



MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA

LINA LAMEH SMEILI YASSINE

USO DE METRONIDAZOL E AMOXICILINA NO TRATAMENTO DA
PERIODONTITE CRÔNICA EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS E NÃO
DIABÉTICOS - RESPOSTAS CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA APÓS 1
ANO DE ACOMPANHAMENTO

Guarulhos

2017

LINA LAMEH SMEILI YASSINE

USO DE METRONIDAZOL E AMOXICILINA NO TRATAMENTO DA
PERIODONTITE CRÔNICA EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS E NÃO
DIABÉTICOS - RESPOSTAS CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA APÓS 1
ANO DE ACOMPANHAMENTO

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos
para obtenção do título de mestre em Odontologia
Área de concentração: Periodontia
Orientadora: Prof^a Dra. Luciene Cristina de Figueiredo
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Poliana Mendes Duarte

Guarulhos

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

Y29u

Yassine, Lina Lameh Smeili

Uso de Metronidazol e Amoxicilina no tratamento da periodontite crônica em indivíduos diabéticos e não diabéticos - respostas clínica e microbiológica após 1 ano de acompanhamento. / Lina Lameh Smeili Yassine. -- 2017.

74 f.; 31 cm.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2017.

1. Periodontite Crônica 2. Diabetes mellitus 3. Raspagem e alisamento radicular 4. Amoxicilina 5. Metronidazol I. Título II. Figueiredo, Luciene Cristina de (Orientadora). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "USO DE METRONIDAZOL E AMOXICILINA NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE CRÔNICA EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS - RESPOSTAS CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA APÓS 1 ANO DE ACOMPANHAMENTO" em sessão pública realizada em 31 de maio de 2017, considerou a candidata LINA LAMEH SMEILI aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo (UNG) *Luciene Cristina de Figueiredo*

2. Prof. Dr. Rafael de Oliveira Dias (UMC) *Rafael de Oliveira Dias*

3. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (UNG) *Marcelo de Faveri*

Guarulhos, 31 de maio de 2017.

*Dedico este trabalho aos meus pais Methal e Lamah, a quem devo toda
minha educação e formação e que compartilham comigo todos os
momentos de alegria e dificuldade.*

*Aos meus irmãos Abdo e Mohamad que sempre estão dispostos a me
ajudar.*

*Ao meu noivo Aly por sempre estar comigo em qualquer circunstância
além me incentivar e ter muita paciência.*

Meus exemplos de vida, determinação, fé e honestidade.

Amo vocês infinitamente!

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por me dar saúde e me abençoar, guiando sempre meus passos;

À minha mãe, Methal, guerreira, esforçada, dedicada, meu exemplo de vida, por me aguentar e ser minha companheira em todos os momentos;

Ao meu pai, um exemplo a ser seguido, que sempre me deu condições para poder me dedicar aos estudos;

Aos meus irmãos Mohamad e Abdo (meus gorduchos) que sempre me ajudam no que for preciso;

Ao meu noivo Aly, meu amor que sempre está comigo, me incentivando, aconselhando e sendo muito paciente com meus ataques de “pelanca”;

À minha orientadora, Luciene Figueiredo. Pelos ensinamentos desde a graduação. Confiança, oportunidades e compreensão. Exemplo de profissionalismo e competência;

À minha co-orientadora, Poliana Mendes Duarte, por toda ajuda e dedicação, extremamente generosa em compartilhar sua experiência e ensinamentos;

À professora Josefa Mestnik, que sempre está disposta a ajudar e ensinar;

Ao professor Marcelo de Faveri, por toda ajuda e dedicação;

Aos meus colegas Felipe e Cláudia que sempre me ajudaram durante o curso;

A todos os funcionários da Universidade Guarulhos que contribuíram de alguma forma;

Aos pacientes que participaram da pesquisa.

Muito obrigado a todos!

“A excelência de um estudioso sobre outro adorador (ordinário) é como a excelência da lua cheia sobre o resto dos corpos celestes. ”

(Profeta Muhammad SAWS)

RESUMO

Objetivo: comparar os efeitos clínicos e microbiológicos do uso de metronidazol (MTZ) e amoxicilina (AMX) como adjuvantes para o tratamento de periodontite crônica em pacientes diabéticos e não-diabéticos. **Material e métodos:** Vinte e nove indivíduos diabéticos tipo 2 e 29 indivíduos não diabéticos com PQ generalizada receberam SRP com MTZ (400 mg / três vezes ao dia) + AMX (500mg / TID) durante 14 dias. As amostras de biofilme subgingival foram analisadas por *checkerboard DNA- DNA hybridization* para 40 espécies bacterianas. O monitoramento clínico e microbiológico foi realizado no início do estudo, 3, 6 e 12 meses pós-terapia. **Resultados:** todos os parâmetros periodontais e a proporção do complexo vermelho melhoraram para ambos os grupos até 1 ano após a terapêutica ($p < 0,05$). O grupo de diabéticos apresentou menor ganho de inserção clínica desde o início do estudo até 1 ano após a terapêutica e maiores proporções médias dos complexos vermelhos e laranja em 1 ano do que os não diabéticos ($p < 0,05$). As reduções médias dos sítios com profundidade de sondagem (PS) ≥ 5 mm e ≥ 6 mm entre a avaliação inicial e 1 ano não diferiram significativamente entre os grupos ($p > 0,05$). Além disso, 68,9% e 75,9% dos não diabéticos e diabéticos, respectivamente, atingiram o desfecho clínico para tratamento (≤ 4 locais com DP ≥ 5 mm) após 1 ano de pós-terapia ($p > 0,05$). **Conclusão:** Os indivíduos diabéticos de tipo 2 apresentaram tendência para uma pior resposta em termos de ganho de inserção clínica e perfil microbiano, mas atingiram o desfecho clínico pós-tratamento de 1 ano, comparável aos não-diabéticos. **Palavras-chave:** periodontite crônica; diabetes mellitus; raspagem e alisamento radicular; amoxicilina, metronidazol

ABSTRACT

Aim: To compare the clinical and microbiological effects of the use of metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) as adjuncts to scaling and root planing (SRP) for the treatment of chronic periodontitis (ChP) in diabetic and non-diabetic subjects.

Material and Methods: Twenty-nine type 2 diabetic subjects and 29 non-diabetic subjects with generalized ChP received SRP with MTZ [400 mg/thrice a day (TID)]+AMX (500mg/TID) for 14 days. Subgingival biofilm samples were analyzed by checkerboard DNA-DNA hybridization for 40 bacterial species. Clinical and microbiological monitoring was performed at baseline, 3, 6 and 12 months post-therapy. **Results:** All periodontal parameters and the proportion of the red complex improved for both groups up to 1-year post-therapy ($p < 0.05$). The diabetic group presented lower clinical attachment (CA) gain from baseline to 1-year post-therapy and higher mean proportions of the red and orange complexes at 1 year than the non-diabetic group ($p < 0.05$). The mean reductions of sites with probing depth (PD) ≥ 5 mm and ≥ 6 mm between the baseline and 1-year evaluation did not differ significantly between groups ($p > 0.05$). Furthermore, 68.9% and 75.9% of non-diabetic and diabetics subjects, respectively, reached the clinical endpoint for treatment (≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm) at 1-year post-therapy ($p > 0.05$). **Conclusions:** Type 2 diabetic subjects presented a trend toward a worse response in terms of CA gain and microbial profile, but reached the clinical endpoint for treatment at 1-year post-therapy comparable to the non-diabetic ones.

Key-words: chronic periodontitis; diabetes mellitus; root planing; dental scaling; amoxicillin, metronidazole

Sumário

1. Introdução.....	9
1.1 Etiologia e Patogenia da Doença Periodontal.....	10
1.2 Diabetes Melito como fator de risco para as periodontites.....	13
1.3 Raspagem e Alisamento Radicular.....	17
1.4 Uso do Metronidazol (MTZ) e amoxicilina como adjuntos à RAR.....	18
1.5 Antibióticos sistêmicos como coadjuvantes à RAR em indivíduos diabéticos.....	21
2. Proposição.....	26
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1 Seleção de indivíduos.....	27
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	27
3.3 Delineamento do estudo.....	28
3.4 Avaliação clínico-periodontal.....	29
3.5 Avaliação microbiológica.....	30
3.5.1 Seleção dos sítios-testes.....	30
3.5.2 Coleta das amostras de biofilme subgingival.....	30
3.5.3 Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	31
3.5.4 Isolamento do DNA e preparo das sondas.....	31
3.5.5 Checkerboard DNA-DNA hybridization.....	34
3.5.6 Detecção das espécies.....	34
3.6 Procedimentos terapêuticos.....	38
3.6.1 Terapia periodontal básica.....	38
3.6.2 Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos.....	38
4. Artigo científico.....	40
5. Referências Bibliográficas.....	67

1. INTRODUÇÃO

Os objetivos do tratamento da doença periodontal são reduzir a infecção, resolver a inflamação e criar uma condição clínica que seja compatível com a saúde periodontal. A periodontite, inicialmente, é tratada de uma forma não cirúrgica. A terapia periodontal não cirúrgica consiste em raspagem e alisamento radicular (RAR), combinada com instruções de higiene oral. Normalmente, isso resulta em ganho de inserção clínica e recessão da margem gengival devido à resolução da inflamação. Mas, mesmo que o efeito esperado seja alcançado, algumas bolsas residuais permanecem depois da terapia (LANG E TONETTI, 2003).

A terapia periodontal tradicional envolve a eliminação de periodontopatógenos por debridamento mecânico (RAR) e procedimentos cirúrgicos em conjunto com o controle adequado do biofilme dental. A eficácia da RAR como parte do tratamento não cirúrgico da periodontite já foi estabelecida (HAN et al., 2012).

No entanto, a RAR pode falhar na redução ou eliminação da infecção na base da bolsa periodontal, em áreas de difícil acesso, tais como a de bifurcação, onde são inacessíveis para instrumentos periodontais (RABBANI et al., 1981).

A busca por alternativas terapêuticas é uma constante e nesse contexto, a literatura mostra que os antibióticos sistêmicos em combinação com a terapia periodontal não cirúrgica podem melhorar os resultados clínicos (MOMBELLI et al., 2000, KEESTRA et., 2015).

Em 2002, baseado em uma revisão sistemática, Herrera concluiu que em situações clínicas específicas, tais como pacientes com bolsas profundas, pacientes com doença ativa ou pacientes com perfis microbiológicos específicos, o uso de antibióticos sistêmicos em combinação com a terapia periodontal não cirúrgica pode ser clinicamente relevante.

Diferentes regimes de antibióticos sistêmicos já foram testados até o momento por vários pesquisadores (FERES et al., 2001; BONITO et al., 2005, MESTNIK et al., 2010; SAMPAIO et al., 2011; SILVA et al., 2011; MESTNIK et al., 2012; HERRERA et al., 2012; FERES et al., 2012; SOARES et al., 2014). Os mais comuns são as penicilinas (amoxicilina, cefuroximaxetil), tetraciclina (doxiciclina,

minociclina, tetraciclina), macrolídeos (azitromicina, flurithromicina, espiramicina, clindamicina), quinolonas (moxifloxacina, ciprofloxacina) e nitroimidazol (metronidazol, ornidazol).

O uso racional de antibióticos sistêmicos em combinação com a terapia periodontal não cirúrgica é para suprimir as bactérias patogênicas e criar um biofilme composto principalmente por microrganismos associados à saúde periodontal. Se o uso de antibióticos sistêmicos for considerado, o clínico precisa decidir em que ponto do tratamento e para quais indivíduos serão utilizados, levando-se em conta a adesão do paciente, os efeitos adversos e a possível resistência bacteriana (HAFAJEE et al., 2003).

1.1. Etiologia e Patogenia da Doença Periodontal

Todas as formas de doenças periodontais são altamente prevalentes e podem afetar mais de 90% da população em todo o mundo (PIHLSTROM, 2005).

Tendo como etiologia primária, o biofilme microbiano aderido à superfície dental, a doença periodontal é uma infecção bacteriana que acomete os tecidos de suporte dos dentes, promovendo uma inflamação crônica local, destruição do tecido conjuntivo e osso alveolar e, eventualmente, a perda do dente (ARMITAGE, 1999).

É definida como uma doença sítio-específica, que evolui continuamente com períodos de exacerbação e de remissão, resultando de uma resposta inflamatória e imune do hospedeiro à presença de bactérias específicas e seus subprodutos. As manifestações clínicas da doença são dependentes das propriedades agressoras dos microrganismos e da capacidade do hospedeiro em resistir à agressão (LINDHE et al., 2003).

Embora o mais importante mecanismo de defesa resida na resposta inflamatória que se manifesta inicialmente como gengivite, variações no processo inflamatório e o potencial de virulência das bactérias podem ser a causa principal das diferenças encontradas na susceptibilidade à doença periodontal. O processo inflamatório desencadeado pode culminar com a instalação de uma periodontite.

Define-se como gengivite a inflamação superficial da gengiva, ou seja, dos tecidos de proteção do periodonto. Apesar da presença de alterações patológicas, o epitélio de união se mantém unido ao dente, não havendo perda de

inserção periodontal. É uma situação reversível, caso sejam removidos os fatores etiológicos. Contudo, a gengivite representa um papel precursor na perda de inserção ao redor dos dentes se os fatores etiológicos não forem eliminados (LINDHE et al., 2003).

A persistência dos biofilmes microbianos, em íntima proximidade aos tecidos periodontais, possibilita contínuo estímulo antigênico, tornando a resposta inflamatória inicialmente aguda, com predomínio de alterações exsudativas e degradação de colágeno, em lesão crônica. Esta última é caracterizada pela formação de bolsa periodontal, além de contínua destruição do colágeno, ativação de fibroblastos e fagócitos, acúmulo de células polimorfonucleares e mononucleares, predominantemente linfoplasmocitárias, e reabsorção óssea alveolar, caracterizando a periodontite que pode ser definida como uma doença tipicamente crônica e continuamente progressiva (LISTGARTEN, 2000).

