insulina e atinge indivíduos com idades mais avançadas.

A importância do DM como risco para as doenças periodontais foi enfatizada na década de 90 por meio de estudos transversais e longitudinais na população de índios Pima no Arizona, que apresentava alta prevalência de DM. Nesta população, foi demonstrada uma nítida maior incidência de periodontite nos indivíduos acometidos por DM, comparada aos não-diabéticos (EMRICH et al., 1991). Subsequentemente, diversos dados epidemiológicos confirmaram que o DM é um dos fatores de risco mais importantes para a periodontite (SALVI et al., 2008), e que a suscetibilidade à periodontite é aumentada em torno de três vezes em indivíduos diabéticos em relação aos não-diabéticos (MEALEY & OCAMPO, 2007). Pacientes diabéticos do tipo 2 apresentaram maior perda de inserção (GROSSI et al. 1994; FIRATLI et al. 1996;

NOVAK et al. 2008), e maior perda óssea alveolar (TAYLOR et al., 1998) que não-diabéticos em diversos estudos. O DM também foi correlacionado com maiores níveis de acúmulo de cálculo (KAUR et al., 2009) e perda dentária (KAUR et al., 2009; SUSANTO et al., 2011; JIMENEZ et al., 2012; KIM et al., 2013).

Numa pesquisa da Avaliação Nutricional e de Saúde Nacional dos Estados Unidos (NHANES III), foi verificado ainda que o controle glicêmico é um importante determinante para o aumento do risco de periodontite, uma vez que os adultos com hemoglobina glicada (HbA1c) > 9% apresentaram maior prevalência e gravidade de periodontite comparado aos indivíduos não-diabéticos (TSAI et al., 2002). No grupo de pesquisa da Universidade Guarulhos, SANTOS et al. (2012) avaliaram a relação entre o controle glicêmico e as condições periodontais clínicas de 91 brasileiros diabéticos com periodontite crônica generalizada. A frequência de indivíduos diabéticos não-controlados (HbA1c > 7,5%) foi maior em relação aos indivíduos melhor-controlados (HbA1c ≤ 7,5%). Entre os parâmetros clínicos avaliados, apenas o índice de placa foi positivamente correlacionado com os níveis de HbA1c e glicemia em jejum, sendo significativamente maior nos indivíduos que apresentam níveis de HbA1c > 11%. Entretanto, os autores não observaram uma relação de dose-resposta entre a gravidade e extensão da periodontite e o controle glicêmico. Recentemente, Kim et al. (2013) demonstraram que os parâmetros clínicos periodontais, a perda dentária e a inflamação gengival foram significativamente influenciados pelo tempo de duração do DM em uma população de sul-coreanos. Além disso, altas taxas de HbA1c e glicemia em jejum foram correlacionadas à uma maior inflamação periodontal.

A primeira clara evidência de que a periodontite também é capaz de afetar os índices glicêmicos, foi demonstrada por TAYLOR et al., em 1998. Por meio de um estudo longitudinal, investigando indivíduos de uma comunidade indiana do Rio Gila, a periodontite avançada foi correlacionada ao aumento do risco para o controle glicêmico insatisfatório (HbA1c > 9,0%), no tempo inicial e em um acompanhamento de 2 anos. O impacto do efeito da periodontite na variação do índice de HbA1c foi demonstrado também por DEMMER et al. (2010), em um estudo prospectivo de 5 anos em 2.973 indivíduos. Os autores demonstraram que os indivíduos com periodontite avançada no tempo inicial aumentaram seu índice de HbA1c em 5 vezes, comparados com os

indivíduos sem periodontite. Este foi o primeiro trabalho que demonstrou que a periodontite avançada pode aumentar as taxas de HbA1c em indivíduos não-diabéticos, e que a progressão da periodontite pode aumentar o risco do indivíduo se tornar diabético em um período de 10 anos. Logo, atualmente, a interrelação entre periodontite e DM está cada vez mais evidente, sugerindo que a doença sistêmica pode predispor a infecção oral assim como esta pode exacerbar a condição sistêmica, estabelecendo uma relação bidirecional.

O conhecimento sobre a complexidade da rede de citocinas na relação hospedeiro-microbiota em pacientes diabéticos tem aumentado nos últimos anos. Recentemente, DUARTE et al. (2014) sugeriram que a susceptibilidade aumentada à periodontite em indivíduos diabéticos pode ser parcialmente explicada pela maior liberação de cito/quimiocinas pró-inflamatórias nesses indivíduos. Os autores avaliaram os níveis de 14 cito/quimiocinas no fluido gengival crevicular de indivíduos com DM tipo 2 não-controlados (HbA1c > 7,5%) comparados com os níveis observados em indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite crônica. Foi observado que os indivíduos diabéticos apresentaram concentrações bem mais elevadas de eotaxina, proteína inflamatória de macrófago α , fator estimulador de colônia granulócito-macrófago, interleucina (IL)-6 e IL-12 e fator de necrose tumoral- α .

Os pacientes diabéticos também apresentam defeitos na atividade dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) e falha na quimiotaxia de neutrófilos, na fagocitose e em outras atividades antimicrobianas, quando comparados aos pacientes saudáveis (ALBA-LOUREIRO et al. 2007). Além disso, vale destacar que a hiperglicemia crônica observada nesses pacientes, causa uma modificação não-enzimática em diversas macromoléculas, propiciando a geração de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que por sua vez podem desempenhar um importante papel na desregulação do processo inflamatório em indivíduos diabéticos. A ligação dos AGEs ao seu receptor (RAGE) pode desregular a produção de mediadores inflamatórios como a IL-1 β , TNF- α e IL-6 (LALLA et al. 2001). A elevada concentração sérica dos AGEs está relacionada com o desenvolvimento de mecanismos fisiopatológicos de complicações tardias do DM, como as doenças cardiovasculares e aterosclerótica, favorecendo o aumento do estresse oxidativo celular que dá origem as espécies reativas de oxigênio (EROs)(VLASSARA 2001). NAGATA (2005) verificou que o aumento dos níveis das

EROs ativadas pelos mediadores inflamatórios pode ter efeitos sobre patógenos, mas também sobre os tecidos ao redor. CHAPPEL & MATTHEWS (2007), demonstraram que esse mecanismo pode favorecer a destruição dos tecidos periodontais.

Sucessivas reduções da molécula de oxigênio em ânion superóxido, reduzem o peróxido de hidrogênio no radical hidroxila, que é reconhecido como o mais tóxico dentre as EROs. Porém, as células possuem diversos mecanismos de decomposição dessas espécies, denominadas de enzimas antioxidantes. DUARTE et al. (2012) avaliaram a expressão gênica de enzimas antioxidantes no tecido gengival de indivíduos com diabetes tipo 2 controlados e não-controlados com periodontite crônica. Foram medidos os níveis de RNAm de peroxirredoxina (PRDX) 1 e 2, catalase (CAT), peroxidase glutathiona (GPX1) e superóxido dismutase (SOD) 1 e 2, por meio do método de reação de polimerase em cadeia (PCR). Os autores demonstraram que os antioxidantes PRDX-1 e GPX-1 apresentam expressões aumentadas na PC, enquanto que os antioxidantes PRDX-2 e SOD-2 apresentaram-se aumentados em indivíduos diabéticos, especialmente nos indivíduos não-controlados com PC.

1.5 Microbiota periodontal em indivíduos portadores de DM

Diversos estudos têm tentado explicar a maior incidência e progressão de periodontite em pacientes diabéticos por meio de análises imunológicas e microbiológicas. No contexto das análises microbiológicas, vários estudos compararam a microbiota dos indivíduos diabéticos e não-diabéticos com periodontite (MASHIMO et al., 1983; THORSTENSSON et al., 1995; CAMPUS et al., 2005; OJIMA et al., 2005; HINTAO et al., 2007, CASARIN et al., 2012, 2013, LI et al., 2013, AEMAIMANAN et al., 2013, ZHOU et al., 2013. Entretanto, se e quais fatores podem influenciar as modificações do meio subgengival de indivíduos diabéticos ainda não estão claros.

THORSTENSSON et al. (1995), verificaram um aumento significativo de *P. gingivalis* em diabéticos tipo 2, quando comparados aos não-diabéticos. Entretanto nenhuma diferença foi encontrada em relação às espécies *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *Capnocytophaga spp.*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*. Os níveis elevados de *P. gingivalis* foram atribuídos à maior profundidade de bolsas nos diabéticos, e não à DM.

CAMPUS et al. (2005) avaliaram, por meio de um estudo caso-controle, a associação entre o DM e a doença periodontal em 71 indivíduos com DM tipo 2 e 141 controles não-diabéticos. Os participantes foram submetidos à um exame clínico periodontal e à avaliação microbiológica de amostras de placa subgengival em relação às espécies periodontopatogênicas *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia*. Os resultados demonstram uma associação positiva entre o DM e a prevalência de *P. gingivalis* e *T. forsythia*.

A espécie bacteriana *Mogibacterium timidum* foi sugerida na revisão sistemática desenvolvida por PEREZ-CHAPARRO et al. (2014) como um possível novo patógeno, presente no biofilme subgengival da periodontite. CASARIN et al. (2012) avaliaram a frequência de *M. timidum* em indivíduos com periodontite agressiva generalizada, e indivíduos com periodontite crônica generalizada com e sem DM tipo 2 não-controlada. A frequência de *M. timidum* foi significativamente mais elevada em bolsas profundas de indivíduos diabéticos com periodontite generalizada.

CASARIN et al. (2013) compararam a biodiversidade do biofilme subgengival em sítios periodontais profundos de diabéticos tipo 2, com taxas elevadas de HbA1c (>8%), e não-diabéticos com periodontite crônica, por meio de clonagem e sequenciamento utilizando a técnica de 16SrRNA. Os autores encontraram porcentagens mais baixas dos gêneros *Porphyromonas*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Synergistetes*, *Tannerella* e *Treponema* nos diabéticos em relação aos não-diabéticos. Diabéticos apresentaram maiores percentuais de clones totais de TM7 (maior linhagem bacteriana) e dos gêneros *Aggregatibacter*, *Neisseria*, *Gemella*, *Eikenella*, *Selenomonas*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Streptococcus*. Além disso, algumas espécies, como *F. nucleatum*, *V. parvula*, *Veillonella dispar* e *Eikenella corrodens* foram detectadas em uma frequência significativamente maior nos diabéticos em comparação aos não-diabéticos. Logo, indivíduos com periodontite crônica portadores de DM tipo 2 não-controlada apresentaram diferenças significantes na biodiversidade microbiana subgengival, quando comparados aos não-diabéticos.

LI et al. (2013) observaram alta prevalência e maiores quantidades de *T. denticola* e *T. forsythia* e menores de *P. intermedia* em chineses portadores de DM, quando comparado aos chineses sistemicamente saudáveis. AEMAIMANAN et al. (2013)

demonstraram maiores quantidades de bactérias do complexo vermelho em indivíduos diabéticos com controle glicêmico insatisfatório quando comparado aos não-diabéticos. Além disso, os níveis de *T. denticola* e *T. forsythia* em sítios saudáveis de diabéticos compensados e não-compensados foram significativamente maiores quando comparados aos não-diabéticos.

HINTAO et al., em 2007, realizaram um estudo longitudinal comparando a microbiota periodontal de indivíduos diabéticos e não-diabéticos para 17 espécies bacterianas por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Os autores demonstraram que as espécies bacterianas *T. denticola*, *S. sanguinis*, *P. nigrescens*, *S. intermedius* e *S. oralis* estavam em níveis mais elevados na placa supragengival dos diabéticos. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas amostras da placa subgengival.

ZHOU et al. (2013) investigaram os efeitos do DM tipo 2 na composição do biofilme subgengival por meio de cultura e sequenciamento (*16S rDNA*). Os participantes foram separados em 4 grupos: não-diabéticos sem periodontite, não-diabéticos com periodontite, diabéticos com periodontite e diabéticos sem periodontite. Nos indivíduos com saúde periodontal, os níveis de 3 gêneros (*Prevotella*, *Pseudomonas* e *Tannerella*) e nove OTUs foram significativamente diferentes entre diabéticos e não-diabéticos. Os gêneros *Prevotella* e *Tannerella* estavam aumentados nas amostras sem periodontite de não-diabéticos, enquanto *Pseudomonas* estava associado somente às amostras de diabéticos. A maioria dos OTUs relacionado à saúde estava reduzido nas amostras de diabéticos sem periodontite. *Actinobacteria* e *Proteobacteria* apresentaram em maior abundância em amostras de periodontite de diabéticos, enquanto *Bacteroidetes* estava mais abundante em amostras com periodontite de não-diabéticos. Além disso, alguns OTUs, incluindo OTU0016 (*Propionibacteriaceae*), OTU0161 (*Capnocytophaga sputigena*) e OTU0010 (*T. forsythia*) estavam mais abundantes nas amostras de periodontite de diabéticos, comparado aos não-diabéticos. Duas espécies do “complexo vermelho”, *P. gingivalis* e *T. denticola* não apresentaram diferenças significativas entre os grupos com periodontite com e sem DM. A *T. forsythia*, por sua vez, apresentou a maior prevalência nas amostras do grupo de diabéticos com periodontite, o que poderia contribuir com a

gravidade da doença periodontal em diabéticos. Baseado nestes dados, os autores concluíram que o DM pode alterar a composição bacteriana da placa subgingival.

