



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade De Odontologia de Araraquara



*Daniela Gonçalves*

Efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico em  
pacientes portadores de Diabetes mellitus tipo 2  
com doença periodontal. Análises clínica,  
enzimática e microbiológica.

**ARARAQUARA**

**2008**



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade De Odontologia De Araraquara



*Daniela Gonçalves*

Efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico em  
pacientes portadores de Diabetes mellitus tipo 2  
com doença periodontal. Análises clínica,  
enzimática e microbiológica.

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

Orientadora: *Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Silvana Regina Perez Orrico*

**ARARAQUARA  
2008**

*DANIELA GONÇALVES*

EFEITO DO TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO-  
CIRÚRGICO EM PACIENTES PORTADORES DE  
DIABETES MELLITUS TIPO 2 COM DOENÇA  
PERIODONTAL. ANÁLISES CLÍNICA, ENZIMÁTICA E  
MICROBIOLÓGICA.

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do título de Doutor

Presidente e orientador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

2ºexaminador: Profa. Dra. Ana Paula Vieira Colombo

3ºexaminador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

4ºexaminador: Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Ma ssucato

5ºexaminador: Prof. Dr. Jose Eduardo Cezar Sampaio

Araraquara, 13 de Março de 2008.  
(data da defesa)

## ***Dados Curriculares***

*Daniela Gonçalves*

**Nascimento** 09 de Janeiro de 1976 – São Carlos –SP

**Filiação** José Sérgio Gonçalves  
Marben Ferraz da Porciúncula Gonçalves

**1996 – 1999** Graduação em Odontologia  
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

**2002 - 2004** Pós-graduação em Periodontia – Nível de Mestrado  
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

**2004 - 2008** Pós-graduação em Periodontia – Nível de Doutorado  
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

## *Dedico Este Trabalho...*

*Aos meus queridos pais, **JOSÉ SÉRGIO** e **MARBEN**, por todo amor, atenção, exemplo de vida e de coragem, e por todas as condições que me deram para buscar o conhecimento, abrindo mão dos seus sonhos para a realização dos meus. Não foram apenas pais, mas amigos e companheiros...*

*Aos meus irmãos, **Zé, Binha, Kiko** e **Carlinhos** juntamente com meus cunhados e sobrinhos pela força, convivência, amor e alegria em todos os momentos...*

*Ao meu querido noivo, **Fabio**, por sua enorme paciência, apoio, cumplicidade, atenção, companheirismo.. Além da sua valiosa ajuda na conclusão de mais um trabalho... Acima de tudo pela sua leve e alegre presença em minha vida...*

*Vocês são os grandes responsáveis por mais esta conquista...*

*AMO VOCÊS*

## *Agradeço Especialmente...*

A Deus, pela vida e por sua presença constante...

Em todos os momentos...

Aos **Pacientes** que colaboraram e participaram desta pesquisa de forma importantíssima... Disponibilizaram seu tempo e confiaram em nosso trabalho...

A todos, o meu respeito e minha gratidão!

À **Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico**,  
minha orientadora, por sua enorme dedicação, respeito, amizade, determinação, competência e pela disposição com que sempre me orientou profissionalmente e pessoalmente.

Às amigas e irmãs **Vanessa e Cristiane** por todos os momentos de alegria, festa, preguiça, desespero, angústia... Nunca vou me esquecer dos nossos momentos compartilhados... Obrigada de coração!!

## *Agradecimentos*

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

À **Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico**, pela competência, dedicação e responsabilidade com que coordena o Curso de Pós-Graduação na área de Periodontia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES** e à Fundação para o Desenvolvimento da UNESP - **FUNDUNESP** pelo apoio financeiro.

**Aos docentes da Disciplina de Periodontia e docentes do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP:** Prof. Dr. Benedito Egbert Corrêa de Toledo, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico; Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, Profa. Dra. Glória Maria

Thompson Galli. Pela formação, contribuição, competência, disponibilidade e convivência.

À **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato** por seu total desprendimento na minha orientação profissional e pessoal e por sua amizade durante todo nosso convívio.

À **Profa. Dra. Ana Paula Colombo** pela atenção com que me recebeu, pela orientação e colaboração na realização, processamento e interpretação dos dados da análise microbiológica.

À **Profa. Dra. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira** pelo auxílio e disponibilização do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Química da UNESP possibilitando a realização da análise enzimática.

**Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti** pela atenção, disponibilidade e orientação na análise enzimática.

**Ao Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil** pelo auxílio, orientação e direcionamento da metodologia da análise enzimática.