O perfil microbiológico difere entre os pacientes saudáveis e aqueles com periodontite. O biofilme de indivíduos saudáveis apresenta grupo de microrganismos compatíveis com o hospedeiro, que estão mais associados a saúde periodontal, enquanto que os indivíduos com periodontite apresentam uma microbiota na qual prevalecem espécies patogênicas que são responsáveis pelo início e a progressão da perda de inserção periodontal. Algumas bactérias conseguem alterar o ecossistema subgengival, favorecendo a colonização de outros microrganismos mais virulentos, levando ao estabelecimento de um biofilme cada vez mais complexo (SOCRANSCKY & HAFFAJE, 1994), caracterizado por uma microbiota principalmente gram-negativa anaeróbia e de espiroquetas, que constituem as principais bactérias periodontopatogênicas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*. (SOCRANSKY et al., 1998).

As características clínicas da periodontite incluem edema, recessão gengival, sangramento à sondagem, aumento da mobilidade dentária e presença de bolsa periodontal, enquanto as características histopatológicas incluem localização do epitélio juncional em posição apical à junção cimento esmalte, perda de fibras de colágeno subjacente ao epitélio da bolsa e um denso infiltrado inflamatório com neutrófilos, linfócitos e macrófagos (PIHLSTROM, 2005).

Com os adventos das técnicas de biologia molecular e imunologia, foi possível determinar algumas espécies bacterianas diretamente envolvidas nas doenças periodontais. Um estudo clássico, realizado por Socransky et al., 1998, propôs um agrupamento das espécies bacterianas periodontais em cinco complexos microbianos distintos, dos quais três deles (roxo, amarelo e verde) são formados por espécies relacionadas à saúde periodontal. Os dois complexos sucessores a esses que se instalam inicialmente são compostos por espécies bacterianas associadas às doenças periodontais, sendo eles, o complexo laranja e vermelho. As espécies *Fusobacterium nucleatum ssp.*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus* formam o complexo laranja. O complexo vermelho por sua vez, abrange as principais bactérias periodontopatogênicas, sendo elas *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. O *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é uma espécie bacteriana gram-negativa anaeróbia que não está relacionado a nenhum desses complexos. No entanto, sua alta virulência e patogenicidade nas periodontites, principalmente na forma agressiva, foi observada em diversos estudos fazendo do mesmo um importante integrante da etiologia das doenças periodontais (CORTELLI et al 2005).

Os mecanismos patogênicos da periodontite estão associados à citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores que modulam a destruição dos tecidos gengivais, o ligamento periodontal e a reabsorção do osso alveolar, sendo que a gravidade da doença é determinada parcialmente pela resposta imunoinflamatória do hospedeiro frente ao patógeno (PAGE, 1998).

Dessa forma, hábitos e fatores sistêmicos capazes de interferir e/ou modular os mecanismos imunoinflamatórios celulares e moleculares são capazes de impactar negativamente no estabelecimento e progressão das periodontites (CHOI et al., 2011).

Sendo assim, foi estabelecido por meio de estudos transversais e longitudinais que o tabagismo e a diabetes mellitus (DM), são fatores de risco para progressão das periodontites, capazes de aumentar sua prevalência e severidade (LINDEN et al., 1994; GROSSI et al., 1994; FIRATLI et al., 1996; HEITZ-MAYFIELD, 2005; VOUIROS et al., 2009; GENCO et al., 2013).

1.2. Diabetes Mellitus como fator de risco para as periodontites

O DM é reconhecido como 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).

De acordo com a Federação Internacional do Diabetes (IDF), atualmente o DM afeta 382 milhões de pessoas no mundo e apresenta uma estimativa de aumentar em prevalência para 592 milhões em 2035. Essa doença consiste em um grupo de alterações metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante na falha de secreção ou ação da insulina, sendo 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 relacionado à destruição auto-imune das células β pancreáticas, perda praticamente total da secreção de insulina e, geralmente acomete indivíduos jovens. Na qual, existe a necessidade de reposição de insulina diariamente. No DM tipo 2, por sua vez, ocorre a deficiência na utilização da insulina, seja pela quantidade insuficiente secretada no organismo, pela inibição de sua ação, ou por ambas, atingindo indivíduos com idades mais avançadas. Pode ser controlado por meio de dieta, hipoglicemiantes e/ou insulina exógena (American Diabetes Association-ADA, 2013).

Podem ocorrer diversas alterações macrovasculares e microvasculares e complicações no reparo tecidual, como consequências diretas do DM tipo 2 (TSOURDI et al., 2013). Dentre as alterações macrovasculares se destacam a aterosclerose, gangrena dos membros inferiores e acidentes cerebrovasculares. Em relação às alterações microvasculares, além de retinopatias, neuropatias e nefropatias, se destacam as alterações e complicações bucais, como a periodontite crônica (American Diabetes Association-ADA, 2013).

Na década de 90, por meio de estudos transversais e longitudinais, a influência do DM e da hiperglicemia sobre as doenças periodontais foi amplamente avaliada (GROSSI et al., 1997; FIRATLI et al., 1996; TAYLOR et al., 1998). Um dos

primeiros estudos foi feito na população de índios Pima no Arizona, que apresentava alta prevalência de DM. Nesta população, foi demonstrada uma maior incidência de periodontite nos indivíduos acometidos por DM, comparada a 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 e que a suscetibilidade à periodontite é aumentada em torno de três vezes em indivíduos diabéticos em relação aos não diabéticos (MEALEY & OCAMPO, 2007). Diversos estudos demonstraram indivíduos diabéticos do tipo 2 apresentam 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) do 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 de 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 de 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).

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 índices de HbA1c e glicemia em jejum, sendo significativamente maior nos indivíduos que apresentam níveis de HbA1c > 11%. Nesse estudo, os autores não observaram uma relação de dose-resposta entre a gravidade e extensão da periodontite e o controle glicêmico.

Kim et al. (2013) demonstraram que os parâmetros clínicos periodontais, a perda dentária e a inflamação gengival foram significativamente influenciadas 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.

Demmer et al. (2010), em um estudo prospectivo de 5 anos em 2.973 indivíduos, mostraram 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 inter-relação 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.

Estudos que envolvam a rede de citocinas na relação hospedeiro-microbiota em indivíduos diabéticos têm aumentado nos últimos anos. Duarte et al., (2014) sugeriram que há uma maior susceptibilidade à periodontite em pacientes 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, fator estimulador de colônia granulócito-macrófago, interleucina 6 e 12 e fator de necrose tumoral.

Em relação aos aspectos microbiológicos, vários trabalhos tentaram elucidar o impacto do DM sobre a doença periodontal. 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 a um exame clínico periodontal e à avaliação microbiológica de amostras de biofilme subgengival em relação à presença de espécies periodontopatogênicas *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*. Os resultados demonstraram uma associação positiva entre o DM e a prevalência de *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*.

Casarin et al. (2013) compararam a biodiversidade subgengival em sítios periodontais profundos de indivíduos portadores de DM e não diabéticos com periodontite crônica, por meio de clonagem e sequenciamento. Foram avaliados 12 indivíduos portadores de DM tipo 2 não controlados (Hb1Ac > 8%) e 11 não diabéticos, todos com periodontite crônica avançada e generalizada. Os indivíduos portadores de DM 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, os portadores de DM demonstraram porcentagens mais baixas de *Porphyromonas*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Synergistetes*, *Tannerella* e *Treponema* em relação aos indivíduos não diabéticos. Logo, indivíduos com periodontite crônica apresentaram diferenças significantes na biodiversidade microbiana subgengival em comparação aos indivíduos não diabéticos.

Li et al. (2013) demonstraram alta prevalência e maiores quantidades de *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* em chineses portadores de DM. Por outro lado, *Provatella intermedia* apresentou níveis menores em indivíduos portadores de DM quando comparados aos indivíduos sistematicamente 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 *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* em sítios de diabéticos compensados e não compensados foram significativamente maiores quando comparados aos não diabéticos.

No estudo de Zhou et al. (2013) foi observado que os gêneros *Provatella* e *Tannerella* estavam aumentados nas amostras sem periodontite de não diabéticos, enquanto *Pseudomonas* estava associado às amostras de indivíduos portadores de DM. A maioria das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) relacionados à saúde estava reduzida nas amostras de indivíduos portadores de DM sem periodontite. *Actinobacteria* e *Proteobacteria* se apresentaram em maior abundância em amostras de indivíduos portadores de DM com periodontite, enquanto *Bacteroidetes* estava mais abundante em amostras de não diabéticos com periodontite. Baseado nestes dados, os autores concluíram que o DM pode alterar a composição bacteriana do biofilme subgengival.

1.3 Raspagem e Alisamento Radicular

A raspagem e alisamento radicular (RAR) é uma das terapias periodontais mais comumente utilizadas. Este procedimento visa desorganizar o biofilme dental, suprimir os patógenos da cavidade bucal e impedir a progressão da doença periodontal (SOCRANSKY & HAFAJEE, 2002).

Porém, o efeito do debridamento mecânico na alteração do perfil microbiológico subgengival é muitas vezes limitado. Pois a eliminação de espécies periodontopatogênicas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* dos nichos subgengivais é difícil, já que essas espécies apresentam habilidade de atingir locais de difícil acesso, invadindo células epiteliais orais (MOMBELI et al., 2000; RUDNEY et al., 2005).

Além disso, alguns microrganismos subgengivais não podem ser removidos quando localizados em áreas fora do alcance da instrumentação periodontal, como nas lesões de furca (ADRIAENS & ADRIAENS, 2004).

Os benefícios clínicos e microbiológicos da RAR estão bem documentados na literatura (HAFAJEE et al., 1997a; CUGINI et al., 2000; COBB, 2002; CARVALHO et al., 2004; COLOMBO et al., 2005; CARVALHO et al., 2005; TELES et al., 2006). Estes estudos mostraram que após a RAR ocorre redução da profundidade de sondagem e ganho clínico de inserção (principalmente nos sítios com profundidade de sondagem intermediária e profunda), diminuição da inflamação gengival e menor porcentagem de sítios com sangramento à sondagem e supuração.

Haffajje et al. (1997) trataram 57 indivíduos com periodontite crônica por meio de RAR e fizeram acompanhamento clínico e microbiológico por 3, 6 e 9 meses após o tratamento. Os autores observaram redução nos níveis médios e na porcentagem de sítios colonizados após a terapia em apenas três espécies bacterianas, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*. Aos 12 meses pós-terapia, essas alterações foram mantidas (CUGINI et al., 2000). Esse e outros estudos realizados em outras populações (COLOMBO et al., 2002; CARVALHO et al., 2005) sugerem que a RAR não proporciona, em todos os casos de doença periodontal, a eliminação ou redução de patógenos a níveis compatíveis com saúde periodontal por períodos prolongados de tempo.

Sendo assim, terapias adjuvantes à RAR, como a administração de antibióticos sistêmicos, têm sido propostas a fim de auxiliar no tratamento da doença periodontal (HERRERA et al., 2002; HAFFAJJE et al., 2003; HERRERA et al., 2008).

1.4 Uso do Metronidazol (MTZ) e Amoxicilina (AMX) como adjuntos à RAR

Os efeitos clínicos e microbiológicos benéficos promovidos pela RAR já são bem reconhecidos, mas esse procedimento como tratamento único é, em algumas situações, insuficiente para transformar o perfil bacteriano periodontopatogênico em um perfil compatível com saúde periodontal, principalmente em áreas de difícil acesso mecânico e em casos de doenças avançadas ou associadas à fatores de risco (HAFFAJJE et al., 1997; CUGINI et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; MATARAZZO et al., 2008). Sendo assim, existe uma busca por terapias coadjuvantes à RAR que possam aumentar sua eficiência sobre parâmetros clínicos e microbiológicos periodontais.

Uma das possíveis terapias é o uso de antibióticos coadjuvantes à RAR. Sendo que os principais grupos compreendem os tetraciclíneos (tetraciclina, minociclina, doxiciclina), macrolídeos (eritromicina, azitromicina), penicilinas (amoxicilina [AMX]), nitroimidazol (metronidazol [MTZ]), quinolonas (ciprofloxacinas) e lincomicinas (clindamicinas) (HERRERA et al., 2008; KRAYER et al., 2010).

O metronidazol é um nitromidazol sintético com propriedades bactericidas, que possui um espectro de ação capaz de atingir bactérias Gram negativas e anaeróbias estritas (ABU FANAS et al., 1991). Estudos científicos avaliando o efeito do MTZ nos parâmetros clínicos periodontais demonstraram que esse medicamento associado à RAR proporciona resultados melhores quando comparados à terapia mecânica apenas (JOYSTON-BECHAL et al., 1986; LOESCHE et al., 1992; ELTER et al., 1997; FERES et al., 2001; WINKEL et al., 2001; HAFFAJJE et al., 2003; CARVALHO et al., 2004; MATARAZZO et al., 2008).

Já a AMX é um antibiótico de amplo espectro, pertencente ao grupo das penicilinas, que atua sobre espécies facultativas, cocos e bacilos Gram negativos e positivos (KULIC et al., 2008). No entanto, os resultados dos estudos que avaliaram o efeito da AMX associada à RAR demonstraram que esse antibiótico oferece uma modesta contribuição na melhora dos parâmetros clínicos periodontais, quando

comparado à terapia mecânica isolada (HELOVUO & PAUNIO, 1989; FERES et al., 2001).