1.6 Antibióticos sistêmicos como adjuntos à RAR em diabéticos tipo 2 com periodontite crônica

Até o presente momento, a doxiciclina tem sido o antibiótico sistêmico mais estudado como coadjuvante ao tratamento periodontal de indivíduos diabéticos. A mesma apresenta não apenas propriedades antibióticas, mas também um efeito inibitório sobre as metaloproteinases (GROSSI et al. 1997, PROMSUDTHI et al. 2005, DEO et al. 2010, ENGBRETSON et al. 2011, GILOWSKI et al. 2012, TSALIKIS et al. 2014). Um estudo clínico recente, randomizado e placebo-controlado (TSALIKIS et al. 2014) avaliou os efeitos da doxiciclina sistêmica nos parâmetros clínicos e em 15 espécies bacterianas subgingivais. Os resultados demonstraram que este antibiótico não foi efetivo para um grande espectro de microrganismos, e que não houve diferença entre os dois grupos nos parâmetros clínicos ou microbiológicos estudados. Portanto, os autores concluíram que o uso adjunto da doxiciclina sistêmica não levou a uma melhora significativa nos efeitos da RAR em indivíduos com DM 2 bem controlados.

Recentemente, BOTERO et al. (2013) avaliaram os efeitos clínicos e glicêmicos azitromicina sistêmica adjunta à RAR no tratamento de diabéticos não-controlados e observaram maiores reduções na PS no grupo que recebeu RAR e azitromicina, em comparação ao grupo que recebeu RAR e placebo.

Em 2003, Rodrigues et al. avaliaram por um período de 3 meses, os efeitos da RAR de boca total em sessão única associada ou não ao uso sistêmico de AMX/ácido clavulânico (875 mg) nos parâmetros clínicos de diabéticos tipo 2 com periodontite. Os resultados demonstraram que ambos os grupos apresentaram melhoras clínicas pós-terapias semelhantes.

1.7 MTZ e AMX sistêmicos como adjuntos à RAR em diabéticos tipo 2 com periodontite crônica

Após minuciosa revisão da literatura, foi possível observar que, até o presente momento, apenas um estudo (MIRANDA et al. 2014) realizado pelo grupo de pesquisa

da Universidade Guarulhos testou os efeitos da combinação antibiótica de MTZ (400 mg /3x dia) + AMX (500 mg /3 x dia) por 14 dias adjunta à RAR em diabéticos tipo 2. Parâmetros clínicos periodontais foram avaliados em 3, 6 e 12 meses pós-terapias. Amostras de biofilme subgingival foram analisadas por meio do PCR em tempo real para 7 patógenos periodontais (*T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *E. nodatum*, *P. micra*, *F. nucleatum ssp.* e *P. intermedia*) no tempo inicial, 3 e 12 meses pós-terapias. De acordo com os resultados, todos os parâmetros clínicos e microbiológicos melhoram após ambos tratamentos. Entretanto, os indivíduos que receberam RAR + MTZ + AMX apresentaram maiores médias de redução de PS e ganho de inserção bem como menor número de sítios com PS \geq 5 mm e de indivíduos com \geq 9 sítios residuais comparado ao grupo que recebeu RAR + placebo em 12 meses. Além disso, o grupo RAR+MTZ+AMX apresentou ainda menores níveis e maiores reduções dos três membros do complexo vermelho, bem como de *E. nodatum* e *P. intermedia*. Logo, este estudo evidenciou que o uso adjuvante de MTZ + AMX melhorou significativamente os resultados clínicos e microbiológicos da RAR no tratamento da periodontite crônica em indivíduos portadores de DM tipo 2, em 1 ano.

Com o objetivo de avaliar se esses benefícios clínicos se sustentariam em longo prazo, o presente estudo consistiu em uma avaliação clínica destes mesmos indivíduos diabéticos por um período de 2 anos. Além disso, uma avaliação microbiológica mais detalhada de um espectro de 40 espécies bacterianas presentes no biofilme subgingival também foi realizada por meio do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Esses dados são de suma importância para a determinação do uso da associação de MTZ + AMX como adjunta à RAR como protocolo terapêutico de escolha para tratamento de diabéticos tipo 2.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo clínico, randomizado, placebo-controlado foi avaliar, por um período de 2 anos, os efeitos da combinação MTZ + AMX adjunta à RAR nos parâmetros clínicos periodontais e nas alterações dos níveis e proporções de 40 espécies bacterianas subgingivais em indivíduos com periodontite crônica e DM tipo 2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O Material e Métodos estão apresentados em detalhes no artigo científico, e no estudo precedente (Miranda et al. 2014). Porém, alguns aspectos que não foram incluídos no artigo científico estão descritos abaixo.

3.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela 1. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrinado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

Tabela 1. Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (Socransky et al., 1998; Socransky & Haffajee, 2002).

Espécies	Cepas	Espécies	Cepas
Complexo Azul		Complexo Laranja (cont.)	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>vincentii</i>	49256 ^a
<i>Actinomyces oris</i>	43146 ^a	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
Complexo Roxo		<i>Parvimonas micra</i>	33270 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
Complexo Amarelo		<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	Complexo Vermelho	
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	Outras Espécies	
Complexo Verde		<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>Aggregatibacter</i>	43718 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>actinomycetemcomitans a + b</i>	29523 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	4201 ^a
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	11827 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a		11828 ^a
Complexo Laranja		<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a	<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a		
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a		

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b Forsyth Institute

3.2. Isolamento do DNA e preparo das Sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500xg por 10 minutos. Em seguida, as cepas gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias gram-positivas foram lisadas em 150 μ L de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0).

O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 μ g do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994B, SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

3.3. Técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization* (SOCRANSKY et al. 1994, MESTNIK et al. 2010).

3.3.1. Preparo da membrana e colocação das amostras.

Este protocolo é para confecção de 1 membrana que permite a verificação de 28 amostras para a contagem de 40 espécies bacterianas para cada amostra:

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram primeiramente descongeladas e em seguida foram colocada as travas de segurança a fim de se evitar o extravasamento das amostras durante os procedimentos (Fig.1). Em seguida as amostras foram fervidas em banho-maria por 10 minutos (Fig.2) e neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5M (Fig.3) para lisar as células bacterianas e o DNA ficar suspenso na solução. O preparo do *Minislot 30* (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) foi feito com a colocação de 15 folhas de filtro medindo 15 X 15 cm, sendo que na última camada foi colocada uma membrana de nylon com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra- Fig. 6) para a adesão

do DNA dos microrganismos à membrana. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em cada uma das canaletas do *Minislot* 30 (Fig. 7) com movimentos firmes de vai e vem para que a amostra fosse distribuída uniformemente ao longo das canaletas. As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente (HAFFAJEE et al. 1997). A membrana foi removida do *Minislot* 30 após um período de 5 minutos para garantir a absorção completa das amostras (Fig. 8), e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min.



Figura 1- Colocação das travas de segurança nos tubos contendo as amostras



Figura 2- Fervura das amostras



Figura 3- Preparo do Acetato de Amônia.



Figura 4- Colocação dos filtros e da membrana no Minislot

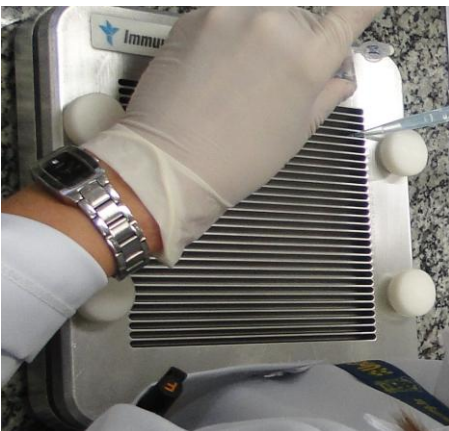


Figura 5- Colocação das amostras no Minislot

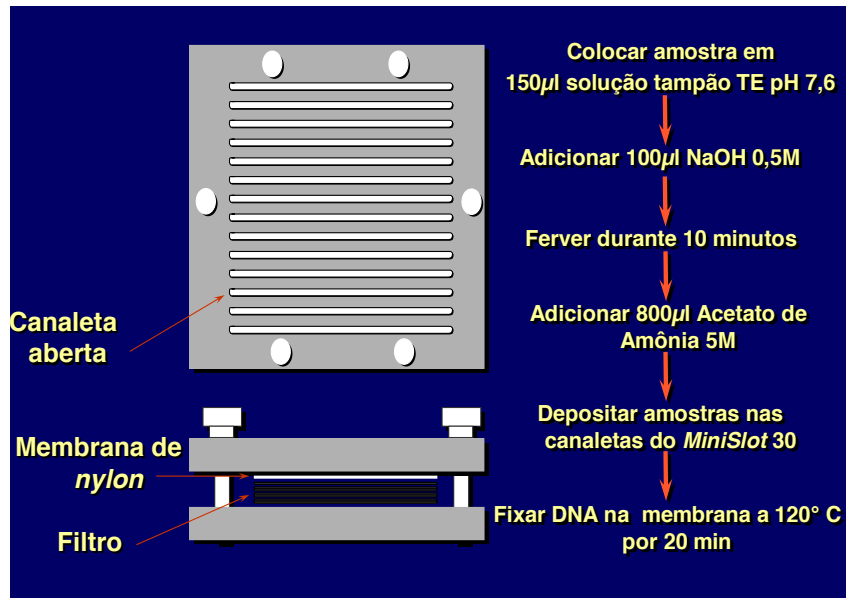


Figura 6. Representação gráfica do Minislot 30 e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon.

3.3.2. Hibridização da membrana com as sondas de DNA

A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) (1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0, 25mM de fosfato de sódio (Na₂HPO₄, Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA – Figura 9) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato, de forma que após a hibridização fique em formato de xadrez para que cada amostra cruze com as 40 espécies bacterianas e sejam sensibilizadas, justificando o nome de *checkerboard*. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente a 20 ng/mL, em 130 µL de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de Na₂HPO₄ (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. As concentrações foram ajustadas de forma que a intensidade de sinais ficasse semelhante à detecção de sinais de 10⁴ células bacterianas. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C (*overnight incubation*).

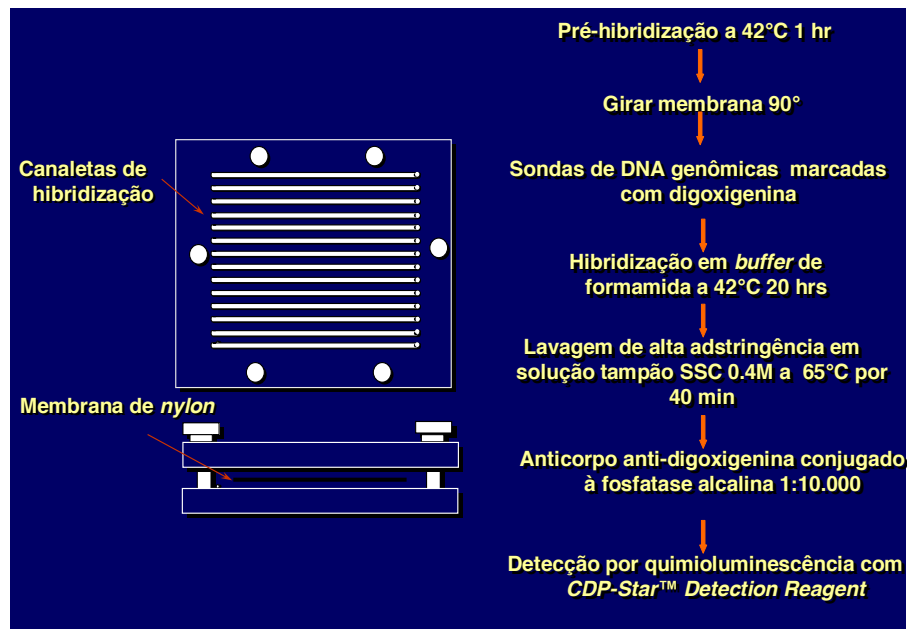


Figura 7. Representação gráfica do Miniblotter 45 e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival.

3.3.3. Lavagem

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetcs) e recebeu uma sequência de lavagens: a primeira lavagem foi realizada com uma solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na_2HPO_4 , por 40 minutos a 65°C (Fig.10), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. A segunda lavagem foi feita com uma solução 0,5 – 20 X SSC durante uma hora em estufa a 37°C durante 1 hora (Fig.11). Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0 (Fig. 12), e, logo após, por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

Para a detecção dos sinais a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star™ Detection Reagent* (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado (Figura 4) manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas a temperatura de 20°C.



Figura 8- Lavagem das membranas em banho-maria a 65°C



Figura 9 - Lavagem das membranas à 37°C com agitação



Figura 10 - Lavagem das membranas com agitação em temperatura ambiente

3.3.4. Detecção dos sinais

Para a detecção dos sinais a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star™ Detection Reagent* (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete (Chassi Radiográfico 30 x 40 cm; Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado (Figura 11) manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas a temperatura de 20°C.

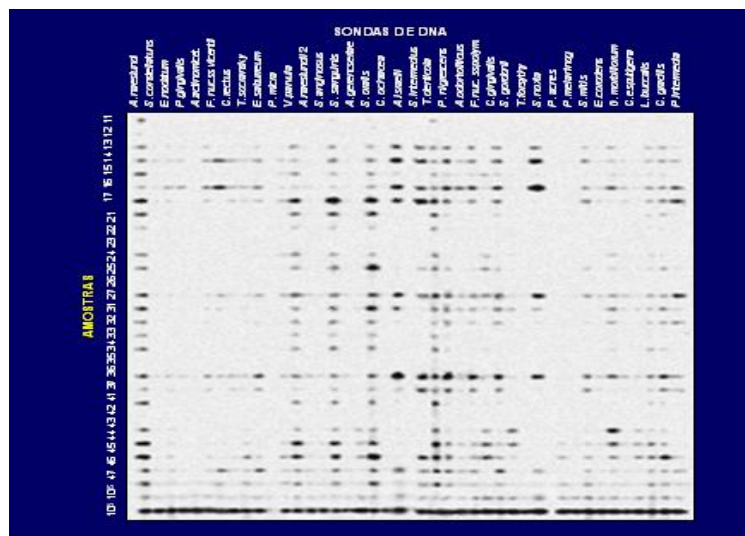


Figura 11. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA.