**Ao Prof. Dr. Silvio José Govone** pela orientação e direcionamento da análise estatística.

À pós-graduanda **Carina Maciel da Silva** pelo valioso auxílio na execução do processamento microbiológico.



À **Evelin Juliana Ponsoni** pelo auxílio nos estudos exploratórios da análise enzimática.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia: **Maria do Rosário, Teresinha, Maria José, Regina Lúcia, Cláudia, Toninho, Telma e Sueli** pela valiosa convivência, gentileza, amizade, aprendizado, carinho, respeito, paciência e atenção comigo e com meus pacientes!!

Aos funcionários do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Química e do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia: **Valdenir, Marcos e Valéria**, pela ajuda, atenção e disposição.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação: **Mara, Rosângela, José Alexandre e Flávia**, pela atenção, paciência e competência.

A todos os funcionários da Biblioteca: **Maria Helena, Marley, Eliane, Odete, Adriano, Eliane, Maria Inês, Silvia Helena e Ceres** pela atenção e disponibilidade.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Periodontia, **Andréa, Beatriz, Eduardo, Elizângela, Fernanda, Fernando, Juliana Moraes, Juliana Rico, Patrícia, Ivy, Vanessa e a todos os outros colegas da pós-graduação e**

**estagiários.** Por todos os momentos de descontração, amizade, convivência e pela oportunidade de aprendizado.

Às amigas **Alliny e Dani Zandim** pela disponibilidade em me ajudar nas várias fases desta pesquisa. Contem sempre comigo...

À amiga e companheira de triagem, de clínica, de visitas a postos de saúde etc etc... **Fernanda Bello**, por sua grande colaboração na execução de várias fases desta pesquisa.

Aos **alunos de Pós-Graduação do Departamento de Enzimologia e de Análises Clínicas** pela convivência, colaboração e amizade conquistada.

A **todos meus amigos** que torceram por mim, me deram coragem e entenderam minhas ausências...

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigada!!!!**

## *Epígrafe*

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”*

*Albert Einstein*

## **SUMÁRIO**

<b>Lista de abreviaturas</b>	13
<b>Resumo</b>	14
<b>Abstract</b>	17
<b>1 Introdução</b>	20
<b>2 Proposição</b>	31
<b>3 Material e método</b>	32
3.1 Cálculo da amostra	32
3.2 Seleção da amostra	32
3.3 Exame clínico intra bucal inicial	36
3.4 Procedimentos radiográficos	38
3.5 Coleta de saliva	38
3.6 Coleta de fluido gengival	38
3.7 Coleta de biofilme subgengival	39
3.8 Avaliação do controle glicêmico	40
3.9 Tratamento periodontal	41
3.10 Análise enzimática	42
3.11 Análise microbiológica	47
3.12 Análise estatística	53
<b>4 Capítulo 1- Análise Enzimática</b>	56
<b>5 Capítulo 2 – Análise Microbiológica</b>	86
<b>6 Considerações finais</b>	116

<b>7 Conclusão</b>	127
<b>8 Referências</b>	128
<b>9 Anexos</b>	146
Aprovação do Comitê de Ética	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo controle	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo diabetes	
Carta de confirmação da submissão do artigo	

### ***Lista de Abreviaturas***

**DM:** Diabetes mellitus

**DM1:** Diabetes mellitus tipo 1

**DM2:** Diabetes mellitus tipo 2

**HbA1c:** hemoglobina glicada

**MPO:** mieloperoxidase

**SPO:** peroxidase salivar

**PTS / TPS:** peroxidase total salivar / *total salivary peroxidase*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**HOCl:** ácido hipocloroso

**IPV / VPI:** índice de placa visível / *visible plaque index*

**ISM / GBI:** índice de sangramento marginal / *gingival bleeding index*

**SS / BOP:** sangramento à sondagem / *bleeding on probing*

**PS / PD:** profundidade de sondagem / *periodontal probing depth*

**NI / CAL:** nível clínico de inserção / *clinical attachment level*

**SUP / SUP:** supuração / *suppuration*

**FSG / GCF:** fluido sulcular gengival / *gingival crevicular fluid*

**MCD:** 1,1-dimetil-4-cloro-3,5-ciclohexanediona ou Monoclorodimedona

**UA:** unidade de atividade enzimática

**v<sub>o</sub>:** velocidade inicial de reação

**ΔA:** variação da absorbância

**Gonçalves D. Efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico em pacientes portadores de Diabetes mellitus tipo 2 com doença periodontal. Análises clínica, enzimática e microbiológica [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.**

### ***Resumo***

**Objetivos:** Avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre parâmetros clínicos, microbiota subgengival e a atividade enzimática na saliva e no fluido sulcular gengival em pacientes portadores de diabetes e em indivíduos sistemicamente saudáveis, ambos com periodontite crônica.