O primeiro estudo demonstrando os efeitos benéficos da associação do MTZ e AMX foi realizado por Van Winkelhoff et al. (1989), no tratamento de pacientes com periodontite refratária e periodontite agressiva portadores do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Haffajje et al. (2003) 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 nível clínico de inserção quando comparados aos que não receberam. 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.

Guerrero et al. (2005) realizaram o primeiro estudo randomizado placebo-controlado avaliando os efeitos clínicos da RAR associado ao MTZ e AMX. Os resultados mostraram uma melhor resposta clínica para o grupo de indivíduos que associaram as terapias quando comparados ao grupo que recebeu apenas a RAR no tratamento da periodontite agressiva.

Sgolastra et al. (2012a), por meio de uma revisão sistemática, reportaram 6 estudos clínicos randomizados que encontraram maior ganho de inserção clínica e redução na profundidade de sondagem com o uso de MTZ e AMX na periodontite agressiva. Sendo assim, a associação de MTZ e AMX foi estabelecida como um dos protocolos mais promissores para o 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).

Diversos estudos também demonstraram que a combinação de MTZ e AMX adjuntos à RAR é efetiva no tratamento da periodontite crônica (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).

Roney et al. (2002) realizou o primeiro estudo clínico randomizado sobre os efeitos clínicos do uso de MTZ ou MTZ e AMX no tratamento da periodontite crônica. Sessenta e seis indivíduos receberam RAR e foram aleatorizados em 4 grupos: administração de AMX (250 mg, 3x/dia/7 dias) e MTZ (200 mg, 3x/dia/7 dias), placebo e MTZ (200 mg, 3x/dia/7 dias), placebo e AMX (250mg, 3x/dia/7 dias) 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.

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 outro 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.

Feres et al. (2012) realizaram um estudo longitudinal, placebo-controlado e duplo cego em 118 pacientes com periodontite crônica que 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 bochechos 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 profundidade de sondagem maior ou igual a 5mm e menor número de pacientes com “alto risco” de progressão da doença, isto é, com 9 ou mais 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 de doença nestes pacientes com periodontite crônica generalizada. Soares et al. (2014) avaliaram o perfil microbiológico destes pacientes 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.

Sgolastra et al. (2012b) realizaram uma 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 redução da profundidade de sondagem e maior ganho de inserção clínica com o uso da combinação antibiótica.

Faveri et al. (2014) avaliaram os efeitos do MTZ e AMX como adjuntos à RAR no tratamento de fumantes e não fumantes com periodontite crônica. Houve melhoras clínicas e microbiológicas em ambos os grupos. Mas, independentemente do hábito de fumar, não fumantes apresentaram um menor número de sítios com profundidade de sondagem menor ou igual que 5mm, bem como reduções da média de profundidade de sondagem e ganho de inserção após 3 meses. Quanto à microbiota subgengival, as alterações mais favoráveis também foram observadas nos não fumantes.

1.5 Antibióticos sistêmicos como coadjuvantes à RAR em indivíduos diabéticos

Os parâmetros clínicos e microbiológicos para uma terapia periodontal bem-sucedida incluem o ganho de inserção clínica e reduções na profundidade de sondagem (PS), nos sinais de inflamação e nas proporções de espécies bacterianas patogênicas e, finalmente, impedimento da progressão da doença. Embora a raspagem e alisamento radicular (RAR) seja um procedimento essencial no tratamento da periodontite, quando aplicado isoladamente, pode não proporcionar resultados clínicos e microbiológicos favoráveis.

Portanto, os antibióticos sistêmicos têm sido sugeridos como terapias adjuntivas capazes de superar algumas limitações de RAR, especialmente em pacientes com periodontite avançada e aumento do risco de progressão da doença. Uma revisão sistemática recente que compilou os dados de 13 ensaios clínicos randomizados (ECR) demonstrou que, em geral, antibióticos sistêmicos como

adjuvantes da RAR proporcionaram mais benefícios clínicos do que a RAR isoladamente no tratamento de indivíduos diabéticos com periodontite (Grellmann et al., 2016). Nesta revisão, 10 ECR avaliaram os efeitos da doxiciclina (Grossi et al. 1997, Llambés et al. 2005, Singh et al. 2008, O'Connell et al. 2008, Al-Zahrani et al. 2009, Deo et al. 2010, Gilowski et al. 2012, Gaikwad et al. 2013, Tsalikis et al. 2014, Al-Nowaiser et al. 2014), uma amoxicilina mais clavulanato (Rodrigues et al., 2003), uma azitromicina (Botero et al., 2013) E uma combinação de metronidazol (MTZ) e amoxicilina (AMX) (Miranda et al., 2014). Por meio dos resultados da revisão sistemática acima mencionada (Grellmann et al., 2016), é possível verificar que o único ECR (Miranda et al., 2014) avaliando a associação de MTZ e AMX mostrou melhores resultados clínicos do que os ECARs que avaliaram outros protocolos antibióticos.

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

Botero et al. (2013) avaliaram os efeitos clínicos e glicêmicos do uso da azitromicina (AZM) sistêmica adjunta à RAR no tratamento de diabéticos não controlados. Os autores observaram maiores reduções na profundidade de sondagem no grupo que recebeu RAR e azitromicina, em comparação ao grupo que recebeu RAR e placebo.

Grossi et al. (1997) avaliaram os efeitos da doxiciclina sobre os parâmetros periodontais, aspectos microbiológicos, e controle glicêmico em indivíduos portadores de DM. Todos os indivíduos mostraram melhoras clínicas e microbiológicas.

Singh et al. (2008) avaliaram indivíduos com periodontite generalizada não tratada portadores de DM tipo 2 que receberam apenas RAR ou RAR associada à doxiciclina sistêmica. Ambos os grupos demonstraram melhoras clínicas e glicêmicas, mas o grupo que recebeu antibiótico, apresentou o resultado mais favorável.

O' Connell et al. (2008) observaram melhoras clínicas, imunológicas e glicêmicas mais significativas em indivíduos portadores de DM e periodontite que receberam RAR associada à doxiciclina quando comparado ao grupo que recebeu apenas a RAR.

Em 2010, Deo et al., avaliaram os efeitos clínicos da administração contínua de baixas doses de doxicilina (20mg, 2x ao dia por 6 meses) como terapia adjunta à RAR em indivíduos portadores de DM com periodontite crônica. Houve melhora clínica no grupo que recebeu a doxiciclina quando comparado ao grupo que recebeu RAR mais placebo.

Gilowski et al. (2012) avaliaram os efeitos clínicos e glicêmicos da RAR associada a administração de doxicilina em dose sub-antimicrobiana ou placebo no tratamento de pacientes portadores de DM tipo 2 com periodontite crônica. De acordo com os resultados, a administração de doxicilina em dose sub-antimicrobiana apresenta modestos, mas significantes benefícios clínicos periodontais quando comparada à RAR mais placebo.

Por outro lado, Gaikwad et al. 2013 não observaram benefícios adicionais quanto ao uso de doxicilina como adjunto à RAR no controle glicêmico e parâmetros clínicos de indivíduos com DM tipo 2.

Llambés et al. 2005 avaliaram indivíduos diabéticos tipo 1 com tratamento periodontal não cirúrgico com e sem doxiciclina adjuvante. Embora ambos os regimes de tratamento periodontal sejam eficazes em diabéticos de tipo 1, o uso de doxiciclina como adjuvante proporcionou resultados mais significativos quando se conseguiu um bom controle da placa.

Al-Zahrani et al. 2009 avaliaram o efeito do uso adjunto da terapia fotodinâmica adjunta à RAR, o uso da doxiciclina adjunta à RAR e a RAR em pacientes com diabetes e periodontite. Os resultados não demonstraram diferenças significativas nos parâmetros clínicos e glicêmicos entre os grupos.

Al-Nowaiser et al. 2014 avaliaram os efeitos da doxiciclina sistêmica nos parâmetros clínicos e microbiológicos de indivíduos diabéticos com periodontite crônica. Os resultados mostraram uma pequena melhora clínica e microbiológica no grupo que recebeu o antibiótico.

Tsalikis et al. (2014), avaliaram os efeitos da doxaciiclina sistêmica nos parâmetros clínicos e em 15 espécies bacterianas subgengivais. Os resultados

demonstraram que este antibiótico não foi efetivo para vários microrganismos estudados, e que não houve diferença entre os dois grupos nos parâmetros clínicos ou microbiológicos estudados. Os autores concluíram que o uso adjunto da doxiciclina sistêmica não levou a uma melhora significativa nos efeitos da RAR em indivíduos com DM tipo 2 bem controlados.

Miranda et al. (2014) avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos do uso de metronidazol (MTZ) + amoxicilina (AMX) como adjuvantes para o tratamento de periodontite crônica em pacientes diabéticos tipo 2. O grupo que recebeu RAR + MTZ + AMX apresentou maior redução da média de profundidade de sondagem (PS) e ganho de inserção clínica, menor número de sítios com DP \geq 5 mm e um número reduzido de indivíduos com bolsas residuais \geq 9 do que o grupo controle após 1 ano de pós-terapia ($p < 0,05$). O grupo tratado com antibiótico também apresentou níveis reduzidos e maiores diminuições das três espécies do complexo vermelho, *Eubacterium nodatum* e *Prevotella intermedia*, em comparação com o grupo controle em 1 ano ($p < 0,05$). Sendo assim, os resultados mostraram que o uso adjunto de MTZ + AMX melhorou significativamente os resultados clínicos e microbiológicos da RAR no tratamento de diabéticos tipo 2 com periodontite crônica.

Tamashiro et al. (2016) também apresentaram resultados favoráveis quanto ao uso do metronidazol e da amoxicilina. O objetivo do estudo foi avaliar as alterações ocorridas na composição do biofilme subgingival e nos parâmetros clínicos periodontais de indivíduos com periodontite e diabetes mellitus tipo 2 tratados apenas por meio RAR ou combinados com metronidazol sistêmico (MTZ) e amoxicilina (AMX). Os resultados mostraram que o uso adjunto de MTZ + AMX melhora os resultados microbiológicos e clínicos da RAR no tratamento de indivíduos com periodontite crônica generalizada e DM tipo 2 até 2 anos.

Embora um número considerável de estudos tenha testado protocolos terapêuticos diferentes para indivíduos com DM, poucos deles compararam a eficiência de tais terapias entre indivíduos diabéticos e não diabéticos. Algumas investigações mostraram que os indivíduos diabéticos e não diabéticos não diferem nas respostas clínicas a curto ou longo prazo após o tratamento periodontal não cirúrgico ou cirúrgico (Tervonen et al., 1991, Christgau et al., 1998, Sonoki et al., 2006, da Cruz et al., 2008, Kardeşler et al., 2010). Por outro lado, outros estudos demonstraram que os sujeitos diabéticos apresentam uma pior resposta periodontal

em relação a alguns parâmetros quando comparados com indivíduos sistemicamente saudáveis após a terapia periodontal (Navarra-Sanchez et al., 2007, Kardeşler et al. 2011, Altamash et al., 2016). Apesar dos achados anteriores destacarem grandes benefícios de MTZ mais AMX como adjuvantes da RAR sobre a RAR apenas, em pacientes diabéticos tipo 2 (Miranda et al., 2014, Tamashiro et al., 2016), os efeitos deste protocolo ainda não foram comparados entre pacientes diabéticos e pacientes não diabéticos até o momento. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos clínicos e microbiológicos do uso de MTZ e AMX como adjuvantes da RAR para o tratamento da periodontite crônica (PC) em indivíduos diabéticos e não diabéticos.

2. PROPOSIÇÃO

Comparar os efeitos clínicos e microbiológicos do uso do metronidazol (MTZ) e da amoxicilina (AMX) como adjuvantes à raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento da periodontite crônica (PC) em indivíduos diabéticos e não diabéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de indivíduos

A população do estudo foi composta por pacientes de uma base de dados do Centro de Pesquisa Clínica da Universidade Guarulhos (Brasil). Cinquenta e oito indivíduos, 29 indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DM) e 29 pacientes não diabéticos com periodontite crônica (PC) generalizada não tratada (Armitage 1999) foram obtidos a partir desta base de dados. Todos os sujeitos participaram de um dos estudos clínicos realizados neste centro de pesquisa entre dezembro de 2009 e outubro de 2012. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e terapias a serem utilizadas. A participação na pesquisa foi voluntária e os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo com a Resolução nº 466/2012 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão – periodontite crônica

Para a inclusão no estudo, a seleção dos participantes respeitou os seguintes critérios:

- Voluntários portadores de periodontite crônica;
- Idade igual ou superior a 30 anos;
- Possuir um mínimo de 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares e dentes considerados perdidos;
- Mais de 30% dos sítios com profundidade à sondagem e nível clínico de inserção ≥ 4 mm e sangramento á sondagem no tempo inicial;
- Mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio com profundidade à sondagem e nível clínico de inserção ≥ 5 mm.

Critérios de inclusão – indivíduos diabéticos

- Diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 há cinco anos ou mais;
- Tratados com dieta, insulina ou medicamentos orais hipoglicemiantes;

- Níveis da hemoglobina glicada $\geq 6,5\% \leq 11\%$.

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos.
- Gestantes ou lactantes;
- Histórico de tratamento periodontal prévio nos últimos doze meses;
- Histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- Histórico de uso de antissépticos orais, que continham antimicrobianos, nos últimos três meses;
- Doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento (exceto DM);
- Complicações graves de DM, incluindo doenças cardiovasculares e vasculares periféricas (úlceras, gangrena e amputação), neuropatia e nefropatia;
- Uso prolongado de medicações anti-inflamatórias ou imunossupressores;
- Relato de alergia ao metronidazol e/ou à penicilina;
- Reabilitações protéticas extensas.