3.3.5. Leitura dos resultados

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado (I.Q.B.), calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10⁵ e 10⁶ bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1

equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a 10^5 células; 3 entre 10^5 e 10^6 células; 4 a aproximadamente 10^6 células e 5 mais de 10^6 células (Tabela 2). Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas.

Tabela 2. Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgingival.

ÍNDICE	NÍVEL DO MICRORGANISMO	CONTAGEM
0	Não detectado	0
1	Menos de 10^5 células	10.000
2	Aproximadamente 10^5 células	100.000
3	Entre 10^5 e 10^6 células	500.000
4	Aproximadamente 10^6 células	1.000.000
5	Mais de 10^6 células	10.000.000

4- ARTIGO CIENTÍFICO (*submetido ao Journal of Dental Research*)

Metronidazole and amoxicillin in treatment of type 2 diabetic subjects with periodontitis: 2-years clinical and microbiological results of a randomized placebo-controlled clinical trial

Running title: Antibiotics for diabetic subjects

Abstract

Aim: To assess clinical data up to 2 years and the changes occurring in the levels and proportions of 40 bacterial species of subjects with periodontitis and diabetes mellitus treated by scaling and root planning (SRP)-only or with metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX). **Methods:** 60 subjects were randomly assigned to receive SRP-only or with MTZ [400 mg/thrice a day (TID)] and AMX (500 mg/TID) for 14 days. Six subgingival plaque samples/subject were analyzed by checkerboard DNA–DNA hybridization at baseline, 3 months, 1 and 2 years post-therapy. **Results:** At 2 years, the antibiotic-treated group had lower mean number of sites with PD \geq 5 mm (3.5 ± 3.4 , $p < 0.05$) than the SRP-treated group (14.7 ± 13.1 , $p < 0.05$). 22% subjects in the control group and 76% in the test group reached the clinical endpoint for treatment, and MTZ+AMX intake was the only significant predictor of subjects achieving this endpoint at 2 years (odds ratio, 20.9; $p = 0.0000$). The test group had lower mean proportions (5.5%) of red complex pathogens than the control group (12.1%) at 2 years ($p < 0.05$). **Conclusion:** The adjunctive use of MTZ+AMX improves the clinical and microbiological outcomes of SRP in the treatment of subjects with generalized chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus.

Key-words: Periodontal disease; Metronidazole; Amoxicillin; Chronic periodontitis; Type II diabetes; Microbiology

Conflict of interest and source of funding statement- The authors declare that they have no conflict of interests. This study was supported by Research Grants #2011/14872-4; 2013/01072-5 from São Paulo State Research Foundation (FAPESP, São Paulo, SP, Brazil).

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: We have reported for the first time that the treatment of subjects with ChP and DM is improved by the adjunctive use of MTZ+AMX (Miranda et al. 2012). However, clinical data beyond 1 year of follow-up and on the effects of this treatment on the subgingival microbial profile are not available. Principal findings: The clinical benefits observed in the antibiotic-treated group at 1 year was maintained at 2 years, and these subjects showed lower mean counts and/or proportions of key periodontal pathogens at 2 years. Practical implications: The adjunctive use of MTZ+AMX offers a major benefit for the treatment of subjects with generalized ChP and DM and therefore, SRP+MTZ+AMX should be considered the first line treatment for these patients.

Introduction

Metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) as adjuncts to SRP have been pointed out as the most promising treatment for chronic and aggressive periodontitis (Guerrero et al. 2005, Xajigeorgiou et al. 2006, Mestnik et al. 2010, Cionca et al. 2009, Sgolastra et al. 2012 a,b, Zandbergen et al. 2013, Feres et al. 2015). Subjects taking from 7 to 14 days of this combination of antibiotics at the initial therapy show statistically and clinically significant benefits, over those observed in subjects treated by means of SRP alone, even at 1 or 2 years after the intake of these agents (Ehmke et al. 2005, Feres et al. 2012, Mestnik et al. 2012, Goodson et al. 2012). There is also a robust body of evidence indicating that the clinical benefits observed in systemically healthy subjects with periodontitis treated with adjunctive MTZ and AMX are accompanied by a striking change in the composition of the subgingival biofilm. This effect has been shown in subjects with chronic (Silva et al. 2011, Soares et al. 2014, Socransky et al. 2013, Feres et al. 2015) and aggressive periodontitis (Mestnik et al. 2010, Xajigeorgiou et al. 2006). The main benefits are greater reductions in the mean levels and proportions of known periodontal pathogens from the red complex, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* and the concomitant increase in the levels and proportions of host-compatible species, especially those from the genera *Actinomyces*.

In a preceding paper we have shown for the first time that subjects with periodontitis and type 2 Diabetes Mellitus (DM) also exhibit an important benefit from the adjunctive use of 14 days of MTZ and AMX in the active phase of the periodontal treatment (Miranda et al. 2014, ANEXO). In that study, the antibiotic-treated group

showed an average of 4 sites with PD \geq 5 mm at 1 year after treatment, as oppose to 14.9 in the group treated by mechanical debridement only. We were interested to determine if these clinical benefits observed in the group that took adjunctive antibiotics would be sustained over time, and to compare the changes occurring in the subgingival microbial profiles as a result of SRP alone or with MTZ+AMX in this group of subjects with generalized chronic periodontitis and diabetes mellitus.

Therefore, the aim of the present study was to assess the clinical data up to 2 years of follow-up and the changes occurring in the levels and proportions of 40 subgingival bacterial species of subjects with periodontitis and type 2 DM treated by means of SRP-only or combined with systemic MTZ and AMX. The hypothesis tested was that the significant clinical benefits obtained at 1 year post-treatment in the group treated with adjunctive antibiotics would be maintained over time, due to the formation of a new and stable biofilm climax community, compatible with health.

Material and Methods

Sample size calculation

This study is a 2 years longitudinal analysis of a randomized clinical trial (RTC) (Miranda et al. 2014, ANEXO) designed and powered to compare the clinical effects of SRP alone or with MTZ + AMX in subjects with type 2 diabetes mellitus and generalized chronic periodontitis at 1 year post-treatment. The ideal sample size to assure adequate power for this study was calculated considering a difference of at least four residual sites with probing depth (PD) \geq 5 mm between groups and assuming a standard deviation of five sites (Feres et al. 2012). It was determined that 24 subjects per group would be necessary to provide 80% power with an α of 0.05. Considering an attrition of about

15%, it was established that at least 29 subjects should be included in each treatment group.

Subject population, inclusion and exclusion criteria

Subjects with type 2 DM and generalized chronic periodontitis (Armitage 1999) were selected from the population referred to the Periodontal Clinic of Guarulhos University according to the criteria previously described (Miranda et al. 2014, ANEXO). In brief, the inclusion criteria were: ≥ 35 years of age, diagnosis of type 2 DM during at least the past 5 years, DM treatment with insulin supplementation, diet regime and/or oral hypoglycemic agents (metformin or glibenclamide), glycated hemoglobin (HbA1c) levels $\geq 6.5\% \leq 11\%$ according to the WHO (Albert & Zimmeti, 1998), at least 15 teeth (excluding third molars and teeth with advanced decay indicated for extraction), more than 30% of the sites with concomitant PD and clinical attachment level (CAL) ≥ 4 mm and a minimum of six teeth with at least one site with PD and CAL ≥ 5 mm and bleeding on probing (BoP) at baseline. The main exclusion criteria were: pregnancy, lactation, smoking, SRP in the previous 12 months, systemic antibiotic treatment in the previous 6 months, medical conditions requiring prophylactic antibiotic coverage, systemic conditions (except DM) that could affect the progression of periodontitis (e.g. immunological disorders, osteoporosis) and long-term administration of anti-inflammatory or immunosuppressive medications, allergy to MTZ and/or AMX. All subjects were informed of the nature, potential risks and benefits of their participation in the study and signed an informed consent form. Guarulhos University Clinical Research Ethics Committee approved the study protocol. The study was registered at the ClinicalTrials.gov database (#NCT02135952).

Experimental design, allocation concealment and treatment protocol

In this double-blinded, parallel-design, placebo-controlled RCT, each selected subject received a code number. The study coordinators (P.M.D. and M.Fe.) used a computer-generated table to randomly allocate subjects into one of the following groups: SRP + placebo (control; n = 30) or SRP + MTZ (400 mg thrice a day [TID] for 14 days) + AMX (500 mg TID for 14 days) (test; n = 30). Subjects in the control group received two placebo pills for 14 days. The antibiotics/placebos administration started immediately after the first session of SRP.

Initially, all subjects received supragingival plaque and calculus removal, exodontia, provisional restoration and filling overhang removal, as necessary. They were also instructed regarding brushing technique and received the same brand of toothpaste during the study (Colgate Total®, Colgate Palmolive Co., São Paulo, SP, Brazil). The two operators (N.S.T. and V.R.S.), both trained periodontists, performed SRP in four to six appointments lasting approximately 1 h each, using manual curettes (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) and ultrasonic device (Cavitron Select SPC, Dentsply professional, York, PA, USA) under local anesthesia. Periodontal therapy was completed in 14 days. The endpoint for each SRP appointment was “smoothness of the scaled roots,” which was checked by the coordinator (P.M.D). The same pharmacy (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda, Piracicaba, SP, Brazil) prepared the antibiotics and placebos. Identical plastic bottles containing the antibiotics and placebos were sent to the study coordinator (P.M.D), who marked the code number of each subject on each bottle, according to the therapy assigned. The coded bottles were given to the operators (N.S.T. and V.R.S.), who at no time during the study identified the contents of the bottle or subject assignment to therapies. The biostatistician (M.Fa.) and all participants were also blinded to treatment assignment. Code breaking was

performed after final statistical analysis. Periodontal maintenance was conducted at 3, 6, 9 months and 1 year and 2 years post-therapies.

Monitoring of compliance and adverse events

An assistant (S.S.M.) monitored the compliance to antibiotics/placebos intake by calling the patients 3 times a week during the 14 days of medication. The subjects were asked to bring the empty bottles back at the end of each week, which were checked for any possible remaining pills of antibiotics/placebos. On the 14th day, subjects answered a questionnaire, administered by the assistant (S.S.M.) about any self-perceived side effects of the medications.

Clinical monitoring

A single examiner (T.S.M.) performed all clinical examinations. After a calibration exercise, the standard error of measurement was calculated. Intra-examiner variability was 0.21 mm for PD and 0.24 mm for CAL. The agreement for categorical variables [e.g. BoP] was >85% (Kappa test). Visible plaque (presence/absence), marginal bleeding (presence/absence), BoP (presence/absence), suppuration (presence/absence), PD (mm) and CAL (mm) were assessed at six sites per tooth excluding third molars using the manual periodontal probe (North Carolina - Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). The examiner was blinded to the treatment allocation of the subjects.

Microbiological monitoring

Six subgingival biofilm samples per patient were collected from six non-contiguous interproximal sites at baseline, 3 months, 1 and 2 years post-therapies. After supragingival plaque removal, the subgingival biofilm was collected using individual sterile mini-Gracey curettes # 11/12 from two sites from each of the following baseline

PD category: shallow ($PD \leq 3$ mm), intermediate ($PD = 4-6$ mm) and deep ($PD \geq 7$ mm). The samples were placed in microtubes containing 0.15 ml of TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6). One hundred microliters of 0.5 M NaOH was added to each tube and the samples were dispersed using a vortex mixer. Counts of 40 bacterial species were determined in each sample, using the checkerboard DNA-DNA hybridization technique (Socransky et al. 1994, Mestnik et al. 2010) at the Laboratory of Microbiology of Guarulhos University.

Primary and secondary outcome variables

The primary outcome variable was the difference between groups for the mean number of sites with $PD \geq 5$ mm post-treatment (Feres et al. 2012). Secondary outcome variables were differences between groups for: number of subjects with low, moderate and high risk clinical profile for disease progression (and the OR for achieving low risk clinical profile), PD and CAL changes at moderate and deep sites, changes in number and percentage of sites with $PD \geq 5$ mm and ≥ 6 mm, full-mouth PD and CAL, full-mouth percentages of sites with plaque, gingival bleeding, BoP and suppuration, levels of the 40 bacterial species, proportions of microbial complexes and occurrence of adverse events.

Statistical Analysis

Clinical parameters were computed per subject and then across subjects in each group. The significance of differences between groups for age, duration of DM, number of teeth, mean PD and CAL and percentage of sites with plaque accumulation, gingival bleeding, bleeding on probing and suppuration was determined by Student's t-test. The

significance of differences for the clinical parameters over time was determined by repeated measures ANOVA and Tukey's multiple comparisons tests. Analysis of covariance (ANCOVA) adjusting for baseline values was used to detect differences between groups for the mean changes of PD, CAL and number/percentage of sites with $PD \geq 5$ mm and $PD \geq 6$ mm. Chi-square test was used to detect differences in the frequency of gender, number of subjects with low, moderate and high risk for disease progression. Fisher's exact test compared the frequency of subjects with adverse events between groups. A stepwise forward logistic regression analysis was performed in order to investigate the outcome variable: "presence of ≤ 4 sites with $PD \geq 5$ mm at 2 year post-therapy (yes/no)" and "absence of sites with $PD \geq 6$ mm at 2 years post-therapy (yes/no). The clinical predictor variables included age, gender, SRP, MTZ+AMX, and the following clinical characteristics at baseline: mean PD and CAL, number of sites with $PD \geq 5$ mm, percentage of sites with plaque, gingival inflammation, suppuration or BOP%.