3.3 Delineamento do estudo

O tamanho ideal da amostra para assegurar potência adequada para este estudo foi baseado na porcentagem (%) de pacientes que atingiram ≤ 4 sítios com PS ≥ 5 mm, o que foi considerado um desfecho clínico da terapia em um estudo anterior (Feres et al., 2012). Considerando uma diferença de 30 pontos percentuais (pp) entre o grupo diabético e o grupo controle para os voluntários que alcançaram este desfecho clínico em um ano após o tratamento (Feres et al., 2012) e um nível de significância de 5%, seriam necessários 29 indivíduos por grupo para conseguir uma potência de 80%. Portanto, 29 pacientes diabéticos e 29 não diabéticos com PC que receberam RAR mais MTZ (400 mg, 3 vezes ao dia) e AMX (500 mg) por 14 dias foram selecionados aleatoriamente de nosso banco de dados e analisados no presente estudo.

Durante a participação no estudo, todos os indivíduos receberam monitoramento clínico e microbiológico, de acordo com o protocolo especificado nas

duas sessões seguintes (ver 3.4 Avaliação clínico-periodontal e 3.5 Avaliação microbiológica), seguido de raspagem supragengival de todos os dentes e instrução de higiene oral. Todos os voluntários foram orientados a utilizar o mesmo dentífrico contendo triclosan/gantrez (Colgate Total[®], Anakol Ind. Com. Ltda-Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Um assistente monitorou a compliance da ingestão de antibiótico chamando os pacientes 3 vezes por semana durante o período de medicação. Na qual, os indivíduos traziam os frascos de volta no final de cada semana, assim era verificado se restaram pílulas de antibióticos. No dia 14 da medicação, os indivíduos responderam a um questionário (administrado pelo assistente) sobre quaisquer efeitos colaterais percebidos pelos próprios indivíduos. Antimicrobianos locais não foram utilizados durante o curso do estudo. As sessões de terapia de suporte foram realizadas aos 3, 6 e 9 meses pós-terapias.

3.4 Avaliação clínico-periodontal

O exame clínico-periodontal foi efetuado no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo. Calibrações intra-examinador foram realizadas para calcular o erro padrão da medida. A variabilidade intra-examinador varia entre 0,21 e 0,23 mm para a PS e entre 0,24 e 0,25 mm para a NCI. A concordância intra-examinador para as variáveis categóricas (por exemplo, SS) foi > 85% (teste Kappa) para todos os examinadores. Devido à natureza deste estudo no qual os dados foram extraídos de um banco de dados, a calibração interexaminador não pôde ser realizada.

As mensurações clínicas foram realizadas no início do estudo, 90, 180 e 360 dias pós-terapia, em seis sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares) utilizando-se sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15 HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os parâmetros clínicos avaliados incluíram:

- Índice de Placa Visível - (IPV) (AINAMO & BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa supra gengival visível;
- Índice de Sangramento Gengival - (ISG) (AINAMO & BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento da

gengiva marginal, após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival;

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

3.5 Avaliação microbiológica

3.5.1 Seleção dos sítios-testes

Foram selecionados seis sítios em cada voluntário, distribuídos uniformemente de acordo com a profundidade de sondagem inicial nas seguintes categorias (2 sítios por categoria): rasas (PS \leq 3mm), intermediárias (PS 4-6 mm), e profundas (PS \geq 7mm). Quando um dos 2 sítios profundos não foi encontrado, o mesmo foi substituído por sítio intermediário. Estes sítios estavam localizados em faces dentais interproximais não contíguas, e preferencialmente distribuídos entre os quatro quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados. Amostras de biofilme foram coletadas no início do estudo, 90 e 360 dias pós-terapia.

3.5.2 Coleta das amostras de biofilme subgengival

Após a remoção de cálculo e biofilme supragengivais, as amostras de biofilme subgengival foram retiradas com curetas Gracey do tipo minifive 11-12 esterilizadas, posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único golpe de raspagem no sentido ápico-coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150 μ L de solução tampão TE (10 mM Tris-

HCL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 mM EDTA (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil), pH 7,6, e a estas foi acrescentado 100µL de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Esses tubos plásticos foram previamente identificados com o código do indivíduo, data e sítio, e após a coleta foram armazenados sob refrigeração a -20°C até as amostras serem analisadas por meio da técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 cepas bacterianas no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da UnG.

3.5.3 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).

3.5.4 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 microcentrífuga 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, C₁₂H₂₅NaO₄S, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias gram-positivas foram lisadas em 150µL 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 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994c; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

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
Actinomyces ssp		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 naeslundii II</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>	14201 ^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

3.5.5 Checkerboard DNA-DNA hybridization

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA – Figura 2) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). 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 (SOCRANSKY et al., 1994c; HAFFAJEE et al., 1997). A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. 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 (Na_2HPO_4 , 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 3) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 ng/mL, em 130 μL de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de Na_2HPO_4 (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C .

3.5.6 Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunelectrics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na_2HPO_4 , a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. 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, 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.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, 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 10^5 e 10^6 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.

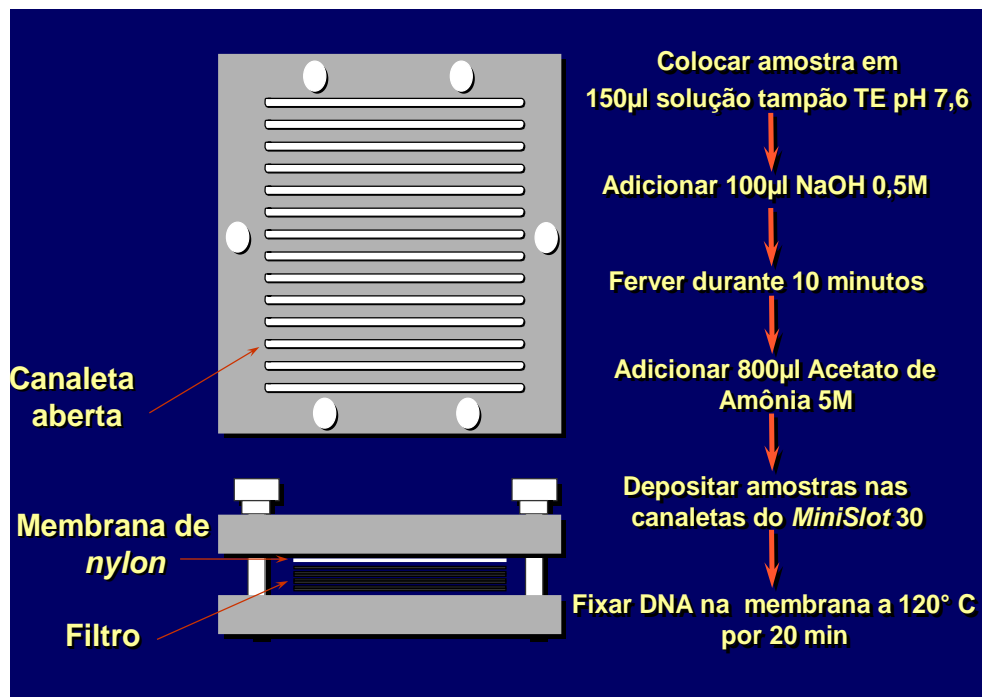


Figura 1. Representação gráfica do Minislot 30 (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon (técnica checkerboard DNA-DNA hybridization).

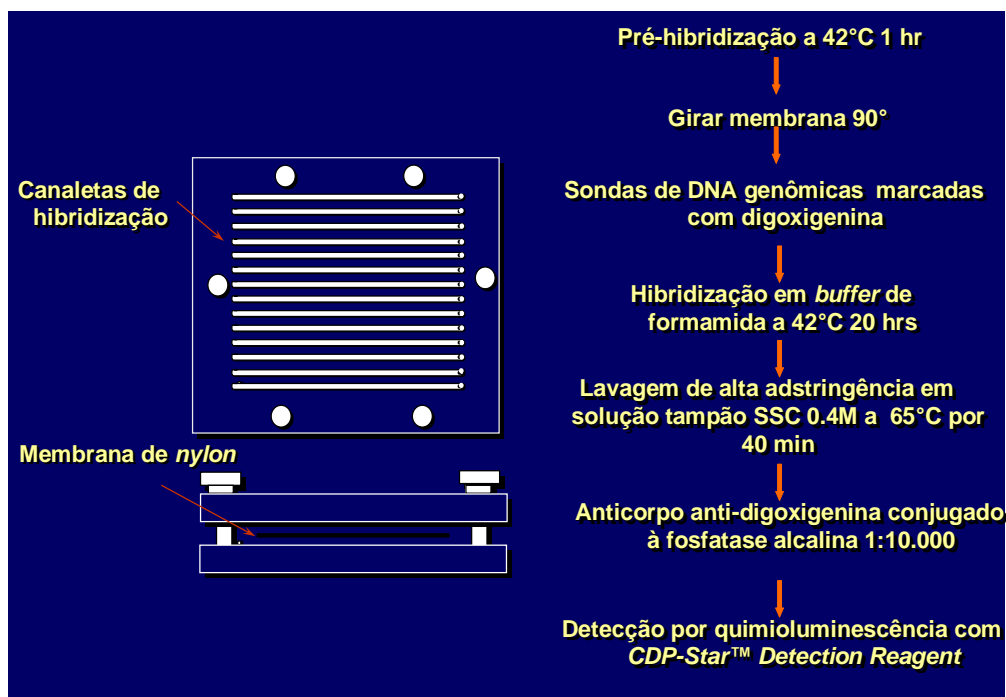


Figura 2. Representação gráfica do Miniblotter 45 (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica checkerboard DNA-DNA hybridization).

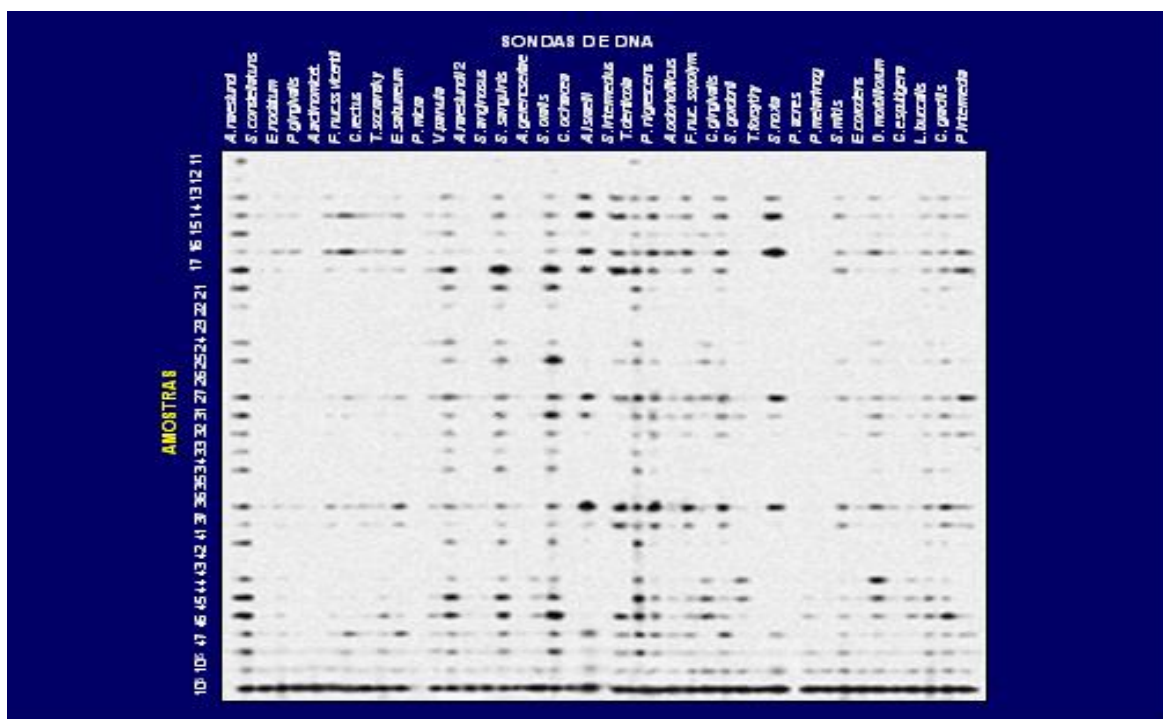


Figura 3. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*).

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

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

3.6 Procedimentos terapêuticos

3.6.1 Terapia periodontal básica

Após o registro das medidas clínicas, todos os indivíduos foram submetidos a sessões de adequação do meio bucal que incluíam instrução de higiene oral (IHO), raspagem supra gengival de todos os dentes (RSP) com instrumentos manuais, desgaste de restaurações em excesso, selamento provisório das lesões cáries cavitadas, curativos endodônticos e exodontias. Durante as sessões de instrução de higiene bucal, os indivíduos foram orientados a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental Colgate Total® (Anacol Ind. E Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Em seguida, os indivíduos receberam seis sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy) sob anestesia local. Estas sessões de RAR foram realizadas para ambos os grupos, por dois alunos treinados do Mestrado em Odontologia da Universidade Guarulhos, com duração de aproximadamente 1 hora e a terapia periodontal foi completada em 14 dias.

Os dois examinadores realizaram os exames clínicos e também a terapia de RAR, porém aquele examinador responsável pela execução da RAR não realizava os exames no mesmo indivíduo.

As necessidades adicionais de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da clínica odontológica da própria universidade.

3.6.2 Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos

Os indivíduos dos dois grupos receberam RAR e administração de 1,2 g/dia de metronidazol (400mg de 8/8 horas) combinado a 1,5 g/dia de amoxicilina (500mg de 8/8 horas) via oral por 14 dias, iniciada em conjunto a terapia periodontal básica. Os antibióticos foram manipulados especialmente para este estudo na Farmácia de Manipulação Pharmédica (São Paulo, SP, Brasil). Todas as cápsulas apresentaram a mesma coloração e tamanho, e foram estocados em frascos plásticos leitosos com 21 unidades, devidamente codificados. Quanto ao controle da ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, os indivíduos foram orientados a retornar na próxima semana à clínica de Odontologia-UNG, trazendo o frasco vazio para depois receber outro frasco contendo a mesma medicação. Além disso,

também foram monitorados de 4 em 4 dias, pessoalmente ou via telefone, por um aluno de iniciação científica. Após o término do período de administração da droga e/ou placebo, os indivíduos responderam a um questionário sobre possíveis reações adversas da medicação.

4. Artigo científico

One-year clinical and microbiological responses of diabetic and non-diabetic subjects to the adjunctive use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of periodontitis

Lina Lameh Smeili Yassine¹, Poliana Mendes Duarte¹, Geisla Mary Silva Soares¹, Tamires Szeremeske Miranda¹, Marcelo Faveri¹, Magda Feres¹, Luciene Cristina Figueiredo¹

¹Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, São Paulo, Brazil.

Running title: Antibiotics for diabetic and non-diabetic subjects

Key-words: chronic periodontitis; diabetes mellitus; root planing; dental scaling; amoxicillin, metronidazole

Address for correspondence (fax number and e-mail can be published):

Poliana Mendes Duarte

Universidade Guarulhos - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

Praça Tereza Cristina, 229 - Centro

Guarulhos - SP - Brazil

Zip code: 07.023-070

Telephone number: +55 (11) 2464-1758

Fax number: +55 (11) 2464-1758

e-mail: pduarte@ung.br

Abstract

Aim: To compare the clinical and microbiological effects of the use of metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) as adjuncts to scaling and root planing (SRP) for the treatment of chronic periodontitis (ChP) in diabetic and non-diabetic subjects.

Material and Methods: Twenty-nine type 2 diabetic subjects and 29 non-diabetic subjects with generalized ChP received SRP with MTZ [400 mg/trice a day (TID)]+AMX (500mg/TID) for 14 days. Subgingival biofilm samples were analyzed by checkerboard DNA-DNA hybridization for 40 bacterial species. Clinical and microbiological monitoring was performed at baseline, 3, 6 and 12 months post-therapy.

Results: All periodontal parameters and the proportion of the red complex improved for both groups up to 1-year post-therapy ($p < 0.05$). The diabetic group presented lower clinical attachment (CA) gain from baseline to 1-year post-therapy and higher mean proportions of the red and orange complexes at 1 year than the non-diabetic group ($p < 0.05$). The mean reductions of sites with probing depth (PD) ≥ 5 mm and ≥ 6 mm between the baseline and 1-year evaluation did not differ significantly between groups ($p > 0.05$). Furthermore, 68.9% and 75.9% of non-diabetic and diabetics subjects, respectively, reached the clinical endpoint for treatment (≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm) at 1-year post-therapy ($p > 0.05$).

Conclusions: Type 2 diabetic subjects presented a trend toward a worse response in terms of CA gain and microbial profile, but reached the clinical endpoint for treatment at 1-year post-therapy comparable to the non-diabetic ones.

Source of funding: São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil, #07/55291-9, 11/14872-4, 13/01072-5).

Introduction

The clinical and microbiological endpoints for a successful periodontal therapy include the gain in clinical attachment and reductions in probing depth (PD), signs of inflammation and proportions of pathogenic bacterial species, and ultimately, impediment of disease progression. Although scaling and root planing (SRP) is an essential procedure in the treatment of periodontitis, when applied alone, it may not lead to effective clinical and microbiological changes in order to achieve these endpoints successfully.

Therefore, systemic antibiotics have been suggested as adjunctive therapies able to overcome some limitations of SRP, especially in patients with advanced periodontitis and increased risk of disease progression. A recent systematic review compiling data from 13 randomized clinical trials (RCT) demonstrated that, in general, systemic antibiotics as adjuncts to SRP provided more clinical benefits than SRP alone in the treatment of diabetic subjects with periodontitis (Grellmann et al. 2016). In this review, 10 RCT evaluated the effects of doxycycline (Grossi et al. 1997, Llambés et al. 2005, Singh et al. 2008, O'Connell et al. 2008, Al-Zahrani et al. 2009, Deo et al. 2010, Gilowski et al. 2012, Gaikwad et al. 2013, Tsalikis et al. 2014, Al-Nowaiser et al. 2014), one amoxicillin plus clavulanate (Rodrigues et al. 2003), one azithromycin (Botero et al. 2013) and one the combination of metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX) (Miranda et al. 2014). In the light of the results of the abovementioned systematic review (Grellmann et al. 2016), it is possible to verify

that the single RCT (Miranda et al. 2014) evaluating the association of MTZ and AMX showed better clinical outcomes than the RCTs evaluating other antibiotic protocols.

Although a considerable number of studies have tested different therapeutic protocols for subjects with DM, few of them have compared the efficiencies of such therapies between diabetic and non-diabetic subjects. Some investigations have showed that diabetic and non-diabetic subjects do not differ in short-term or long-term clinical responses after non-surgical or surgical periodontal treatment (Tervonen et al. 1991 Westfelt et al. 1996, Christgau et al. 1998, Sonoki et al. 2006, da Cruz et al. 2008, Kardeşler et al. 2010). On the other hand, other studies have demonstrated that diabetic subjects present a worse periodontal response in relation to some parameters when compared to systemically healthy subjects after periodontal therapy (Correa et al. 2008, Navarro-Sanchez et al. 2007, Kardeşler et al. 2011, Altamash et al. 2016). Despite the previous findings highlighting great benefits of MTZ plus AMX as adjuncts to SRP over SRP alone in type 2 diabetic patients (Miranda et al. 2014, Tamashiro et al. 2016), the effects of this protocol have not yet been compared between diabetic and non-diabetic patients so far. Therefore, the aim of this study was to compare the clinical and microbiological effects of the use of MTZ and AMX as adjuncts to SRP for the treatment of chronic periodontitis (ChP) in diabetic and non-diabetic subjects.

Material and Methods

Sample size calculation

The ideal sample size to assure adequate power for this study was based on the percentage (%) of patients reaching ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm, which was considered a clinical endpoint of therapy in a previous study (Feres et al. 2012).

Considering a difference of 30 percentage points (pp) between diabetic and control group for volunteers achieving this clinical endpoint at 1 year post-treatment (Feres et al. 2012) and a significance level of 5%, 29 subjects per group would be necessary to provide a power of 80%. Therefore, 29 diabetic and 29 non-diabetic subjects with ChP that received SRP plus MTZ (400 mg) and AMX (500 mg) for 14 days were randomly selected from our database and analyzed in the current study.

Subject population

The study population comprised patients from a database of The Center for Clinical Research at Guarulhos University (Latin America, Brazil). Fifty-eight subjects, 29 subjects with type 2 diabetes mellitus (DM) and 29 non-diabetic patients with untreated generalized ChP (Armitage 1999) were obtained from this database. All subjects participated of one of RCTs conducted in this center between December 2009 and October 2012. The eligible subjects were informed of the nature, potential risks and benefits of their participation in respective RCT and signed an informed consent form. The Guarulhos University Clinical Research Ethics Committee approved all RCTs conducted with these patients.

Inclusion and exclusion criteria

General

General inclusion criteria were: ≥ 30 years of age, at least 15 teeth (excluding third molars and teeth with advanced decay indicated for extraction), more than 30% of the sites with PD and clinical attachment level (CAL) ≥ 4 mm and bleeding on probing (BoP) at baseline and a minimum of six teeth with at least one site with PD and CAL ≥ 5 mm.

General exclusion criteria were: pregnancy, breast-feeding, current smoking and smoking within the past 5 years, subgingival periodontal therapy in the previous 12 months, antimicrobial therapies during the previous 6 months, medical conditions requiring prophylactic antibiotic coverage, continuous use of mouthrinses containing antimicrobials in the preceding 3 months, systemic conditions (except DM) that could affect the progression of periodontitis (e.g. immunological disorders, osteoporosis), long-term administration of anti-inflammatory and immunosuppressive medications, allergy to MTZ and/or AMX and extensive prosthetic rehabilitation.

Subjects with DM

Inclusion criteria for diabetic patients were: diagnosis of type 2 DM for ≥ 5 years, DM treatment with diet and insulin supplementation or oral hypoglycemic agents, glycated hemoglobin (HbA1c) levels $\geq 6.5\% \leq 11\%$.

Exclusion criteria for diabetic patients were: major complications of DM including cardiovascular and peripheral vascular diseases (ulcers, gangrene and amputation), neuropathy and nephropathy.

Treatment protocol

Firstly, subjects received supragingival plaque and calculus removal, extraction of teeth with advanced decay, provisional restoration and filling overhang removal, as necessary. They were also instructed regarding the brushing technique and received the same brand of toothpaste during the course of the study (Colgate Total®, Colgate Palmolive Co., São Paulo, SP, Brazil). Trained periodontists performed SRP in four to six appointments lasting approximately 1 h each, using manual cures (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 end point for each SRP appointment was the “smoothness of the scaled roots”, which was checked by the respective RCT coordinator. Immediately after the first session of SRP, the subjects received MTZ (400 mg thrice a day [TID] for 14 days) and AMX (500 mg TID for 14 days). Local antimicrobials were not used during the course of the study. Supportive therapy sessions were performed at 3, 6, 9 and 12 months post-therapies.

Compliance and adverse events monitoring

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

Clinical monitoring

Subjects received clinical monitoring at baseline, 3, 6 and 12 months post-therapies. Intra-examiner calibrations were performed to calculate the standard error of measurement. Intra-examiner variability varies between 0.21 and 0.23 mm for PD and between 0.24 and 0.25 mm for CAL. The intra-agreement for categorical variables (e.g. BoP) was >85% (Kappa-light test) for all examiners. Due to the nature of this study in which the data were extracted from a database, inter-examiner calibration could not be performed. Visible plaque (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).

Microbiological monitoring

Microbiological monitoring was performed at baseline, 3 and 12 months post-therapies. Subgingival biofilm samples per patient were collected from six non-contiguous interproximal sites presenting no furcation involvement; two sites from each of the following baseline PD categories: shallow ($PD \leq 3\text{mm}$), moderate ($PD = 4\text{-}6\text{mm}$) and deep ($PD \geq 7\text{ mm}$). After supragingival plaque removal, the biofilm was collected using individual sterile mini-Gracey curettes and evaluated for 40 bacterial species by checkerboard DNA-DNA hybridization, as previously described (Mestnik et al. 2010).

Primary and secondary outcome variables

The primary outcome variable was the difference between groups for the percentage of subjects reaching the clinical endpoint of therapy (i.e. ≤ 4 sites with $PD \geq 5\text{mm}$) (Feres et al. 2012). Secondary outcome variables were differences between groups for: full-mouth PD and CAL, full-mouth percentages of sites with plaque, BoP, suppuration and full-mouth number and percentage of $PD \geq 5\text{mm}$ and $PD \geq 6\text{mm}$, changes in the number and percentage of sites $PD \geq 5\text{mm}$ and $PD \geq 6\text{mm}$ from baseline to 12 months, PD and CAL changes from baseline to 12 months at full-mouth, moderate and deep sites, proportions and changes in proportion from baseline to 12 months in bacterial species, proportion of the microbial complexes (Socransky et al. 1998) and occurrence of adverse events.

Statistical Analysis

The statistician performed all analyzes blindly. Clinical and microbiological parameters were computed per subject and across subjects in both groups. Changes in PD and CAL in full-mouth, moderate and deep sites, in bacterial proportions and in number of sites with PD ≥ 5 mm and PD ≥ 6 mm were averaged per subject and then across subjects in each group. The significance of differences between groups for age, clinical and microbiological parameters at baseline were compared by the Student's t-test and in the other time-points by Analysis of Covariance (ANCOVA), with adjustments for baseline values. ANCOVA with adjustments for baseline values was also used to detect differences between groups in the mean changes of PD, CAL, number and percentage of sites with PD ≥ 5 mm ≥ 6 mm and proportions of bacterial species. Repeated measures ANOVA and the Tukey's tests were used to detect differences within each group over time for clinical parameters. Friedman and the Dunn's tests were used to detect differences within each group over time for microbiological parameters. The Chi-square test was used to compare the frequency of gender and the Fisher's exact test the number of subjects that achieved or did not achieve the clinical endpoint for treatment (i.e. ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm) (Feres et al. 2012) at 1-year post-therapies and, frequency of subjects reporting adverse effects between groups. The level of significance was set at 5%. The data were evaluated using intention-to-treat analysis with last observation carried forward.

Results

Subject retention, compliance and adverse effects

Figure 1 presents the flow diagram of the study design. Fifty-eight subjects (29 non-diabetic and 29 diabetic) were selected in the database for the current study. Two subjects from the diabetic group were lost while no subject was lost in the control group over the course of the study. Fifty-seven subjects informed full adherence to the use of medications and, the empty bottles confirmed this information. One subject from the diabetic group had two pills left in the bottles on the 14th day. Seven and fourteen subjects from the non-diabetic and diabetic groups, respectively, reported at least one adverse effect of the medications, including headache, diarrhea, metallic taste, vomiting and irritability. No significant differences between groups were observed for the number of subjects reporting adverse effects ($p>0.05$).

Clinical results

Table 1 presents the demographic characteristics and the full-mouth clinical parameters at baseline, 3, 6 and 12 months post-therapy. There were no differences between groups for gender and age. Both groups exhibited statistically significant improvements in all clinical parameters at 3, 6 and 12 months post-therapy when compared to the baseline ($p<0.05$). The diabetic group presented higher mean CAL than the non-diabetic group at 3, 6 and 12 months post-therapy ($p<0.05$).