For microbiological analyses, the samples were analyzed separately to determine their content of the 40 subgingival bacterial species described by Socransky et al. (1998). The mean values for each species were averaged within a subject and then across subjects in each group at each time point. The percentage of the DNA probe counts for each species was determined at each site, then averaged within a subject and then across subjects in each group at each time point. The mean proportion of each species was summed in order to determine the proportion of each microbial complex at each time points. The significance of differences over the course of the study for mean counts was determined using the Friedman test. Analysis of covariance (ANCOVA) adjusting for baseline mean values for each bacterial species was used to detect differences between groups for the mean changes between baseline and 2 years post-therapy. The significance of differences over the course of the study for the mean

proportions of the microbial complexes was determined using the Friedman test. The significance of differences between groups for the mean proportion of the microbial complex at each time point was determined using Mann-Whitney test. . All the microbiological analyses were adjusted for multiple comparisons (Socransky et al. 1991). The clinical and microbiological data were evaluated using intention-to-treat analysis with last observation carried forward. The level of significance was set at 5%.

Results

Subject retention, compliance and side effects

The study was conducted between September 2011 and March 2014. Figure 1 presents the flow diagram of the study design. Fifty-six subjects entered the study at baseline and 6 were lost up to 1 year of follow up (4 in the control group and 2 in the test group). Another 10 subjects from the control group and 7 from the test group did not return for the 2 years appointment. Patient compliance, adverse events and the clinical effects of therapies up to 1 year post-treatments were presented in Miranda et al. (2014)(Anexo). Since one of the aims of this study was to assess if the clinical benefits observed for the group receiving adjunctive MTZ+AMX were maintained at 2 years, the clinical results at 1 year (Miranda et al. 2014) were included in the Tables in order to facilitate the understanding of the data. Table 1 summarizes the demographic characteristics of the population studied, the adverse events reported at the last day of antibiotic/placebo intake (day 14) and mean full-mouth clinical parameters for both groups at baseline, 1 year and 2 years post-treatments. No statistically significant differences were observed between the two groups for any of these parameters at baseline or for the number of adverse event reported. The percentage of sites with BoP

and suppuration as well as the full-mouth mean PD were statistically significantly lower in the test group at 1 year and these differences were maintained at 2 years ($p < 0.05$).

Clinical results

The results for the mean number of sites with PD ≥ 5 mm (primary outcome variable) and PD ≥ 6 mm at 1 and 2 years, as well as the reductions in the mean number of these categories of deep sites are presented in Table 2. The population included in this study had an average of ~ 32 sites with PD ≥ 5 mm at the beginning of the study. At 1 year, the antibiotic group had significantly fewer of these sites than the control group, and this benefit was maintained up to 2 years (SRP = 14.7 ± 13.1 sites, SRP+MTZ+AMX = 3.5 ± 3.4 , $p < 0.05$). Table 3 presents the number and percentage of subjects achieving the clinical endpoint for treatment according to Feres et al. (2012), i.e., Low Risk for future disease progression (≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm). 75.9 % of the subjects treated by SRP+MTZ+AMX and 22.2% treated by SRP were in this clinical category at 2 years. The antibiotic-treated group also showed a greater reduction in mean PD and gain in mean clinical attachment (CA) at initially intermediate and deep sites ($p < 0.05$), in comparison with the group treated with SRP-only, at 1 and 2 years post-treatments (Supplementary file, Table S1).

Stepwise forward multiple linear regression showed that the adjunctive use of MTZ+AMX was the only variable that significantly increased the probability of a subject reaching the Low Risk profile for future disease progression at 2-year post-treatment (odds ratio, 20.9; $p = 0.0000$) and of not harboring any site with PD ≥ 6 mm at this time point (odds ratio, 14.3; $p = 0.0000$). The variables evaluated were the two main treatments used (SRP and MTZ + AMX), age, gender and the following characteristics

at baseline: mean PD and CAL, mean number of sites with PD 5 mm and PD 6mm, percentage of sites with plaque, gingival inflammation and suppuration or BoP.

Table 1 - Demographic characteristics of the study population, the number of adverse events reported and means (\pm SD) of full-mouth clinical parameters for both treatment groups at baseline, 1 year and 2 years post-treatments. 54

Variable	Time point	Treatment groups		p-value
		SRP + placebo (n = 27)	SRP + MTZ + AMX (n = 29)	
Gender (male/female)		18/9	12/17	0.06
Age (years)	Baseline	53.74 \pm 8.00	54.07 \pm 8.27	0.88
Duration of DM (years)		7.4 \pm 3.6	8.0 \pm 3.2	0.67
Number of teeth		19.8 \pm 2.3	20.8 \pm 4.2	0.28
Adverse effects				
Diarrhea (n)		3	7	0.21
Headache (n)	Last day of	1	4	0.18
Metallic taste (n)	antibiotic/placebo	2	4	0.27
Nausea/Vomiting (n)	intake (day 14)	2	5	0.27
Irritability (n)		0	0	>0.05
Glycemic parameters				
HbA1c (%)	Baseline	8.99 \pm 1.63	8.53 \pm 1.56	0.35
	1 year	8.40 \pm 1.94	8.77 \pm 2.93	0.62
FPG (mg/dl)	Baseline	158.95 \pm 41.48	151.55 \pm 31.76	0.51
	1 year	152.05 \pm 51.19	153.14 \pm 39.92	0.93
% of sites with				
Plaque accumulation	Baseline	76.60 \pm 22.20 ^a	77.80 \pm 21.00 ^a	0.84
	1 year	32.90 \pm 18.50 ^b	32.00 \pm 12.60 ^b	0.81
	2 years	32.90 \pm 22.00	32.90 \pm 13.60 ^b	0.99
Marginal bleeding	Baseline	33.6 \pm 14.3 ^a	44.0 \pm 15.0 ^a	0.41
	1 year	13.7 \pm 10.7 ^b	13.0 \pm 18.3 ^b	0.99
	2 years	0.9 \pm 01.3 ^b	1.8 \pm 03.1 ^b	0.14
Bleeding on probing	Baseline	34.20 \pm 15.90 ^a	40.70 \pm 14.00 ^a	0.11
	1 year	16.90 \pm 10.00 ^b	10.60 \pm 5.70 ^b	0.00
	2 years	15.40 \pm 10.50 ^b	10.00 \pm 6.60 ^b	0.02
Suppuration	Baseline	2.60 \pm 2.90 ^a	3.30 \pm 4.60 ^a	0.48
	1 year	1.20 \pm 1.40 ^b	0.20 \pm 0.60 ^b	0.00
	2 years	0.90 \pm 1.20 ^b	0.10 \pm 0.30 ^b	0.00
PD (mm)	Baseline	3.65 \pm 0.64 ^a	3.64 \pm 0.60 ^a	0.99
	1 year	2.93 \pm 0.61 ^b	2.53 \pm 0.22 ^b	0.00
	2 years	2.89 \pm 0.56 ^b	2.49 \pm 0.23 ^b	0.00
CAL (mm)	Baseline	4.59 \pm 0.86 ^a	4.59 \pm 1.24 ^a	0.99
	1 year	4.12 \pm 0.94 ^b	3.74 \pm 0.95 ^b	0.13
	2 years	4.06 \pm 0.94 ^b	3.69 \pm 0.98 ^b	0.15

SRP: scaling and root planing; MTZ: metronidazole; AMX: amoxicillin; DM: diabetes mellitus; PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; SD: standard deviation, HbA1c, glycated hemoglobin; FPG, fasting plasma glucose. The significance of differences between groups at Baseline, 1 and 2 years was assessed by the Student's t-test (*p-value) and over time by repeated measures ANOVA and Tukey's tests (different letters indicate p<0.05). The significance of differences between groups for gender was assessed by Chi-square and for adverse effects by Fisher's exact test.

Table 2 - Mean (\pm SD) number of sites with PD \geq 5 mm and PD \geq 6 mm at baseline, 1 year and 2 years post-treatments and mean (\pm SEM) reduction in these sites from baseline to 1 year and 2 years.

Variable	Time point	Treatment groups		p-value
		SRP + placebo (n = 27)	SRP + MTZ + AMX (n = 29)	
Number of sites with PD \geq 5mm	Baseline	33.37 \pm 16.81 ^a	32.24 \pm 18.68 ^a	0.81*
	1 year	14.92 \pm 13.20 ^b	4.00 \pm 3.39 ^b	0.00*
	2 years	14.74 \pm 13.18 ^b	3.51 \pm 3.39 ^b	0.00*
Reduction in the number of sites with PD \geq 5mm	Δ 0-1 year	17.97 \pm 1.77 ^b	28.68 \pm 1.70 ^b	0.00 [#]
	Δ 0-2 years	18.69 \pm 1.74 ^b	29.14 \pm 1.68 ^b	0.00 [#]
Number of sites with PD \geq 6 mm	Baseline	16.9 \pm 12.39 ^a	15.03 \pm 12.5 ^a	0.57*
	1 year	7.44 \pm 9.24 ^b	0.89 \pm 1.5 ^b	0.00*
	2 years	7.40 \pm 9.19 ^b	0.82 \pm 1.6 ^b	0.00*
Reduction in the number of sites with PD \geq 6mm	Δ 0-1 year	8.69 \pm 1.19	14.84 \pm 1.15	0.00 [#]
	Δ 0-2 years	10.49 \pm 1.16	14.85 \pm 1.12	0.00 [#]

SRP: scaling and root planing; MTZ: metronidazole; AMX: amoxicillin; PD: probing depth; SD: standard deviation, SEM: standard error of the mean. The significance of differences between groups at Baseline, 1 and 2 years was assessed by the Student's t-test (*p-value) and over time by repeated measures ANOVA and Tukey's tests (different letters indicate $p < 0.05$). The significance of differences between groups for the reduction of mean number of sites with PD \geq 5mm and PD \geq 6mm was assessed by ANCOVA adjusted for baseline values ([#]p-value).

Table 3 - Number and percentage of subjects presenting low (≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm), moderate (5-8 sites with PD ≥ 5 mm) or high (≥ 9 sites with PD ≥ 5 mm) risk for disease progression at 2-years post-therapies.

Variable	Categories	Treatment groups		p-value
		SRP + placebo (n = 27)	SRP + MTZ + AMX (n = 29)	
Risk for disease progression	Low risk	06 (22.3 %)	22 (75.8 %)	0.00
	Moderate risk	05 (18.5 %)	06 (20.6 %)	
	High risk	16 (59.2 %)	01 (3.6%)	

SRP: scaling and root planing; MTZ: metronidazole; AMX: amoxicillin; PD: probing depth. The significance of differences between groups was assessed by Chi-square test.

Table S1 - Mean (\pm SEM) of PD reduction, CAL gain and reduction in the number of sites with PD ≥ 5 mm and PD ≥ 6 mm from baseline to 1 year and 2 years.

Variable	PD category	Time point	Treatment groups		p-value
			SRP + placebo (n = 27)	SRP + MTZ + AMX (n=29)	
Reduction in PD	Initially moderate sites (PD 4-6 mm)	Δ 0-1 year	1.13 \pm 0.11	1.79 \pm 0.11	0.00
		Δ 0-2 years	1.19 \pm 0.10	1.89 \pm 0.10	0.00
	Initially deep sites (PD ≥ 7 mm)	Δ 0-1 year	2.30 \pm 0.29	3.90 \pm 0.30	0.00
		Δ 0-2 years	2.82 \pm 0.24	4.32 \pm 0.25	0.00
Gain in CA	Initially moderate sites (PD 4-6 mm)	Δ 0-1 year	0.77 \pm 0.10	1.36 \pm 0.10	0.00
		Δ 0-2 years	0.88 \pm 0.10	1.42 \pm 0.10	0.00
	Initially deep sites (PD ≥ 7 mm)	Δ 0-1 year	1.78 \pm 0.26	2.89 \pm 0.27	0.00
		Δ 0-2 years	2.39 \pm 0.25	3.35 \pm 0.26	0.00

SRP: scaling and root planing; MTZ: metronidazole; AMX: amoxicillin; PD: probing depth; CA: clinical attachment; SEM: standard error of the mean. The significance of differences between groups was assessed by analysis of covariance (ANCOVA) adjusting for baseline values ($p < 0.05$).

Microbiological results

The microbiological results are summarized in Figures 2, 3 and 4. Figure 2 shows the proportions of the microbial complexes over the course of the study. Five groups of microorganism (red, orange and green complexes, *Actinomyces* spp and the “others” group) were statistically significantly affected by SRP+MTZ+AMX over the course of the study, and 3 groups of microorganisms were affected by SRP (red and orange complexes and *Actinomyces* spp). The red complex represented ~17% of the 40 bacterial species evaluated at the beginning of the study in both groups. Both treatments led to a reduction in the proportion of this pathogenic complex at 3 months (SRP=7.6% and SRP+MTZ+AMX=5.3%). These proportions were maintained up to 2 years in the antibiotic-treated group (5.5.%), but in the control group it increased to 9.8% at 1 year and to 12.1% at 2 years. The difference between groups for the proportions of red complex at 2 years was statistically significant.

Figure 3 presents the changes occurring in the individual mean counts of the species evaluated over the course of the study and the reductions in the mean counts of each species between baseline and 2 years post-treatments. The mean levels of 2 species were statistically significantly altered in the control group, and of 9 species in the test group. The antibiotic-treated group had a statistically significant reduction in the levels of the three members of the red complex (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*) over the course of the study, as opposed to only two in the control group (*T. forsythia*, *P. gingivalis*). From baseline to 2 years post-treatment *T. forsythia* and *P. gingivalis* showed a greater reduction in levels in the test than in the control group ($p < 0.05$).