Table 2 presents the mean PD reduction and CAL gain from baseline to 1-year post-therapy. The diabetic group presented lower clinical attachment (CA) gain than the non-diabetic from baseline to 1-year post-therapy considering the full-mouth, moderate and deep sites ($p<0.05$).

Table 3 presents the mean number of sites with PD \geq 5mm and PD \geq 6mm at baseline, 3, 6 and 12 months post-therapy. There were significant reductions in the mean number of sites with PD \geq 5mm and PD \geq 6mm at 3, 6 and 12 months post-therapy when compared to baseline for diabetic and non-diabetic subjects ($p < 0.05$). Furthermore, the mean number of sites with PD \geq 5mm and \geq 6mm at 3, 6 and 12 months as well as their reductions from baseline to 1-year evaluation did not differ significantly between groups ($p > 0.05$).

The number and percentage of subjects achieving the clinical endpoint for treatment according to Feres et al. (2012) (i.e. ≤ 4 sites with PD \geq 5mm) at 1 year (primary outcome variable) is presented in Table 4. 68.9% and 75.9% of the non-diabetic and diabetics subjects, respectively, reached this outcome at 1-year post-therapy. The number of subjects who achieved the clinical endpoints did not differ significantly between groups ($p > 0.05$).

Microbiological results

Figure 2 presents the mean proportion at baseline, 3 and 12 months post-therapy and the mean changes in proportion from baseline to 1-year post-therapy of the 40 bacterial species evaluated. When compared to the baseline, the proportions of 13 and 6 bacterial species altered significantly in the non-diabetic and diabetic groups, respectively ($p < 0.05$). The three pathogens of the red complex (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*) and two species of the orange complex (*Eubacterium nodatum* and *Prevotella intermedia*) reduced while *Treponema socranskii*, *Prevotella melaninogenica*, *Campylobacter gracilis*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces oris* and *Actinomyces gerencseriae* increased in the non-diabetic group ($p < 0.05$). *T.*

forsythia, *P. gingivalis* and *Fusobacterium periodonticum* reduced while *T. socranskii*, *Capnocytophaga sputigena* and *Actinomyces naeslundii* increased in the diabetic group ($p < 0.05$). There was greater reduction in the mean proportion of *Streptococcus mitis*, *C. sputigena*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* and *Leptotrichia buccalis* in the non-diabetic than in the diabetic group from baseline 1-year post-therapy ($p < 0.05$). On the other hand, there was greater increase in the mean proportions of *A. gerencseriae*, *A. oris*, *C. gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea* and *Propionibacterium acnes* in the non-diabetic than in the diabetic group from baseline 1-year post-therapy ($p < 0.05$).

Figure 3 presents the mean proportion of the microbial complexes at baseline and 1-year post-therapy for non-diabetic and diabetic groups. The proposed therapy led to significant reductions in the proportion of the red and orange complexes and increases in the *Actinomyces* group, green complex and “others” in the non-diabetic group at 1-year post-therapy ($p < 0.05$). In addition, this therapeutic protocol also led to a significant reduction in the proportion of the red complex and increase in green complex in the diabetic group ($p < 0.05$). The non-diabetic group presented lower proportion of *Actinomyces* spp. at baseline and of the red and orange complexes at 1-year post-therapy than the diabetic group ($p < 0.05$).

Discussion

This study compared for the first time the effects of the combination of MTZ plus AMX as adjuncts to SRP between diabetic and non-diabetic. Overall, results demonstrated that this therapeutic protocol provided clinical and microbiological benefits for both groups at 1-year post-therapy. Non-diabetic subjects exhibited greater clinical and microbiological improvements than subjects with type 2 DM in

certain parameters, specifically in the reduction of CAL and some periodontal pathogens. Despite these differences between groups, ~69% of the non-diabetic subjects and ~76% of the diabetic subjects achieved the clinical endpoint for treatment (primary outcome variable; i.e. ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm) (Feres et al. 2012) at 1 year. In addition, non-diabetic and diabetic subjects did not significantly differ in other important clinical parameters, including the reduction in PD and in number of sites with PD ≥ 5 mm and ≥ 6 mm. Therefore, the findings of the current study indicate that despite a trend toward a worse response for diabetic subjects in the clinical attachment gain and microbial profile after therapy, diabetic and non-diabetic subjects remained with comparable low levels of residual pockets and, consequently, risk of disease progression and need of retreatment.

Although some studies have compared the effects of different periodontal therapies between non-diabetic and diabetic subjects, neither of them has employed systemic antibiotic as adjuncts to SRP, hampering a more straight comparison with the findings of the current study. Previous studies reported none or minor differences between non-diabetic and diabetic subjects in clinical parameters after mechanical therapy (Tervonen et al. 1991, Christgau et al. 1998, Sonoki et al. 2006, da Cruz et al. 2008, Gonçalves et al. 2008, Correa et al. 2008). On the other hand, other investigations have shown higher mean of PD, CAL and percentage of sites with PD ≥ 4 mm in diabetic than non-diabetic subjects post-SRP. Different findings among studies may be attributed to differences in methodological aspects including baseline disease severity, implementation of maintenance therapy, glycemic control of the diabetic subjects, type of DM, type of mechanical therapy (one session full-mouth debridement or quadrant-wise SRP), manner of data presentation and period of evaluation. In the current study, the only clinical difference between groups remains

in the CAL. Despite the statistical adjustment for baseline values, the uncontrolled type 2 diabetic subjects presented higher levels of CAL and lower clinical attachment gain in full-mouth, moderate and deep sites than the non-diabetic subjects up to one-year follow up. On the other hand, both groups did not differ in mean full-mouth PD, PD reduction in full-mouth, moderate and deep sites, number/percentage of sites with PD \geq 5 mm and \geq 6 mm as well as number/percentage of subjects that achieved the clinical endpoint (i.e. \leq 4 sites with PD \geq 5 mm) (primary outcome variable). Therefore, it seems that the pocket healing after the proposed therapy in the diabetic subjects was related more to gingival recession than gain of attachment. Most importantly, the majority of diabetic and non-diabetic subjects remained with low levels of residual pockets after the adjunctive use MTZ plus AMX and, consequently, under low risk for further attachment loss and low need of retreatment procedures, such as open flap debridement (Matuliene et al. 2008, 2010). Whenever possible, periodontal surgery should be avoid because it involves greater cost and time and increased risk of root exposure, aesthetic defects and morbidity, especially in diabetic patients who have poorer wound healing (Tsourdi et al. 2013).

Of note, studies that employed open-flap debridement in the treatment of diabetic subjects with periodontitis demonstrated lesser promise results in terms of residual pockets than the current study that used adjunctive AMX plus MTZ. Westfelt et al. (1996), for example, observed ~12% and ~16% of sites with PD \geq 4mm for non-diabetic and diabetic, respectively, at 1 year after open-flap debridement. In the current study, the percentage of sites with PD \geq 4 mm was 12% (data not shown) for both non-diabetic and diabetic subjects at one-year. Altamash et al. (2016) demonstrated that mean number of sites with PD \geq 6 mm decreased by 73% and by 44% for diabetics and non-diabetic subjects, respectively, at 6 month after surgical

debridement. On the other hand, in the present study, the mean number of sites with PD \geq 6 mm decreased by ~92.5% and by 96% for non-diabetic and diabetic subjects, respectively, at 6 months. Therefore, it seems that diabetic subjects respond worse to surgical therapy than non-diabetic subjects, but diabetic and non-diabetic subjects respond similarly to adjunct use of MTZ and AMX. Furthermore, it seems that the use of MTZ and AMX adjuncts to SRP promotes better clinical outcomes than surgical therapy, further reinforcing the advantages this antibiotic combination for the treatment of diabetic subjects with ChP.

Few investigations have focused on comparison of the microbiological effects of periodontal therapies between non-diabetic and diabetic subjects. A previous investigation using culture technique reported that the elimination of *P. gingivalis* was more effective in systemically healthy than diabetic patients after non-surgical therapy (Christgau et al. 1998). On the other hand, another study, using conventional PCR, did not find any differences regarding the frequency of detection of *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* after SRP of diabetic and non-diabetic subjects (da Cruz et al. 2008). In the current study, the microbiological results showed that non-diabetic subjects exhibited greater reduction in the proportions of some pathogenic species and remained with lower proportions of the red and orange complexes than the diabetic subjects at 1 year after therapy. However, it is important to highlight that even diabetic subjects exhibited a worse microbial profile than non-diabetic subjects at one-year post-treatment; this did not yield major clinical consequences. The previous RCT involving these diabetic subjects demonstrated that most of them (~75.9%) achieved the clinical endpoint for treatment (i.e. \leq 4 sites with PD \geq 5 mm) at 1 year post-therapy and maintained this condition up to two years (Miranda et al. 2014, Tamashiro et al. 2016). In fact, RCTs

and systematic reviews have shown that the use of MTZ+AMX yielded considerable advantages over SRP alone in the treatment periodontitis of subjects with or without risk factors (Sgolastra et al. 2012, Zandbergen et al. 2013, Fritoli et al. 2015, Zandbergen et al. 2016, Grellmann et al. 2016).

The main strength of this study is to be the first to directly compare the clinical and microbiological effects of adjunctive MTZ and AMX between type 2 diabetic and non-diabetic subjects. A weakness is that data were obtained from database and, therefore, some methodological aspects including inter-examiner calibrations could not be totally controlled. However, all subjects were treated in RCTs developed in the same research center using the same inclusion/exclusion criteria and therapeutic protocol.

In conclusion, type 2 diabetic subjects presented a trend toward a worse response in terms of CA gain and microbial profile, but reached the clinical endpoint for treatment at 1-year post-therapy comparable to the non-diabetic ones.

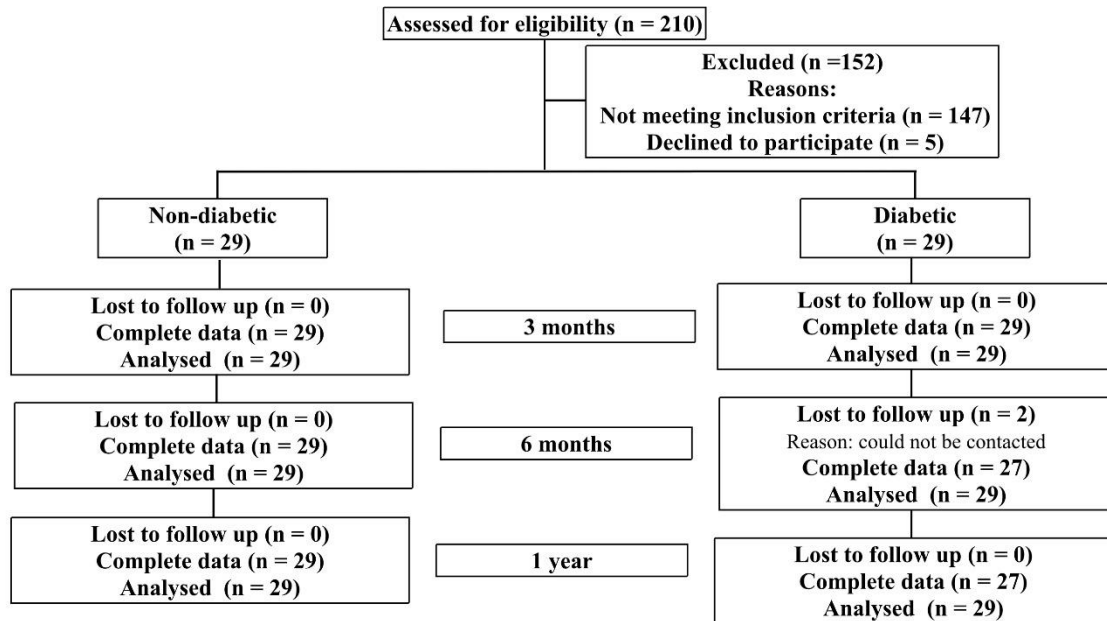


Figure 1 - Flow chart of the study design.

Table 1 - Demographic characteristics of the study population and mean (\pm SD) of full-mouth clinical parameters for both groups at baseline and follow-up visits.

Variable	Time-point	Groups		p-value
		Non-diabetic (n=29)	Diabetic (n=29)	
Gender (M/F)	Baseline	12/17	12/17	
Age (years)	Baseline	48.9 \pm 8.6	54.0 \pm 8.2	0.54
PD (mm)	Baseline	3.69 \pm 0.63 ^a	3.64 \pm 0.59 ^a	0.766
	3 months	2.56 \pm 0.38 ^b	2.65 \pm 0.18 ^b	0.239
	6 months	2.51 \pm 0.37 ^b	2.58 \pm 0.22 ^b	0.390
	12 months	2.48 \pm 0.39 ^b	2.53 \pm 0.22 ^b	0.612
CAL (mm)	Baseline	4.13 \pm 0.83 ^a	4.59 \pm 1.23 ^a	0.100
	3 months	3.19 \pm 0.74 ^b	3.84 \pm 0.96 ^b	0.005
	6 months	3.18 \pm 0.77 ^b	3.67 \pm 0.91 ^b	0.032
	12 months	3.12 \pm 0.72 ^b	3.73 \pm 0.95 ^b	0.007
Plaque accumulation (% sites)	Baseline	77.5 \pm 16.0 ^a	77.8 \pm 21.0 ^a	0.990
	3 months	40.0 \pm 24.5 ^b	30.2 \pm 17.5 ^b	0.084
	6 months	35.8 \pm 26.2 ^b	26.8 \pm 15.6 ^b	0.123
	12 months	35.1 \pm 21.0 ^b	32.0 \pm 12.6 ^b	0.487
BOP (% sites)	Baseline	61.3 \pm 22.5 ^a	40.7 \pm 14.0 ^a	0.055
	3 months	15.1 \pm 17.0 ^b	9.7 \pm 4.9 ^b	0.067
	6 months	13.5 \pm 12.4 ^b	9.4 \pm 5.2 ^b	0.128
	12 months	12.5 \pm 21.4 ^b	10.6 \pm 5.7 ^b	0.646
Suppuration (% sites)	Baseline	3.3 \pm 6.2 ^a	3.3 \pm 4.6 ^a	0.990
	3 months	0.0 \pm 0.1 ^b	0.1 \pm 0.6 ^b	0.333
	6 months	0.0 \pm 0.0 ^b	0.1 \pm 0.3 ^b	0.091
	12 months	0.0 \pm 0.2 ^b	0.2 \pm 0.6 ^b	0.255

M: Male; F: Female; PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; BOP: Bleeding on Probing; SD: standard deviation. Different letters indicate significant differences over time by repeated measures ANOVA and Tukey's tests ($p < 0.05$). The significance of differences between groups for age and clinical parameters at baseline were compared by the t-test ($p > 0.05$). The significance of differences between groups for clinical parameters at 3, 6 and 12 months were assessed by ANCOVA with adjustments for baseline values ($p < 0.05$). There were no differences between groups for gender by the Chi-square test ($p > 0.05$).