Figure 4 presents the same kind of data of Figure 2, mean proportions of the microbial complexes over the course of the study, but for subjects who were at Low Risk for future disease progression at 2 years post-treatment. The mean proportions of the *Actinomyces* species were statistically significantly affected by SRP over the course of the study, while the purple, orange and red complexes were affected by SRP+MTZ+AMX. At 2 years post-treatments the proportion of the red complex was statistically significantly lower in the antibiotic group (5.2%) in comparison to the control group (10.6%). The mean average of sites with PD \geq 5 mm in these subsets of subjects of the control and test groups were, respectively, 23.5 and 29.6 at baseline and 2.0 and 1.7 at 2 years.

Supplementary Tables S2 and S3 present, respectively, the mean levels and proportions of the bacterial species that differed significantly between the two groups post-therapy. *P. gingivalis* were statistically significantly lower in levels and proportions in the antibiotic group at all time points.

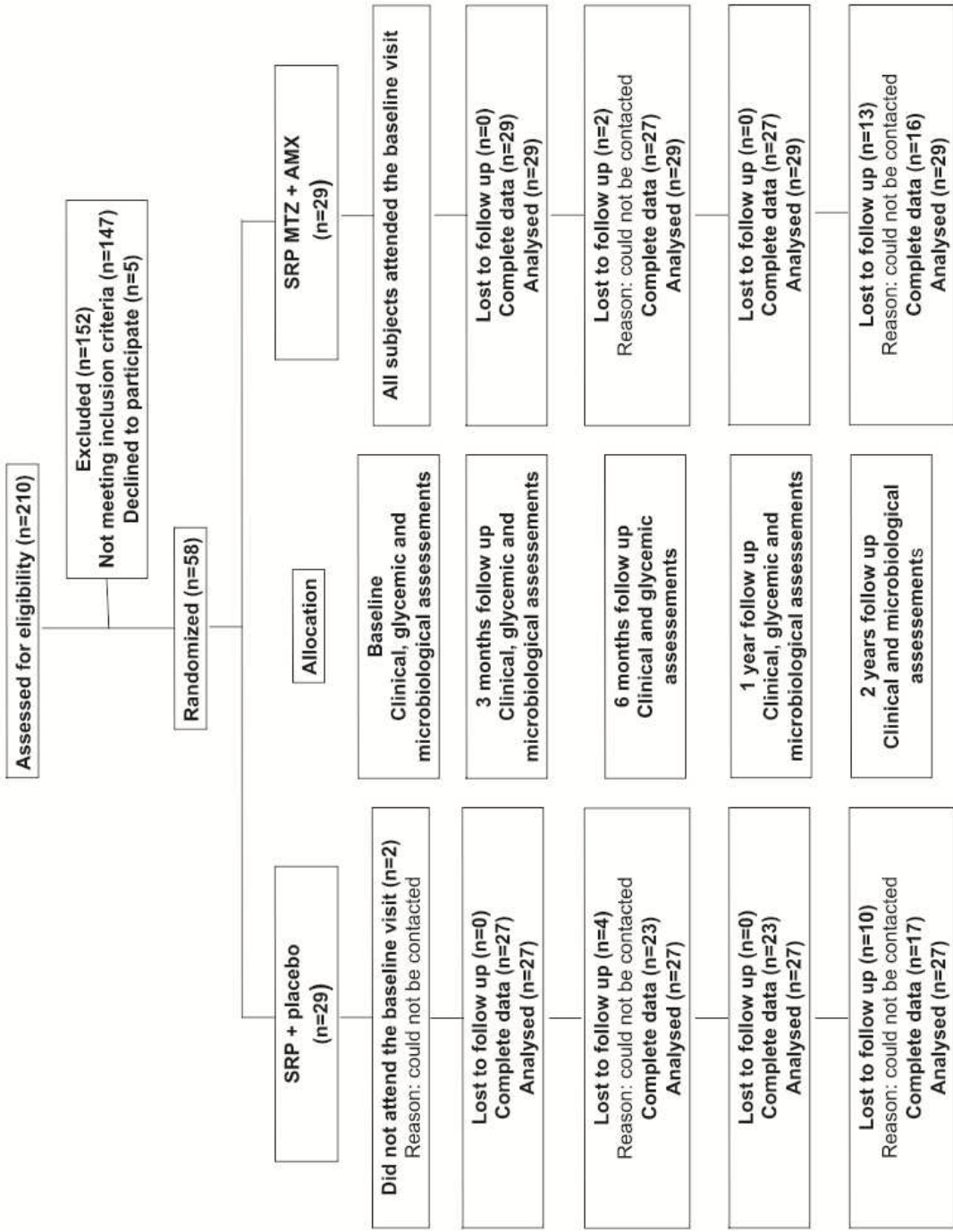


Figure 1- Flow chart of the study design

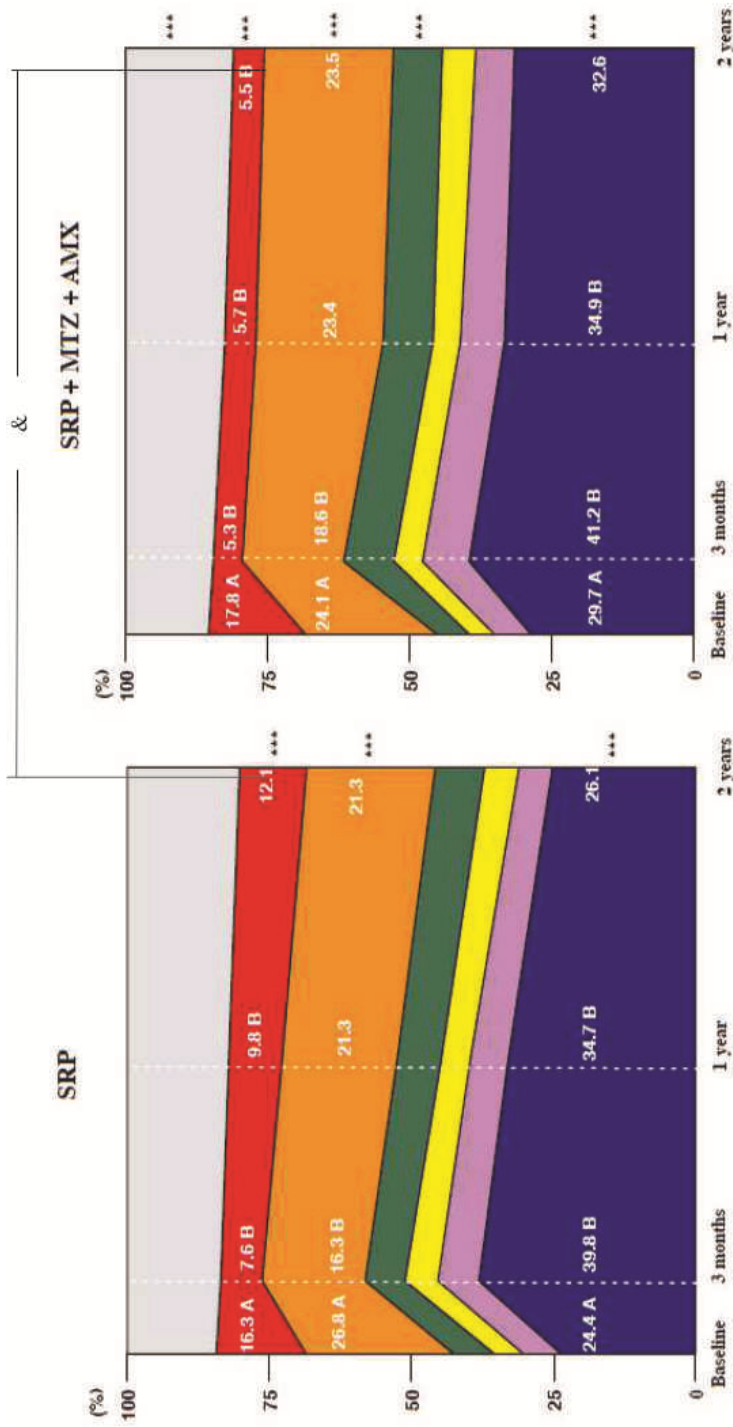


Figure 2- Cumulative mean proportions of microbial complexes in subgingival biofilm samples taken from subjects at baseline and at 3 months, 1 and 2 years post-treatments. The samples were analyzed separately to determine their content of 40 subgingival bacterial species. The colors represent the different complexes described by Socransky et al. (1998.) The grey color represents species that did not fall into any complex and *Actinomyces* spp. are represented in blue. The significance of differences among time points was determined using repeated-measures analysis of variance (ANCOVA) (***) $p < 0.0001$), adjusted for mean age and gender; and Turkey's multiple comparison tests (different letter represent significant differences between time points, $p < 0.05$). The significance of differences between the two groups at 2 years was determined by T-test Mann-Whitney (&, $p < 0.001$ for the proportions of red complex). SRP, scaling and root planning, MTZ, metronidazole, AMX, amoxicillin.

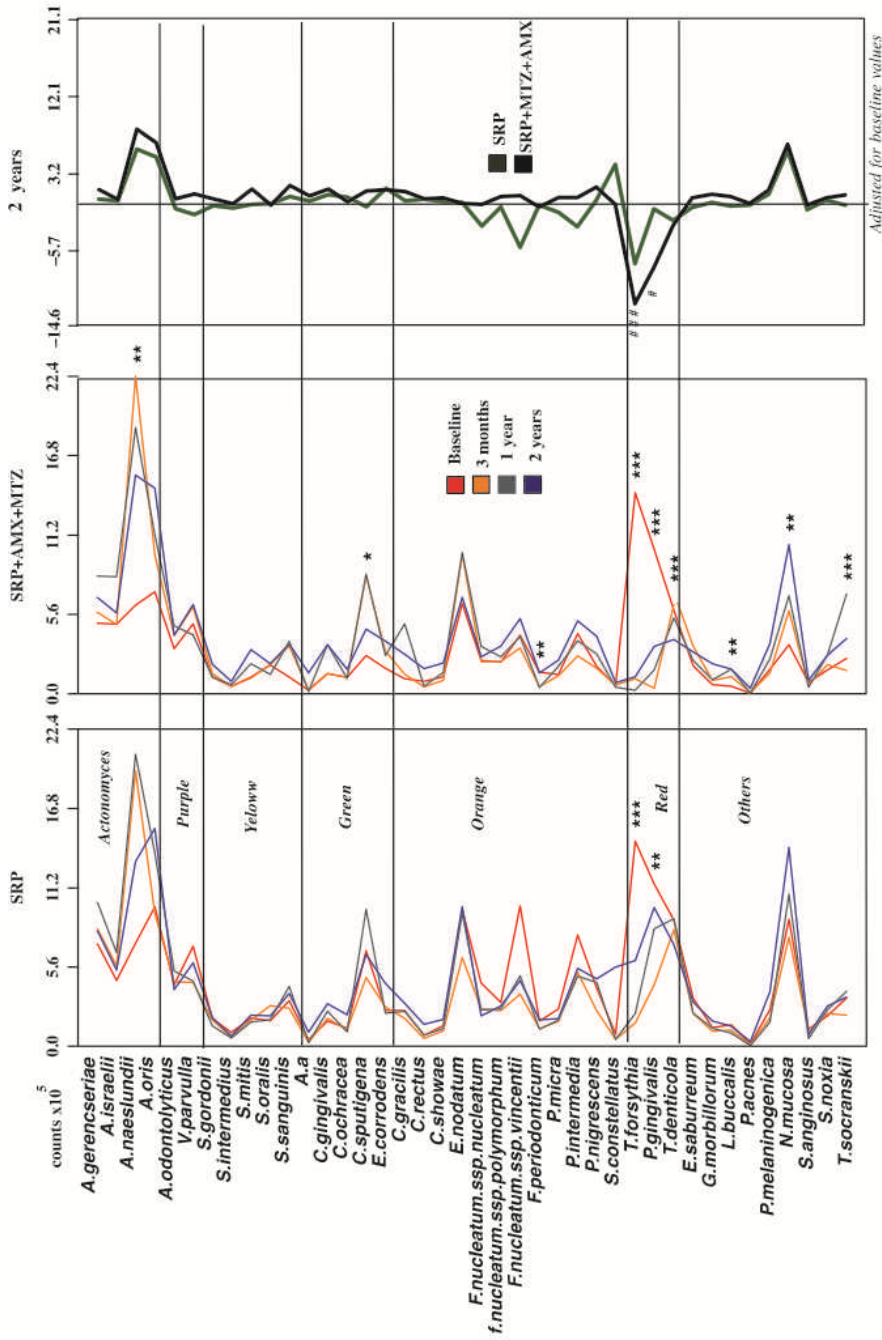


Figure 3 - Profiles of the mean counts (x10⁵) of 40 taxa in subgingival biofilm samples, at baseline and at 3 months, 1 and 2 years post-treatments. The panel at the far right presents the reductions in the mean counts of each species between baseline and 2 years post-treatments. Subgingival biofilm samples were taken from each subject at each time point and were analyzed separately to determine their content of 40 species of bacteria, ordered and grouped according to the microbial complexes described by Socransky et al. (1998). The mean values for each species were averaged within a subject and then across subjects in each group at each time point. The significance of differences among time-points was determined using Friedman test ($p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$) and between groups at 2 years using the Mann-Whitney ANCOVA U-test (# $p < 0.05$, ### $p < 0.0001$). All the analyses were adjusted for multiple comparisons (Socransky et al. 1991). SRP, scaling and root planning, MTZ, metronidazol, AMX, amoxicillin.