Table 2 - Mean PD reduction and CA gain (\pm SEM) between baseline and 12 months post-therapy.

Site category	Variable (mm)	Groups		ANCOVA p-value
		Non-diabetic (n=29)	Diabetic (n=29)	
Full-mouth	PD	1.18 \pm 0.05	1.13 \pm 0.05	0.4658
	CAL	0.98 \pm 0.07	0.79 \pm 0.07	0.0092
bPD 4-6mm	PD	1.85 \pm 0.07	1.80 \pm 0.07	0.6574
	CAL	1.62 \pm 0.08	1.34 \pm 0.08	0.0234
bPD \geq 7mm	PD	3.92 \pm 0.17	3.89 \pm 0.18	0.6208
	CAL	3.33 \pm 0.16	2.90 \pm 0.17	0.0374

b: baseline; PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; SEM: standard error of the mean. A p-value <0.05 indicates differences between treatment groups by ANCOVA with adjustments for baseline values.

Table 3 - Mean number (\pm SD) of sites with PD \geq 5mm and PD \geq 6 mm at baseline and follow-up visits.

Variable	Time-point	Groups		p-value
		Non-Diabetic (n=29)	Diabetic (n=29)	
PD \geq 5 mm	Baseline	33.55 \pm 18.61 ^a	32.24 \pm 18.68 ^a	0.790
	3 months	4.72 \pm 6.21 ^b	4.55 \pm 3.30 ^b	0.895
	6 months	4.23 \pm 5.17 ^b	3.32 \pm 2.63 ^b	0.517
	12 months	4.12 \pm 4.80 ^b	4.00 \pm 3.39 ^b	0.729
	0-12 months	27.93 \pm 0.74	28.83 \pm 0.74	0.629
PD \geq 6 mm	Baseline	17.27 \pm 15.59 ^a	15.03 \pm 12.49 ^a	0.548
	3 months	1.31 \pm 1.948 ^b	0.93 \pm 1.31 ^b	0.387
	6 months	1.14 \pm 1.726 ^b	0.57 \pm 0.92 ^b	0.129
	12 months	0.86 \pm 1.575 ^b	0.90 \pm 1.50 ^b	0.990
	0-12 months	15.33 \pm 0.27	15.21 \pm 0.27	0.753

PD: probing depth; SD: standard deviation. Different letters indicate significant differences over time by repeated measures ANOVA and Tukey's tests ($p < 0.05$). The significance of differences between groups at baseline were compared by the t-test ($p > 0.05$). The significance of differences between groups at 3, 6 and 12 months was assessed by ANCOVA with adjustments for baseline values ($p < 0.05$).

Table 4 - Number and percentage of subjects who achieved or did not achieve the clinical endpoint for treatment (i.e. ≤ 4 sites with PD ≥ 5 mm) according to Feres et al. (2012), at 1-year post-therapies.

Clinical endpoint	Groups		Fisher p-value
	Non-Diabetic (n = 29)	Diabetic (n = 29)	
Achieved	20 (68.9%)	22 (75.9%)	0.4742
Not achieved	9 (31.1 %)	7 (24.2 %)	

There were no differences between groups by the Fisher's exact Test ($p > 0.05$).

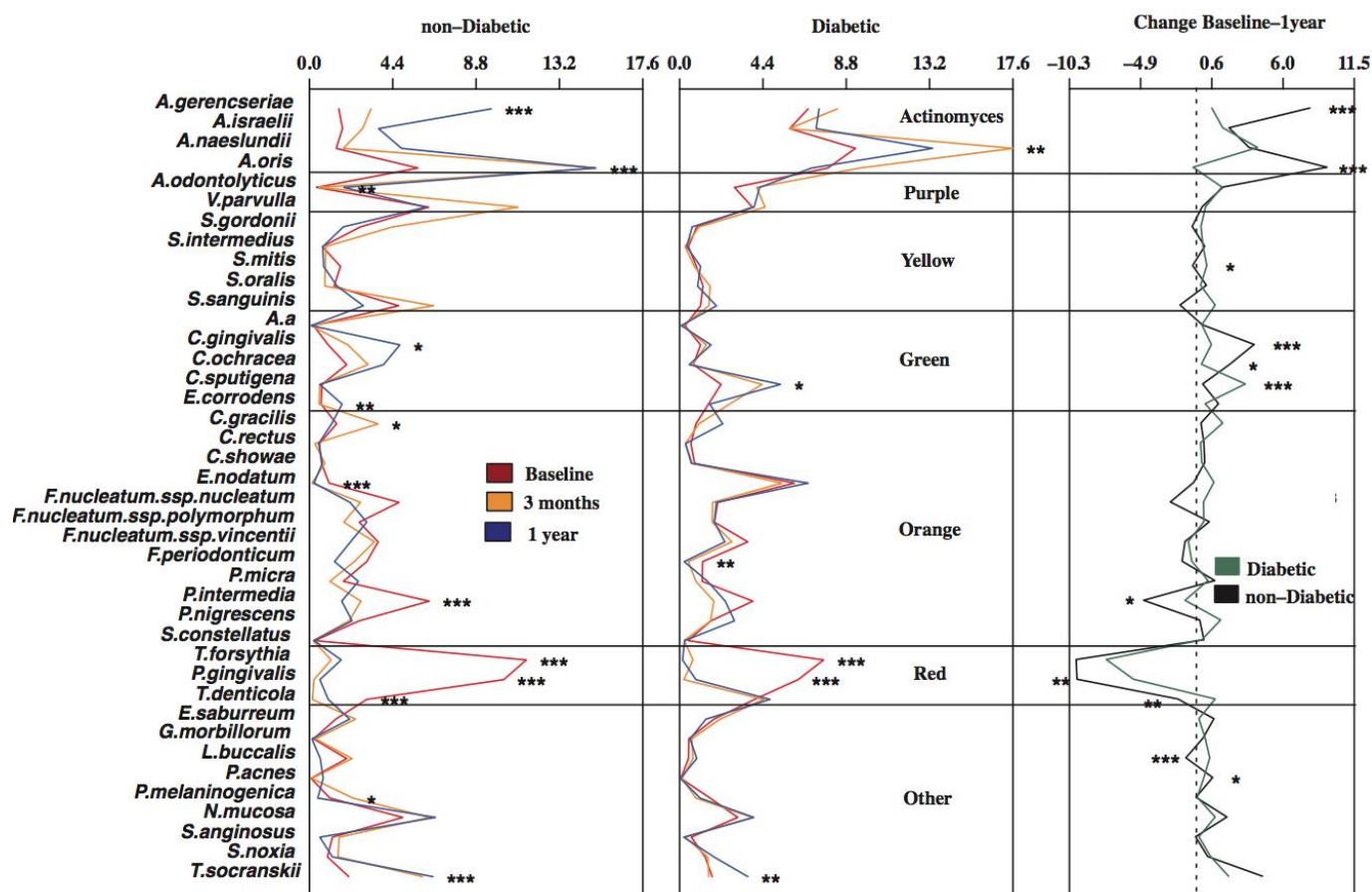


Figure 2 - Mean proportion (%) at baseline, 3 and 12 months post-therapy and mean changes in proportion from baseline to 1-year post-therapy of the 40 bacterial species evaluated. The species were ordered according to the microbial complexes described by Socransky et al. (1998). The significance of differences in the mean proportion of the bacterial species over time was assessed by the Friedman and Dunn's tests, and adjusted for 40 comparisons. The significance of differences between groups in the mean changes in proportion of the bacterial species from baseline to 1 year was assessed by ANCOVA, with adjustments for baseline values (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

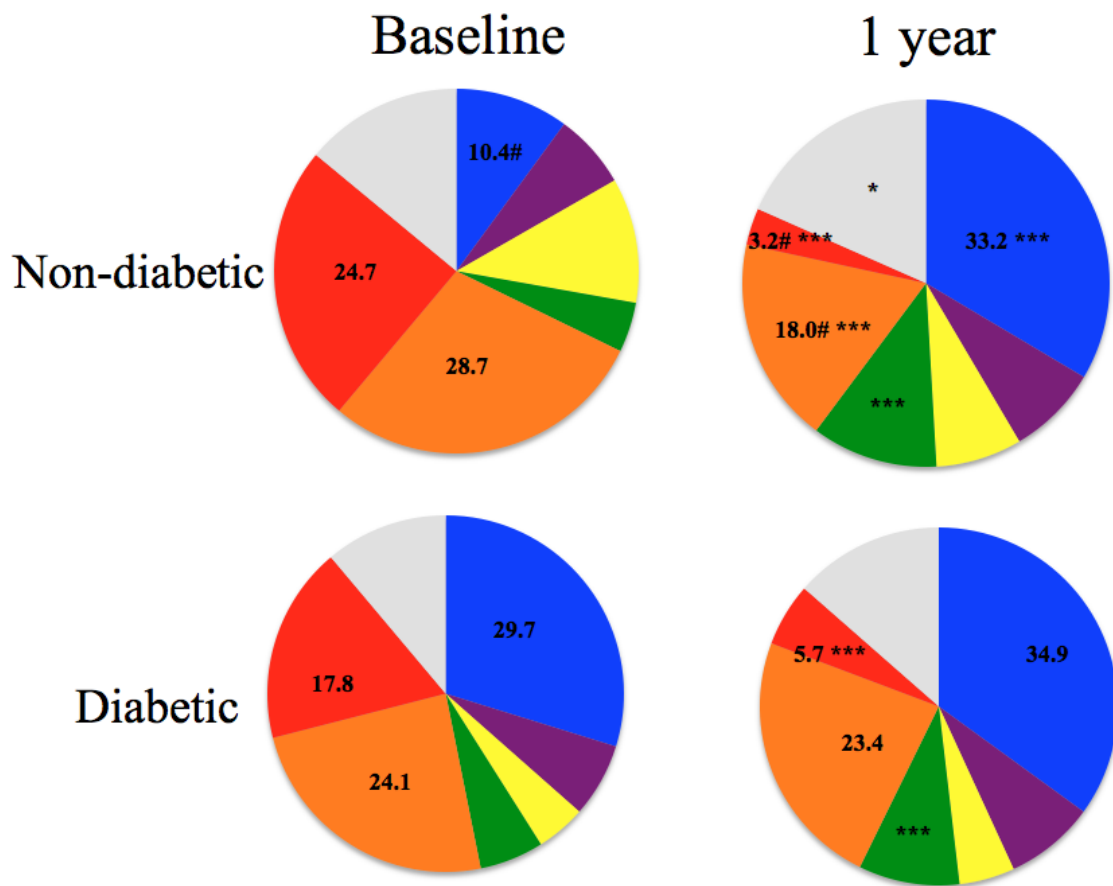


Figure 3 - Pie charts of the mean proportion of each microbial complex at baseline and 1-year post-therapy for non-diabetic and diabetic groups. The colors represent the different complexes described by Socransky et al. (1998). The gray color represents species that did not fall into any complex, and *Actinomyces* species are represented in blue. The significance of differences between baseline and 1-year post-therapy was assessed using the Wilcoxon test (*** $p < 0.001$, and * $p < 0.05$). The significance of differences between groups at each time point was assessed using the Mann-Whitney test ($p < 0.05$).

References

Al-Nowaiser AM, Al-Zoman H, Baskaradoss JK, Robert AA, Al-Zoman KH, Al-Sohail AM, Al-Suwyed AS, Ciancio SG, Al-Mubarak SA. Evaluation of adjunctive systemic doxycycline with non-surgical periodontal therapy within type 2 diabetic patients. *Saudi Med J*. 2014 Oct;35(10):1203-9.

Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol*. 2009 Oct;80(10):1568-73.

Altamash M, Klinge B, Engström PE. Periodontal treatment and HbA1c levels in subjects with diabetes mellitus. *J Oral Rehabil*. 2016 Jan;43(1):31-8.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6.

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.

Christgau M, Palitzsch KD, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):112-24.

Correa FO, Gonçalves D, Figueredo CM, Gustafsson A, Orrico SR. The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing levels of interleukin-1beta and proteases in gingival crevicular fluid from patients with type 2 diabetes mellitus and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2008 Nov;79(11):2143-50.

da Cruz GA, de Toledo S, Sallum EA, Sallum AW, Ambrosano GM, de Cássia Orlandi Sardi J, da Cruz SE, Gonçalves RB. Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2008 Jul;79(7):1150-7.

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):009-16.

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.

Gaikwad SP, Gurav AN, Shete AR, Desarda HM. Effect of scaling and root planing 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.

Gilowski L, Kondzielnik P, Wiench R, Płocica I, Strojek K, Krzemiński TF. Efficacy of short-term adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in diabetic patients--randomized study. *Oral Dis.* 2012 Nov;18(8):763-70.

Gonçalves D, Correa FO, Khalil NM, de Faria Oliveira OM, Orrico SR. The effect of non-surgical periodontal therapy on peroxidase activity in diabetic patients: a case-control pilot study. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(9):799-806.

Grellmann AP, Sfreddo CS, Maier J, Lenzi TL, Zanatta FB. Systemic antimicrobials adjuvant to periodontal therapy in diabetic subjects: a meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2016 Mar;43(3):250-60.

Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, Genco RJ. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycosylated hemoglobin. *J Periodontol.* 1997 Aug;68(8):713-9.

Kardeşler L, Buduneli N, Cetinkalp S, Kinane DF. Adipokines and inflammatory mediators after initial periodontal treatment in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010 Jan;81(1):24-33.

Kardeşler L, Buduneli N, Çetinkalp S, Lappin D, Kinane DF. Gingival crevicular fluid IL-6, tPA, PAI-2, albumin levels following initial periodontal treatment in chronic periodontitis patients with or without type 2 diabetes. *Inflamm Res.* 2011 Feb;60(2):143-51.

Llambés F, Silvestre FJ, Hernández-Mijares A, Guiha R, Caffesse R. Effect of non-surgical periodontal treatment with or without doxycycline on the periodontium of type 1 diabetic patients. *J Clin Periodontol.* 2005 Aug;32(8):915-20.

Matuliene G, Pjetursson BE, Salvi GE, Schmidlin K, Brägger U, Zwahlen M, Lang NP. Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance. *J Clin Periodontol.* 2008 Aug;35(8):685-95.

Matuliene G, Studer R, Lang NP, Schmidlin K, Pjetursson BE, Salvi GE, Brägger U, Zwahlen M. Significance of Periodontal Risk Assessment in the recurrence of periodontitis and tooth loss. *J Clin Periodontol.* 2010 Feb;37(2):191-9. 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.

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.

Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007 Oct;34(10):835-43.

O'Connell PA, Taba M, Nomizo A, Foss Freitas MC, Suaid FA, Uyemura SA, Trevisan GL, Novaes AB, Souza SL, Palioto DB, Grisi MF. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol.* 2008 May;79(5):774-83.

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.

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.* 2012 Oct;83(10):1257-69.

Singh S, Kumar V, Kumar S, Subbappa A. The effect of periodontal therapy on the improvement of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial. *Int J Diabetes Dev Ctries.* 2008 Apr;28(2):38-44.

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.

Sonoki K, Nakashima S, Takata Y, Naito T, Fujisawa K, Ootsubo T, Wakisaka M, Iwase M, Iida M, Yokota M. Decreased lipid peroxidation following periodontal therapy in type 2 diabetic patients. *J Periodontol.* 2006 Nov;77(11):1907-13.

Tamashiro NS, Duarte PM, Miranda TS, Maciel SS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Amoxicillin Plus Metronidazole Therapy for Patients with Periodontitis and Type 2 Diabetes: A 2-year Randomized Controlled Trial. *J Dent Res*. 2016 Jul;95(7):829-36.

Tervonen T, Knuuttila M, Pohjamo L, Nurkkala H. Immediate response to nonsurgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1991 Jan;18(1):65-8.

Tsalikis L, Sakellari D, Dagalis P, Boura P, Konstantinidis A. Effects of doxycycline on clinical, microbiological and immunological parameters in well-controlled diabetes type-2 patients with periodontal disease: a randomized, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2014 Oct;41(10):972-80.

Tsourdi E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A, Bornstein SR. Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus. *Biomed Res Int*. 2013;2013:385641.

Westfelt E, Rylander H, Blohmé G, Jonasson P, Lindhe J. The effect of periodontal therapy in diabetics. Results after 5 years. *J Clin Periodontol*. 1996 Feb;23(2):92-100.

Zandbergen D, Slot DE, Cobb CM, Van der Weijden FA. The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *J Periodontol*. 2013 Mar;84(3):332-51.

Zandbergen D, Slot DE, Niederman R, Van der Weijden FA. The concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole compared to scaling and root planing alone in treating periodontitis: a systematic review. *BMC Oral Health*. 2016 Feb 29;16:

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol 2000.* 2004;36:121-45. Review

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 Mar;39(3):284-94.doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01795.x. Epub 2012 Jan 4.

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. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.06.010. Epub 2013 Jul 1.

Bonito AJ, Lux L, Lohr KN. Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review. *J Periodontol.* 2005 Aug;76(8):1227-36. Review. Erratum in: *J Periodontol.* 2006 Feb;77(2):326.

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. doi: 10.1111/jre.12058. Epub 2013 Feb 27. PubMed PMID: 23441920.

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.

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. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x. Epub 2012 Jul 4.

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. doi: 10.1902/jop.2009.080540.

Choi YH, McKeown RE, Mayer-Davis EJ, Liese AD, Song KB, Merchant AT. Association between periodontitis and impaired fasting glucose and diabetes. *Diabetes Care.* 2011 Feb;34(2):381-6. doi: 10.2337/dc10-1354. Epub 2011 Jan 7.

Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: na evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol.* 2002 May;29 Suppl 2:6-16. Review.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém WJ, Mendes MC, Uzeda M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2002 Apr;73(4):360-9.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Rosalém W, Mendes MC, Souto RM, Uzeda Md. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol.* 2005 May;76(5):778-84.

Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol.* 2000 Jan;27(1):30-6.

Culić O, Eraković V, Cepelak I, Barisić K, Brajsa K, Ferencić Z, Galović R, Glojnarić I, Manojlović Z, Munić V, Novak-Mircetić R, Pavicić-Beljak V, Sucić M, Veljaca M, Zanić-Grubisić T, Parnham MJ. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol.* 2002 Aug 30;450(3):277-289.

Dastoor SF, Travan S, Neiva RF, Rayburn LA, Giannobile WV, Wang HL. Effect of adjunctive systemic azithromycin with periodontal surgery in the treatment of chronic periodontitis in smokers: a pilot study. *J Periodontol.* 2007 Oct;78(10):1887-96.

Demmer RT, Desvarieux M, Holtfreter B, Jacobs DR Jr, Wallaschofski H, Nauck M, Völzke H, Kocher T. Periodontal status and A1C change: longitudinal results from the study of health in Pomerania (SHIP). *Diabetes Care.* 2010 May;33(5):1037-43. doi: 10.2337/dc09-1778. Epub 2010 Feb 25.

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 Jan;41(1):11-8. doi: 10.1111/jcpe.12179. Epub 2013 Nov 11.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991 Feb;62(2):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. doi: 10.1016/j.phrs.2011.06.024. Epub 2011 Jul 19.

Ercan E, Uzun BC, Ustaoglu G. Effects of azithromycin versus metronidazole-amoxicillin combination as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy of generalized aggressive periodontitis. *Niger J Clin Pract.* 2015 Jul-Aug;18(4):506-10. doi: 10.4103/1119-3077.154221.

Faveri M, Rebello A, de Oliveira Dias R, Borges-Junior I, Duarte PM, Figueiredo LC, Feres M. Clinical and microbiologic effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized chronic periodontitis: smokers versus non-smokers. *J Periodontol*. 2014 Apr;85(4):581-91. doi: 10.1902/jop.2013.130278. Epub 2013 Jul 4.

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 Apr;23(4):362-6.

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, 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. doi: 10.1111/jcpe.12004. Epub 2012 Sep 27.

Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013 Jun;62(1):59-94. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x. Review.

Gilowski L, Kondzielnik P, Wiench R, Płocica I, Strojek K, Krzemiński TF. Efficacy of short-term adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in diabetic patients--randomized study. *Oral Dis*. 2012 Nov;18(8):763-70. doi:10.1111/j.1601-0825.2012.01943.x. Epub 2012 May 23.

Gomi K, Yashima A, Nagano T, Kanazashi M, Maeda N, Arai T. Effects of full-mouth scaling and root planing in conjunction with systemically administered azithromycin. *J Periodontol*. 2007 Mar;78(3):422-9.

Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, Genco RJ. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol*. 1997 Aug;68(8):713-9.

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.

Haas AN, Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Susin C, Albandar JM, Oppermann RV, Rösing CK. Adjunctive azithromycin in the treatment of aggressive periodontitis: microbiological findings of a 12-month randomized clinical trial. *J Dent*. 2012 Jul;40(7):556-63. doi: 10.1016/j.jdent.2012.03.004. Epub 2012 Mar 20.

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, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1997 May;24(5):324-34.

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

Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Jun;23(3):196-205. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x.

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.

Han B, Emingil G, Özdemir G, Tervahartiala T, Vural C, Atilla G, Baylas H, Sorsa T. Azithromycin as an adjunctive treatment of generalized severe chronic periodontitis: clinical, microbiologic, and biochemical parameters. *J Periodontol*. 2012 Dec;83(12):1480-91. doi: 10.1902/jop.2012.110519. Epub 2012 Feb 11.

Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:196-209. Review.

Helovuo H, Paunio K. Effects of penicillin and erythromycin on the clinical parameters of the periodontium. *J Periodontol*. 1989 Aug;60(8):467-72.

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:136-59; discussion 160-2. Review.

Herrera D, Alonso B, León R, Roldán S, Sanz M. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):45-66. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01260.x. Review.

Herrera D, Matesanz P, Bascones-Martínez A, Sanz M. Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *J Evid Based Dent Pract*. 2012 Sep;12(3 Suppl):50-60. doi: 10.1016/S1532-3382(12)70013-1. Review.

Internacional Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas update 2012 (online), <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012> (2013).

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. doi: 10.1016/j.diabres.2012.09.039. Epub 2012 Oct 3.

Joyston-Bechal S, Smales FC, Duckworth R. A follow-up study 3 years after metronidazole therapy for chronic periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1986 Nov;13(10):944-9.

Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol.* 1996 Feb;67(2):93-102.

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, Nauck M, Kocher T. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol.* 2009 Sep;36(9):765-74. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01445.x. Epub 2009 Jul 20. Erratum in: *J Clin Periodontol.* 2009 Dec;36(12):1075. Rathmann, Wolfgang G [corrected to Rathmann,Wolfgang].

Keestra JA, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol Res.* 2015 Jun;50(3):294-314. doi: 10.1111/jre.12221. Epub 2014 Aug 21. Review.

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;13:64. doi: 10.1186/1472-6831-1364.

Krayer JW, Leite RS, Kirkwood KL. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 2010 Jan;54(1):13-33. doi: 10.1016/j.cden.2009.08.010. Review.

Kulik EM, Lenkeit K, Chenaux S, Meyer J. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2008 May;61(5):1087-91. doi: 10.1093/jac/dkn079. Epub 2008 Mar 7.

Lang NP, Tonetti MS. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health Prev Dent.* 2003;1(1):7-16.

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. doi:10.1902/jop.2012.120282. Epub 2012 Oct 2.

Linden GJ, Mullally BH. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J Periodontol.* 1994 Jul;65(7):718-23.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry.* 4th edition. Copenhagen: Blackwell Munksgaard; 2003.

Listgarten MA. The structure of dental plaque. *Periodontol 2000.* 1994 Jun;5:52-65. Review.

Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarcz J, Smith BA. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol*. 1992 Feb;19(2):103-12.

Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;44:127-53. Review.

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. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01538.x.

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 Jul 1;8(5):51-9

Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):108-20. Review.

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. Erratum in: *J Periodontol*. 2004 May;75(5):780.

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

Sampaio E, Rocha M, Figueiredo LC, Faveri M, Duarte PM, Gomes Lira EA, 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 Sep;38(9):838-46. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01766.x. Epub 2011 Jul 19.

Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Miranda TS, Feres M, Bastos MF, Duarte PM. 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 Periodontol Res*. 2012 Feb;47(1):45-54. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01403.x. Epub 2011 Aug 2.

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*. 2012 Jun;83(6):731-43. doi: 10.1902/jop.2011.110432. Epub 2011 Nov 3. Review.

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.* 2012 Oct;83(10):1257-69. Epub 2012 Feb 14. Review.

Silva MP, Feres M, Siroto TA, Soares GM, Mendes JA, Faveri M, Figueiredo LC. 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 Sep;38(9):828-37.doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01763.x. Epub 2011 Jul 15.

Soares GM, Mendes JA, Silva MP, Faveri M, Teles R, Socransky SS, Wang X, Figueiredo LC, Feres M. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.*2014 Apr;41(4):366-76.

Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl.* 1994;(18):S684-5, 688-93;quiz S714-7.

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.

Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol.* 1998 Jan;69(1):76-83.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2006;42:180-218. Review.

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 Jun;30(3):182-92.

Tsalikis L, Sakellari D, Dagalis P, Boura P, Konstantinidis A. Effects of doxycycline on clinical, microbiological and immunological parameters in well-controlled diabetes type-2 patients with periodontal disease: a randomized, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2014 Oct;41(10):972-80. doi:10.1111/jcpe.12287. Epub 2014 Sep 3.

Tsourdi E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A, Bornstein SR. Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus. *Biomed Res Int.* 2013;2013:385641. doi: 10.1155/2013/385641. Epub 2013 Apr 7. Review.

van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goené RJ, Abbas F, Winkel EG, de Graaff J. Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1989 Feb;16(2):128-31.

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitispatients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2001Apr;28(4):296-305.

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. doi: 10.1371/journal.pone.0061516. Print 2013.