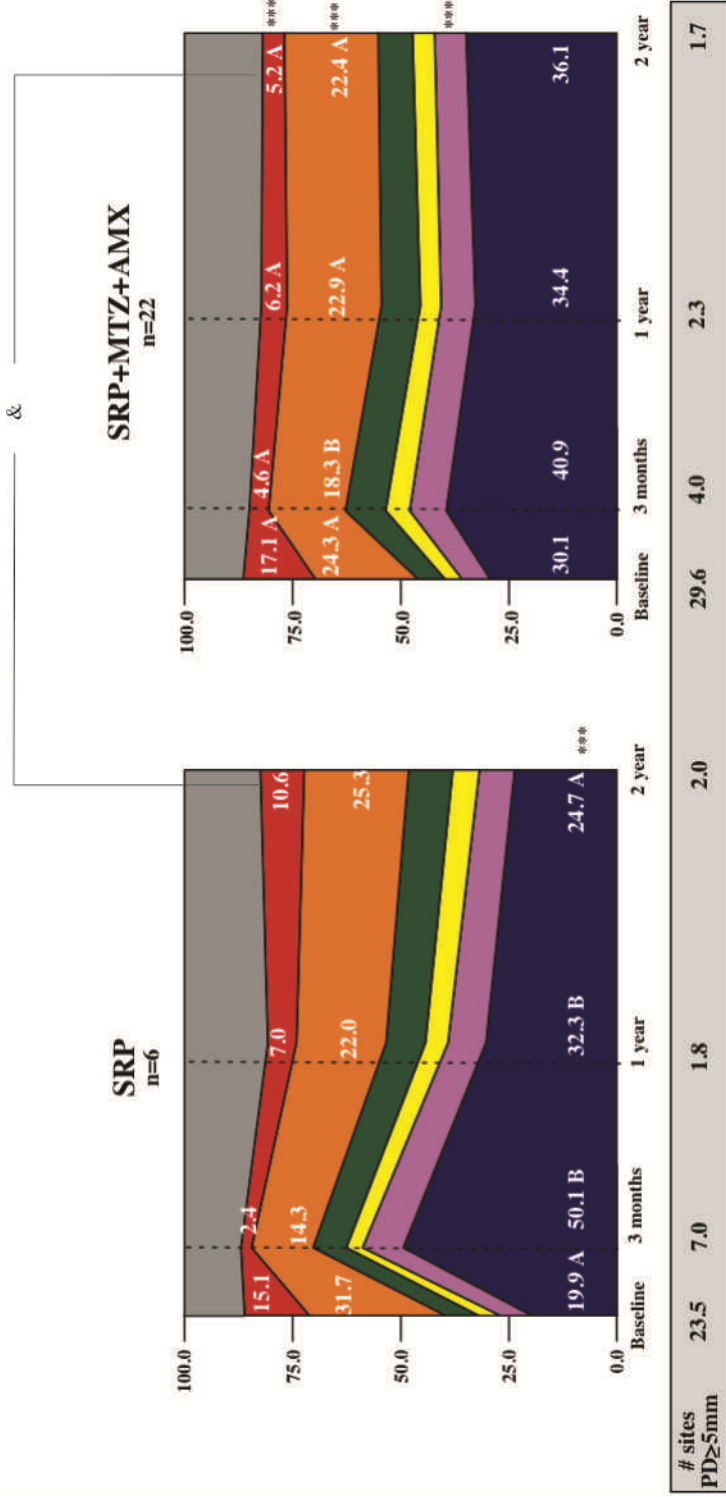


Figure 4— Cumulative mean proportions of microbial complexes in subgingival biofilm samples taken from subjects in the Low Risk profiles category for future disease progression (Lang & Tonetti 2003) at 2 years post-treatments (i.e. with ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm). The colors represent the different complexes described by Socransky et al. (1998). The grey color represent species that did not fall into any complex and *Actinomyces* spp. are represented in blue. The significance of differences among time points was determined using repeated-measures analysis of variance (ANCOVA) ($***p < 0.0001$), adjusted for mean age and gender; and Turkey's multiple comparison tests (different letter represent significant differences between time points, $p < 0.05$). The significance of differences between the two groups at 2 years was determined by T-test Mann-Whitney (&, $p < 0.001$ for the proportions of red complex). SRP, scaling and root planning, MTZ, metronidazole, AMX, amoxicillin.

Table S2 - Mean counts ($\times 10^5$) (\pm SD) of the bacterial species that differed significantly between the two groups post-therapy

Bacterial species	Time point	Treatment groups		P value T-test
		SRP	SRP+MTZ+AMX	
<i>F. periodonticum</i>	Baseline	1.79 \pm 1.88	1.52 \pm 2.03	>0.05
	3 months	1.26 \pm 1.68	0.52 \pm 0.98	0.047
	1 year	1.19 \pm 1.70	0.43 \pm 0.95	0.042
<i>P. gingivalis</i>	Baseline	11.46 \pm 11.1	10.21 \pm 10.86	>0.05
	3 months	4.36 \pm 8.28	0.40 \pm 0.97	0.013
	1 year	8.31 \pm 14.70	1.65 \pm 4.31	0.023
	2 years	9.80 \pm 11.83	3.37 \pm 5.48	0.010
<i>S. constellatus</i>	Baseline	0.85 \pm 1.35	0.59 \pm 0.79	>0.05
	2 years	5.59 \pm 9.07	0.80 \pm 1.14	0.006
<i>T. forsythia</i>	Baseline	8.92 \pm 20.48	14.47 \pm 12.85	>0.05
	2 years	6.05 \pm 7.31	1.20 \pm 1.72	0,001

Table S3 - Mean proportions (\pm SD) of the bacterial species that differed significantly between the two groups post-therapy

Bacterial species	Time point	Treatment groups		P value T-test
		SRP	SRP+MTZ+AMX	
<i>F. periodonticum</i>	Baseline	1.27 \pm 0.00	1.21 \pm 0.00	>0.05
	3 months	0.88 \pm 1.02	0.46 \pm 0.84	0,096
	1 year	0.99 \pm 1.93	0.24 \pm 0.39	0,049
<i>P. gingivalis</i>	Baseline	6.44 \pm 0.00	6.26 \pm 0.00	>0.05
	3 months	2.01 \pm 2.65	0.22 \pm 0.40	0.000
	1 year	3.84 \pm 6.55	0.86 \pm 2.41	0,025
	2 years	5.39 \pm 4.67	1.28 \pm 1.72	0
<i>T. forsythia</i>	Baseline	6.67 \pm 0.00	7.61 \pm 0.00	>0.05
	1 year	0.96 \pm 1.93	0.14 \pm 0.32	0,029
	2 years	2.98 \pm 3.56	0.83 \pm 1.17	0,003
<i>T. socranskii</i>	Baseline	1.88 \pm 0.00	1.73 \pm 0.00	>0.05
	1 year	2.35 \pm 1.62	3.60 \pm 2.39	0,027
<i>S. mitis</i>	Baseline	1.10 \pm 0.00	0.89 \pm 0.00	>0.05
	3 months	1.28 \pm 1.084	0.77 \pm 0.67	0,04
<i>S. anginosus</i>	Baseline	0.53 \pm 0.00	0.61 \pm 0.00	>0.05
	3 months	0.65 \pm 0.74	0.29 \pm 0.33	0.024
<i>S. constellatus</i>	Baseline	0.39 \pm 0.00	0.45 \pm 0.00	>0.05
	2 years	2.28 \pm 3.63	0.35 \pm 0.40	0.006

Discussion

This manuscript presents the clinical effects at 2 years after the adjunctive use of MTZ+AMX to SRP at the active phase of periodontal treatment of subjects with chronic periodontitis and type 2 DM, as well as the changes occurring in the subgingival microbial composition with the use of these antibiotics. The results indicated that the clinical benefits observed with the use of SRP+MTZ+AMX at 1 year (Miranda et al. 2014) were maintained at 2 year post-treatment. This therapeutic protocol was also more effective than SRP-only in changing the composition of the subgingival microbial biofilm towards a community more compatible with periodontal health.

The mean number of sites with PD \geq 5 mm (primary outcome variable) differed substantially between groups after treatment. The group treated with adjunctive antibiotic had an average of 3.51 of these sites at 2 year post-therapy against 14.74 in the control group ($p < 0.05$), an average of 10 more residual sites in the group that did not take antibiotic at the initial therapy. This advantage in terms of fewer residual sites with PD \geq 5 mm in the antibiotic group had been observed at 3 months post-therapy (Miranda et al. 2014) and was maintained up to 2 years. A very similar benefit has been previously reported in a group of non-diabetic individuals with chronic periodontitis at 1 year of follow-up (Feres et al. 2012). The adjunctive antibiotics were also more effective than SRP in improving most of the other clinical parameters evaluated at 2 years, including the mean number of sites with PD \geq 6 mm and the reduction in the number of the residual sites (Table 2), as well as the mean reduction in PD and gain in CA at initially intermediate and deep sites (Table S1). Interestingly, 76% of the subjects in the antibiotic group reached the clinical endpoint for treatment according to Feres et al. (2012), i.e., Low Risk for future disease progression (≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm) at 1 year

post-therapy (Miranda et al. 2014) and this number stayed fully stable at 2 years. On the other hand, only 22% of the subjects treated by SRP achieved/maintained this clinical endpoint at 2 years post-therapy (Table 3). In addition, MTZ+AMX intake was the only significant predictor for subjects achieving the Low Risk clinical profile for future disease progression at 2 years (odds ratio, 20.9; $p = 0.0000$). Not even parameters associated with the degree of periodontal destruction at baseline, such as mean PD and CAL or the number of sites with $PD \geq 5$ mm interfered with the chances of a subject reaching/maintaining this profile at 2 years.

One could consider the long lasting clinical stability observed in the antibiotic-treated group a quite surprising result, considering that the only difference between test and control groups was the intake of two weeks of MTZ+AMX 2 years before. One hypothesis that we have raised to explain this result is that the antibiotic treatment would favor the establishment of a new and stable biofilm climax community compatible with periodontal health, which would be rather difficult to be disrupted. The evaluation of the microbiological results of the present study would help to test this hypothesis. The antibiotic group exhibited lower levels (Figure S1) and a greater reduction in the mean levels of the three red complex pathogens (*T. forsythia* and *P. gingivalis* and *T. denticola*) at 2 years post-treatment (Figure 3), in comparison to the SRP group. These results are in accord with those reported in Miranda et al. (2014) by Real time PCR. In that paper we showed that the levels of the three red complex species were reduced in the antibiotic groups at 1 year. The results of the present study confirmed these data and showed that this benefit was maintained up to 2 years.

It has been largely recognized that the clinical stability of the periodontal tissues is dependent not only on the reduction in the levels of certain periodontal pathogens but also in the proportions of these species and the concomitant increase in the

levels/proportions of host-compatible microorganisms (Socransky & Haffajee, 1997, Socransky et al. 1988a,b, Teles et al. 2006). The 40 bacterial species from the microbial complexes described by Socransky et al. (1998) have been successful being used by our and other groups of investigators as a biological marker in studies of the diagnostic and treatment of different forms of periodontitis (Feres et al. 2001, Faveri et al. 2008, Matarazzo et al. 2008, Silva et al. 2011, Mestnik et al. 2010, Haffajee et al. 2008, Soares et al. 2014, Socransky et al. 2013). In the present study, the levels of two microorganisms compatible with periodontal health, *Actinomyces naeslundii* and *Capnocytophaga sputigena* were elevated post-therapy in the antibiotic-treated group, while no statistically significant differences were observed in the control group for the levels of beneficial species (Figure 3). In terms of proportions of the 40 microorganisms evaluated, both treatments led to a statistically significant decrease of the red and orange complexes and an increase in the *Actinomyces* species at 3 months (Figure 2). The proportions of the red complex species remained totally stable in the test group from 3 months to 2 years (~5%), while a slow and constant recolonization was observed in the control group, where these pathogens rose from 7% to 12% between 3 months and 2 years post-therapy. In previous studies of non-diabetic subjects with chronic or aggressive periodontitis, we have detected instability of the periodontal attachment when the red complex accounts for more than 10% of the 40 bacterial species evaluated in the present study (Mestnik et al. 2010, Silva et al. 2011, Soares et al. 2014, Feres et al. 2015). Interestingly, this same trend of recolonization with pathogens was observed in subjects who reached the Low Risk profile for future disease progression in the control group (Figure 4), what may indicate that even those subjects who achieved the clinical endpoint for treatment at 3 months could be in greater risk for future attachment loss if they had not been treated with adjunctive MTZ+AMX at the initial therapy.

Apparently, the benefits in the composition of the microbiota observed in the antibiotic group at 3 months post-treatment, mostly in the reduction of levels and proportions of red complex pathogens and in the increase of a few host-compatible microorganisms, led to a stable biofilm climax community more compatible with periodontal health in the long-term. One could question why a difference in only a small subset of the subgingival community would lead to such consistent differences in the clinical outcomes and on the long-term stability of the subgingival biofilm, including in preventing the recolonization of red complex pathogens up to 2 years post-treatments. One hypothesis is that MTZ+AMX would affect key members of the biofilm community, such as *P. gingivalis*, which was virtually eliminated in the antibiotic group at 3 months (Figure S1). This pathogen has been pointed out as “keystone pathogens”, microorganisms that have the capacity to evade host response and mediate the subgingival biofilm community’s conversion into dysbiosis, leading to periodontal breakdown (Hajisengallis et al., 2012, Hajishengallis & Lamont, 2012). Possibly, the striking reduction of *P. gingivalis* by SRP+MTZ+AMX, and the concomitant recolonization of the recently scaled pockets by beneficial species led to a stable and beneficial new climax community more compatible with health, which is rather stable and difficult to disturb, and would enable the long-term stability of the periodontium (Feres et al., 2015). Alternatively, the antibiotics might have affected other species that are not being identified by these 40 DNA probes. Recent studies have suggested that newly identified pathogens might be associated with the onset and progression of periodontal disease in systemically healthy (Pérez-Chaparro et al., 2014) or diabetic (Casarin et al., 2013, Zhou et al., 2013) individuals.

The current study has some limitations. It presents secondary microbiological and clinical analyzes from a RCTs designed and powered to observe clinical differences

between groups at 1 year. In addition, around one third of the subjects were lost between 1 and 2 years evaluations. Thus, although intention to treat analysis was used, only two thirds of the initial population provided full data at 2 years. The main strengths of this study is to be the first RCT to provide clinical and microbiological data up to 2 years of follow up for subjects with chronic periodontitis and type 2 DM treated by means of SRP+MTZ+AMX.

In conclusion, the data of the present investigation indicate that 14 days of adjunctive use of MTZ+AMX at the active phase of periodontal treatment improves the clinical and microbiological outcomes of SRP in the treatment of subjects with generalized chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus, up to 2 years post-treatment.

References

- Albert, K.G., Zimmet, P.Z. (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15, 539-53.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal disease and conditions. *Annals of Periodontology* 4, 1-6.
- Casarin, R. C. V., Barbagallo, A., Meulman, T., Santos, V. R., Sallum, E. A., Nociti, F. H., Duarte, P. M., Casati, M. Z., Gonçalves, R.B. (2013) Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 48, 30-36
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A.(2009) Amoxicilin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planning of chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* 80, 364-71.

- Ehmke, B., Moter, A., Beikler, T., Milian, E. & Flemmig, T. F. (2005) Adjunctive antimicrobial therapy of periodontitis: long term effects on disease progression and oral colonization. *Journal of Periodontology* **76**, 749-759.
- Feres, M., Soares, G. M. S., Mendes, J. A. V., Silva M. P., Faveri, M., Teles, R., Socransky, S. S. & Figueiredo, L. C. (2012) Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 1149-1158.
- Feres, M., Figueiredo, L.C., Soares, G. M. S. and Faveri, M. (2015) Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontology 2000* **67**: 131-186.
- Gaikward, S. P., Gurav, A . N., Shete, A . R. & Desarda, H.M. (2013) Effect of scaling and root planning combined with systemic doxycycline therapy on glycemic control in diabetes mellitus subjects with chronic generalized periodontitis:a clinical study. *Journal of Periodontal & Implant Science* **43**:79-86.
- Gilowski, L., Kondzielnik, P., Wiench, R., Plocica, I., Strojek, K., Krzeminski, T. F. (2012) Efficacy of short-term adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in diabetic patients-randomized study. *Oral Disease* **18**, 763-770.
- Goodson, J. M., Haffajje, A. D., Socransky, S. S., Kent, R., Teles, R., Hasturk, H., Borgren, A., van Dyke, T., Wennstrom, J., Lindhe, J. (2012) Control of periodontal infections: a randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 526-36.
- Grossi, S. G., Skrepcinski, F. B., De Caro, T., Robertson, D. C., Ho, A . W., Dunford, R. G. & Genco, R. J. (1997) Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *Journal of Periodontology* **68**, 713-719.
- Guerrero, A., Griffiths, G.S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D.R., Laurell, L., Tonetti, M.S. (2005) Adjunctive benefits od systemic amoxicilin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1096-107.

- Haffajee, A. D., Patel, M., Socransky, S. S., (2008). Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **23**, 148-57.
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., Curtis, M. A. (2012) The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* **10**, 717-725.
- Hajishengallis, G., Lamont, R. J. (2012) Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* **27**, 409-419.
- Lang, N.P. & Tonetti, M.S. (2003) Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health & Preventive Dentistry* **1**, 7-16.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Lira, E. A. G. & Faveri, M. (2010) Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 353–365.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Soares, G., Fermiano, D., Duarte, P. M. & Faveri, M. (2012) The effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 955-61.
- Miranda, T. S., Feres, M., Perez-Chaparro, P. J., Faveri, M., Figueiredo, L.C., Tamashiro, N. S., Bastos, M. F. & Duarte, P. M. (2014) Metronidazole and amoxicillin as adjuncts to scaling and root planing for the treatment of type 2 diabetic subjects with periodontitis: 1-year outcomes of a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **41**, 890-899.
- Al-Nowaiser, A. M., Al-Zoman, H., Baskaradoss, J., Robert, A. A., Al-Zoman, K. H., Al-Sohail, A., Al-Suwayed, A. S., Ciancio, S.G. & Al-Mubarak, A. (2014) Evaluation of adjunctive systemic doxycycline with non-surgical periodontal therapy within type 2 diabetic patients. *Saudi Med Journal* **35**, 1203-1209.
- Pérez-Chaparro, P. J., Gonçalves, C., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Lobão, E., Tamashiro, N., Duarte, P. Feres, M. (2014) Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systemic review. *Journal of Dental Research* **20**, 1-13.

- Promsudthi, A., Pimapansri, S., Deerochanawong, C., Kanchanavasita, W. (2005) The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. *Oral Diseases* **11**, 293-298.
- Sgolastra, F., Petrucci, A., Gatto, R., Giannoni, M. & Monaco, A. (2011) Long-term efficacy of subantimicrobial-dose doxycycline as an adjunctive treatment to scaling and root planing: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology* **82**: 1570-1581.
- Sgolastra, F., Petrucci, A., Gatto, R. & Monaco, A. (2012a) Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology* **83**, 731-743.
- Sgolastra, F., Gatto, R., Petrucci, A. & Monaco, A. (2012b) Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology* **83**, 1257-1269.
- Silva, M. P., Feres, M., Siroto, T. A., Soares, G. M., Mendes, J. A., Favari, M. & Figueiredo, L. C. (2011) Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, **38**, 828-837.
- Soares, G. M. S., Mendes, J. A. V., Silva, M. P., Favari, M., Teles, R., Socransky, S. S., Wang, X., Figueiredo, L. C. & Feres, M. (2014) Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical Trial. *Journal of Clinical Periodontology*, **41**, 366-76.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D. (1997) The nature of periodontal diseases. *Annals of Periodontology* **2**, 3-10.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent Jr, R. L. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**(2), 134-144.

- Socransky, S. S., Haffajee, A.D., Dzink, J. L., Hilman, J.D. (1988a) Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol Immunol* **3**,1-7.
- Socransky, S.S., Haffajee, A. D., Dzink, J.L. (1988b) Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *Journal of Clinical of Periodontology* **15**, 440-444.
- Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994) Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* **17**(4),788-792.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C., Dibart, S. (1991) relation od counts of microbial species to clinical status at sample site. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 766-775.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Teles, R., Wennstrom, J. L., Lindhe, J., Bogren, A., Hasturk, H., van Dyke, T., Wang, X. & Goodson, J.M. (2013) Effects of periodontal therapy on the subgingival microbiota over 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 771-780.
- Teles, R. P., Haffajees, A.D., Socransky, S. S. (2006) Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000* **42**, 180-218.
- Tsalikis, L., Sakellari, D., Dagalis, P., Boura, P., Konstantinidis, A .(2014) Effects of doxycycline on clinical, microbiological and immunological parameters in well-controlled diabetes type-2 patients with periodontal disease: a randomized, controlled clinical Trial. *Journal of Clinical Periodontology* **41**, 972-980.
- Xajigeorgiou, C., Sakellari, D., Slini, T., Baka, A., Konstantinidis, A. (2006) Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 254-64.– Flow chart of the Study design
- Zandbergen, D., Slot, D. E., Cobb, C. M. & Van der Weijden, F. A. (2013) The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *Journal of Periodontology* **84**, 332-351.

Zhou, M., Rong, R., Zhu, C., Gao, X., Zhang, Q., Dong, Q. (2013) Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16SrDNA pyrosequencing. *PLos One*. **8**, 1-8.

REFERÊNCIAS

Abu-Fanas SH, Drucker DB, Hull PS, Reeder JC, Ganguli LA. Identification and susceptibility to seven antimicrobial agents, of 61 gram-negative anaerobic rods from periodontal pockets. *J Dent.* 1991 Feb; 19 (1): 46-50.

Alba-Loureiro TC, Munhoz CD, Martins JO. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40: 1037-44.

Aemaimanan P, Amimanan P, Taweechaisupapong S. Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis. *Anaerobe.* 2013 Aug; 22: 64-8.

Aimetti M, Romano F, Guzzi N, Carnevale G. Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2012; **39**:284-294.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013 Jan; 36 Suppl 1: S67-74.

Berglundh T, Krok L, Liljenberg B, Westfelt E, Serino G, Lindhe, J. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease A prospective, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 1998 May;25(5):354-62.

Botero JE, Yepes FL, Ochoa SP, Hincapie JP, Roldan N, Ospina CA, Castrillon CA, Becerra MA. Effects of periodontal non-surgical therapy plus azithromycin on glycemic control in patients with diabetes: a randomized clinical trial. *J Periodontal Res.* 2013 Dec; 48 (6): 706-12.

Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol.* 2005 Mar; 76 (3): 418-25.

Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Gonçalves C, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II--microbiological results. *J Clin Periodontol.* 2005 Apr; 32 (4): 406-11.

Carvallho LH, D'Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population: I. Clinical results. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 1017-76.

Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, Duarte PM, Casati MZ, Gonçalves RB. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013 Feb; 48 (1): 30-6.

Casarin RC, Saito D, Santos VR, Pimentel SP, Duarte PM, Casati MZ, Gonçalves RB. Detection of *Mogibacterium timidum* in subgingival biofilm of aggressive and non-diabetic and diabetic chronic periodontitis patients. *Braz J Microbiol.* 2012 Jul;43(3):931-7.

Chapple IL, Matthews JB. the role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000.* 2007; 43, 160-232.

Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombelli A. Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009 Mar; 80 (3): 364-71.

Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005 Aug; 32 (8): 860-6.

Demmer RT, Desvarieux M, Holtfreter B. Periodontal status and A1C change: longitudinal results from the study of health in Pomeranis (SHIP). *Diab Care.* 2010; 33:1037-43.

Deo V, Gupta S, Bhongade ML, Jaiswal R. Evaluation of subantimicrobial dose doxycycline as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis patients with diabetes: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Contemp Dent Pract.* 2010 May 1; 11 (3): 09-16.

Duarte PM, Bezerra JP, Miranda TS, Feres M, Chambrone L, Shaddox LM. Local levels of inflammatory mediators in uncontrolled type 2 diabetic subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.*2014; 41, 11-8.

Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Parada CH, Casati MZ, Nociti FHJr. Overexpression of interleukin-1b and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontal Res.*2007(a); 42, 377-81.

Duarte PM, Napimoga MH, Fagnani EC, Santos VR, Bastos MF, Ribeiro FV, Araujo VC, Demasi APD. The expression of antioxidant enzymes in the gingivae of type 2 diabetes with chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology.*2012; 57, 161-8.

Duarte PM, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FHJr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.*2007(b); 13, 594-9.

Duarte PM, Santos VR, Dos Santos FA, De Lima Pereira SA, Rodrigues DBR, Napimoga MH. Role of smoking and type 2 diabetes in the immunobalance of advanced chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2011;82(3):429-438.

Edwards DI. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother*. 1993;31:9-20.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1991; 62: 123-31.

Engebretson SP, Hey-Hadavi J. Sub-antimicrobial doxycycline for periodontitis reduces hemoglobin A1c in subjects with type 2 diabetes: a pilot study. *Pharmacol Res*. 2011 Dec; 64 (6): 624-9.

Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36(9): 739-49.

Faveri M, Gursky LC, Feres M, Shibli JA, Salvador SL, de Figueiredo LC. Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2006 Nov; 33: 819-28.

Faveri M, Rebello A, de Oliveira Dias R, Borges-Junior I, Mendes Duarte P, Cristina Figueiredo L, Feres M. Clinical and Microbiological Effects of Adjunctive Metronidazole Plus Amoxicillin in the Treatment of Generalized Chronic Periodontitis: Smokers Versus non-Smokers. *J Periodontol*. 2014;85(4):581-91.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol*. 2001 Jul; 28 (7): 597-609.

Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard KA, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 1999;26(12):775-83.

Feres M, Soares GM, Mendes JA, Silva MP, Faveri M, Teles R, Socransky SS, Figueiredo LC. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2012 Dec; 39 (12): 1149-58.

Figueiredo LC, Souza DC, Santos VR, Miranda TS, Feres M, Faveri M, Duarte PM. Full-mouth scaling and root planing in type 2 diabetic subjects: one-year microbiological outcomes. *AustDent J*. 2014; 59(4), 490-496.

Firatli E, Yilmaz O, Onan U. The relationship between clinical attachment loss and the duration of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in children and adolescents. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 362-66.

Gaikwad SP, Gurav AN, Shete AR, Desarda HM. Effect of scaling and root planning combined with systemic doxycycline therapy on glycemic control in diabetes mellitus subjects with chronic generalized periodontitis: a clinical study. *J Periodontal Implant Sci.* 2013 Apr; 43 (2): 79-86.

Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013 Jun; 62 (1): 59-94.

Genco RJ. Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1981 Sep; 52 (9): 545-58.

Gilowski L, Kondzielnik P, Wiench R, Płocica I, Strojek K, Krzemiński T F. Efficacy of short-term adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in diabetic patients-randomized study. *Oral Dis* 2012;18(8), 763-770.

Golub LM, Evans RT, McNamara TF. A non- Antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in porphyromonas gingivalis induced periodontitis in rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;732:96–111.

Gomes BC, Golub LM, Ramamurthy NS. Tetracyclines inhibit parathyroid hormone induced bone resorption in organ culture. *Experientia.* 1984;40:1273–5.

Goodson JM. Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994; Jun;5:142-68.

Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS, Kent R, Teles R, Hasturk H, Bogren A, Van Dyke T, Wennstrom J, Lindhe J. Control of periodontal infections: a randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. *J Clin Periodontol.* 2012 Jun; 39 (6): 526-36.

Griffiths GS, Ayob R, Guerrero A, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Tonetti MS. Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2011 Jan; 38 (1): 43-9.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994; 65: 260-67.

Grossi, S. G., Skrepcinski, F. B., DeCaro, T., Robertson, D.C., Ho, A. W., Dunford, R. G., Genco, R. J. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycosylated hemoglobin. *J Periodontol* 1997; 68: 713-19.

Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Laurell L, Tonetti MS. Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2005 Oct; 32 (10): 1096-107.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol*. 1997 Oct; 24 (10): 767-76.

Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Apr; 23 (2): 148-57.

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

Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003 Dec; 8 (1): 115-81.

Haffajee AD, Torresyap G, Socransky SS. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *J Clin Periodontol*. 2007 Mar; 34 (3): 243-53.

Helovuo H, Paunio K. Effects of penicillin and erythromycin on the clinical parameters of the periodontium. *J Periodontol*. 1989; 60: 467-72.

Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22:175-181.

Hoepelman IM, Schneider MM. Azithromycin: the first of the tissue selective azalides. *Int J Antimicrob Agents*. 1995;5(3):145-67.

Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res*. 2005 Dec; 84 (12): 1154-9.

Jimenez M, Hu FB, Marino M, Li Y, Joshipura KJ. Type 2 diabetes mellitus and 20 year incidence of periodontitis and tooth loss. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012 Dec; 98 (3): 494-500.

- Kaner D, Christan C, Dietrich T, Bernimoulin JP, Kleber BM, Friedmann A. Timing affects the clinical outcome of adjunctive systemic antibiotic therapy for generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2007 Jul; 78 (7): 1201-8.
- Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol*. 2009 Sep; 36 (9): 765-74.
- Kim EK, Lee SG, Choi YH, Won KC, Moon JS, Merchant AT, Lee HK. Association between diabetes-related factors and clinical periodontal parameters in type-2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health*. 2013 Nov 7; 13 (1): 64.
- Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol 2000* 2007; 43: 278-93.
- Korokolvas A, França FFAC. *Dicionário Terapêutico Guanabara Koogan*. Ed 2012/2013; 18.63.
- Kulik EM, Lenkeit K, Chenux S, Meyer J. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2008 May; 61 (5): 1087-91.
- Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Jun 28; 7 (12): 738-48.
- Lalla, E., Lamster, I.B., Stern, D.M., Schmidt, A.M. (2001) Receptor for advanced glycation end products inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: mechanisms and insights into therapeutics modalities. *Annals of Periodontology* 6, 113-8.
- Li C, Liu J, Tan L, Yu N, Lin L, Geng F, Zhang D, Pan Y. The sociodemographic characteristics, periodontal health status, and subgingival microbiota of patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: a case-control study in a Chinese population. *J Periodontol*. 2013 Aug; 84 (8): 1058-66.
- Lima Oliveira AP, Faveri M, Gursky LC, Mestnik MJ, Feres M, Haffajee AD, Spransky SS, Teles RP. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*. 2012;39(3):295-302.
- Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965; 36(3): 177-87.
- Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Caffessee R, Stoll J. Metronidazole therapy for periodontitis. *J Periodontal Res*. 1987 May;22(3):224-6.

Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Morrison EC, Caffesse R, Hujoel PP. Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. *J Periodontol.* 1991 Apr;62(4):247-57.

Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Kerry GA, Higgins T, Stoll J. Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *J Periodontol.* 1984 Jun;55(6):325-35.

Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarcz J, Smith BA. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 103-12.

Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Laughon B, Grossman NS. Treatment of periodontal infections due to anaerobic bacteria with short-term treatment with metronidazole. 1981; 8: 29-44.

López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2006 Sep; 33 (9): 648-60.

Mandell RL. A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. *Infect Immun.* 1984 Sep; 45 (3): 778-80.

Mashimo PA, Yamamoto Y, Slots J, Park BH, Genco RJ. The periodontal microbiota of juvenile diabetics: culture, immunofluorescence and serum antibody studies. *J Periodontol.* 1983; 54:415-20.

Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008 Oct; 35 (10): 885-96.

Mdala I, Olsen I, Haffajee AD, Socransky SS, de Blasio BF, Thoresen M. Multilevel analysis of bacterial counts from chronic periodontitis after root planing/scaling, surgery, and systemic and local antibiotics: 2-year results. *J Oral Microbiol.* 2013.

Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;44:127–153.

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010 Apr; 37 (4): 353-65.

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Soares G, Teles RP, Fermiano D, Duarte PM, Faveri M. The effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of

generalized aggressive periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2012 Oct;39(10):955-61.

Miranda TS, Feres M, Perez-Chaparro PJ, Faveri M, Figueiredo LC, Tamashiro NS, Bastos MF, Duarte PM. Metronidazole and amoxicillin as adjuncts to scaling and root planning for the treatment of type 2 diabetic subjects with periodontitis: 1-year outcomes of a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2014; 41, 890-899.

Moeintaghavi A, Talebi-ardakani MR, Haerian-ardakani A, Zandi H, Taghipour S, Fallahzadeh H, Pakzad A, Fahami N. Adjunctive effects of systemic amoxicillin and metronidazole with scaling and root planing: a randomized, placebo controlled clinical trial. *J Contemp Dent Pract.* 2007; 8 (5): 51-9.

Müller HP, Heinecke A, Borneff M, Kiencke C, Knopf A, Pohl S. Eradication of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from the oral cavity in adult periodontitis. *J Periodontol Res* 1998;33: 49-58.

Nagata, M. Inflammatory cells and oxygen radicals. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4, 5003-4.

Novak MJ, Potter RM, Blodgett J, Ebersole JL. Periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2008; 79: 629-36.

Ojima M, Takeda M, Yoshioka H, Nomura M, Tanaka N, Kato T. Relationship of periodontal bacterium genotypic variations with periodontitis in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2005;28:433-4.

Oteo A, Herrera D, Figuero E, O'Connor A, González I, Sanz M. Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *Porphyromonas gingivalis*-associated periodontitis: a pilot study. *J Clin Periodontol.* 2010; 37, 1005-15.

Pahkla ER, Koppel T, Naaber P, Saag M, Loivukene K. The efficacy of non-surgical and systemic antibiotic treatment on smoking and non-smoking periodontitis patients. *Stomatologija.* 2006; 8(4):116-21.

Pajukanta R, Asikainen S, Saarela M, Alaluusua S, Jousimies-Somer H. In vitro activity of azithromycin compared with that of erythromycin against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:1241-3.

Pajukanta R. In vitro susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* to azithromycin, a novel macrolide. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8:325-6.

Pallasch TJ. Antibacterial and antibiotic drug CH 39 Pharmacology and Therapeutics for Dentistry 5th ed, Mosby 2004.

Patil V, Mali R, Mali A . Systemic anti-microbial agents used in periodontal therapy. J Indian Soc Periodontol. 2013; 17(2):162-8.

Pérez-Chaparro, P.J., Gonçalves,C., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Lobão, E., Tamashiro, N., Duarte, P., Feres, M. Newly identified pathogens associated with periodontitis: A systematic review. J Dent Res. 2014; 20(10): 1-13.

Promsudthi A, Pimapansri S, Deerochanawong C, Kanchanavasita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. Oral Dis. 2005 Sep; 11 (5): 293-298.

Quirynen M, Teughels W, van Steenberghe D. Microbial shifts after subgingival debridement and formation of bacterial resistance when combined with local or systemic antimicrobials. Oral Dis. 2003; 9 (1): 30-7.

Ribeiro FV, de Mendonça AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and bone-related factors in sistemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis.Journal of Periodontology.2011 82, 1187-96.

Rodrigues DC, Taba MJ, Novaes AB, Souza SL, Grisi MF. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. J Periodontol. 2003 Sep; 74 (9): 1361-7.

Rooney J, Wade WG, Sprague SV, Newcombe RG, Addy M. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxycillin alone and combined. A placebo controlled study. J Clin Periodontol. 2002 Apr; 29 (4): 342-50.

Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. J Clin Periodontol.2008;35:398–409.

Sampaio E, Rocha M, Figueiredo L C, Faveri M, Duarte P M, Gomes L E, Feres M. Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. J Clin Periodontol. 2011; 38, 838-846.

Santos VR, Lima JA, De Mendonça AC, Braz Maximo MB, Faveri M, Duarte PM. Effectiveness of full-mouth and partial-mouth scaling and root planing in treating chronic periodontitis in subjects with type 2 diabetes. J Periodontol. 2009 Aug; 80 (8): 1237-45.

Santos VR, Lima JA, Miranda TS, Feres M, Zimmermann GS, Nogueira-Filho Gda R, Duarte PM. Relationship between glycemic subsets and generalized chronic periodontitis in type 2 diabetic Brazilian subjects. Arch Oral Biol. 2012 Mar; 57 (3): 293-9.

Santos VR, Lima JA, Miranda TS, Gonçalves TE, Figueiredo LC, Faveri M, Duarte PM. Full-mouth disinfection as a therapeutic protocol for type-2 diabetic subjects with chronic periodontitis: twelve-month clinical outcomes: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013 Feb; 40 (2): 155-62.

Santos, V. R., Lima, J. A., De Mendonça, A. C., Braz Maximo, M. B., Faveri, M. & Duarte, P. M. (2009) Effectiveness of full-mouth and partial-mouth scaling and root planing in treating chronic periodontitis in subjects with type-2 diabetes. *Journal of Periodontology.* 80, 1237-1245.

Santos V R, Lima J A, Miranda T S, Gonçalves T E, Figueiredo L C, Faveri M, Duarte P M. Full-mouth disinfection as a therapeutic protocol for type-2 diabetic subjects with chronic periodontitis: twelve-month clinical outcomes: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013; 40, 155-162.

Santos V R, Ribeiro F V, Lima J A, Miranda T S, Feres M, Bastos M F, Duarte P M. Partial- and full-mouth scaling and root planing in type-2 diabetic subjects: a 12-mo follow-up of clinical parameters and levels of cytokines and osteoclastogenesis-related factors. *J Periodontal Res.* 2012; 47, 45-54.

Santos VR, Lima JA, Gonçalves TE, Bastos MF, Figueiredo LC, Shibli JA, Duarte PM. Receptor activator of nuclear factor-kappa ligand/osteoprotegerin ratio in sites of chronic periodontitis of subjects with poorly and well-controlled type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2010, 81, 1455-65.

Sgolastra F, Gatto R, Petrucci A, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2012b Oct; 83 (10): 1257-69.

Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2012a Jun; 83 (6): 731-43.

Sgolastra F, Severino M, Pietropaoli D, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of periodontal treatment to improve metabolic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Periodontol.* 2013 Jul; 84 (7): 958-73.

Shinn D. Metronidazole in acute ulceration gingivitis. *Lancet.* 1962;1:1191-1191.

Silva M P, Feres M, Siroto T A, Soares G M, Mendes J A, Faveri M, Figueiredo L C. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as

adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2011; 38, 828-837.

Siqueira JF, Roças, IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000 Jun; 89(6): 744-748.

Slots J. Microbial analysis in supportive periodontal treatment. *Periodontol 2000*. 1996 Oct; 12:56-9.

Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol*. 1979 Oct;50(10):495-09.

Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun*. 1980 Sep; 29 (3): 1013-20.

Smith, S. R., Foyle, D.M., Daniels, J., Joyston-Bechal, S., Smales, F. C., Sefton, A. & Williams, J. A double-blind placebo-controlled trial of azithromycin as an adjunct to non-surgical treatment of periodontitis in adults: clinical results. *J Clin Periodontol*. 2002; 29, 54-61.

Soares G M S, Mendes J A V, Silva M P, Faveri M, Teles R, Socransky S S, Wang X, Figueiredo L C, Feres M. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2014; 41: 366-376.

Socransky SS. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1979; 6: 16-21.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb; 25 (2): 134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28:12-55.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*. 1994a; 5, 7-25.

Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl*. 1994b; (18): S684-5, 688-93.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005; 38: 135-87.

- Socransky SS & Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38, 135-87.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotech*. 1994;17:788-792.
- Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol*. 1998; 69: 76-83.
- Taylor GW, Burt BA, Becker MP et al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1996; 67:1085-1093.
- Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2006; 42: 180-218.
- Tenenbaum H, Jenl F, Gallion C. Amoxicillin and Clavulanic acid concentration in GCF. *J Clin Periodontol*. 1997;24:804-7.
- Thorstensson H, Dahlen G, Hugoson A . Some suspect periodontopathogens and serum antibody response in adult long-duration insulindependent diabetics, *J Clin Periodontol*. 1995;22:449-458.
- Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*.2002;30:182-192.
- van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goené RJ, Abbas F, Winkel EG, de Graaff J. Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1989 Feb; 16 (2): 128-31.
- van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, de Graaff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Periodontol*. 1992 Jan; 63 (1): 52-7.
- Vlassara H: The AGE receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17: 436-443.
- Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2001 Apr; 28 (4): 296-305.

Winkel E G, van Winkelhoff A J, Timmerman M F, van der Velden U, Van der Weijden G A. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2001; 28, 296-305.

Xajigeorgiou C, Sakellari D, Slini T, Baka A, Konstantinidis A. Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2006 Apr; 33 (4): 254-64.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000;27(10):722-32.

Yek E C, Cintan S, Topcuoglu N, Kulekci G, Issever H, Kantarci A. Efficacy of amoxicillin and metronidazole combination for the management of generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2010; **81**, 964-974.

Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol.* 1983.

Zhou M, Rong R, Munro D, Zhu C, Gao X, Zhang Q, Dong Q. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One.* 2013 Apr 22; 8 (4): e61516

ANEXO

Miranda TS, **Feres** M, Perez-Chaparro PJ, Faveri M, Figueiredo LC, Tamashiro NS, Bastos MF, Duarte PM. Metronidazole and amoxicillin as adjuncts to scaling and root planing for the treatment of type 2 diabetic subjects with periodontitis: 1-year outcomes of a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2014 Sep;41(9):890-9.