**Material e método:** a amostra populacional foi composta por 40 indivíduos divididos em dois grupos: 20 portadores de Diabetes mellitus tipo 2 com inadequado controle metabólico (grupo DM2) e 20 indivíduos sistemicamente saudáveis (grupo controle), ambos portadores de periodontite crônica. Clinicamente os indivíduos foram avaliados quanto: ao índice de placa visível (IPV), ao índice de sangramento marginal (ISM), à profundidade de sondagem (PS), ao nível clínico de inserção (NI), à presença de sangramento à sondagem (SS) e à presença de supuração (SUP). Foram realizadas coletas de saliva e de fluido sulcular gengival para determinação da atividade peroxidásica total salivar (PTS) e da mieloperoxidase (MPO), por meio de espectrofotometria. Amostras de placa bacteriana subgengival de 4 sítios rasos e 4 profundos com doença periodontal foram avaliadas pela técnica de Checkerboard DNA-DNA

hybridization. Toda a amostra recebeu terapia periodontal não-cirúrgica com posterior fase de acompanhamento para realização de controle de placa profissional a cada quinze dias por um período de três meses. Todas as avaliações foram realizadas no *baseline* e aos três meses após o término da terapia periodontal.

**Resultados:** No *baseline*, o grupo DM2 apresentou maior percentual de sítios com IPV e SS ( $p < 0.01$ ) sem diferença estatisticamente significativa entre grupos quanto aos demais parâmetros clínicos. O tratamento periodontal não-cirúrgico resultou em melhora significativa dos parâmetros clínicos avaliados nos 2 grupos. Aos três meses pós-tratamento foram observados maiores percentuais de sítios com IPV, ISM, SS e média de PS ( $p < 0.05$ ) para o grupo DM2. Quanto à análise microbiológica, no *baseline* somente *C. rectus* e *S. anginosus* apresentaram níveis significativamente maiores em sítios profundos, após ajuste para comparações múltiplas, nos grupos DM2 e controle, respectivamente. Houve redução significativa dos principais periodontopatógenos após terapia periodontal. A atividade da PTS foi similar em ambos os grupos no *baseline* e no pós-tratamento. A atividade da MPO no fluido sulcular gengival apresentou menores valores ( $p < 0.05$ ) para o grupo DM2, tanto no *baseline* quanto aos três meses. Observou-se redução significativa da atividade enzimática na saliva e no fluido para ambos os grupos ( $p < 0.05$ ), após terapia periodontal.



**Conclusão:** Não houve diferença entre grupos quanto à atividade enzimática na saliva. Os portadores de diabetes apresentaram menor atividade da MPO. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre grupos para a maioria dos periodontopatógenos avaliados. O tratamento periodontal não-cirúrgico foi efetivo na melhora da maioria dos parâmetros clínicos, na redução dos principais periodontopatógenos e na redução da atividade enzimática da saliva e do fluido, para ambos os grupos.

**Palavras-chave:** Doenças periodontais; Diabetes mellitus; peroxidases; periodonto – microbiologia.

**Gonçalves D. Effect of the non-surgical periodontal treatment in type 2 diabetes patients with periodontal disease. Clinical, enzymatic and microbiological analysis [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.**

### ***Abstract***

**Objectives:** To evaluate the effect of periodontal treatment on clinical parameters as well as on subgingival microbiota and enzymatic activity in the saliva and the gingival crevicular fluid of diabetes patients and systemically healthy individuals with chronic periodontitis.

**Material and Methods:** The sample was constituted by 40 individuals divided in two groups: 20 type 2 diabetes mellitus patients with inadequate metabolic control (DM2 group) and 20 systemically healthy individuals (control group), both groups with chronic periodontitis. Clinical assessments included visible plaque index (VPI), bleeding on probing (BOP), gingival bleeding index (GBI), suppuration (SUP), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL). Saliva and gingival crevicular fluid samples were collected for determination of the total salivary peroxidase (TPS) activity and myeloperoxidase (MPO) activity respectively, by spectrophotometric assays. Subgingival plaque samples from 4 shallow and 4 deep sites with periodontal disease were evaluated by the Checkerboard DNA-DNA hybridization technique. All the patients received non-surgical periodontal therapy followed of the period for

accomplishment of professional plaque control performed twice a month during three months. All the evaluations were assessed at baseline and 3 months after periodontal therapy.

**Results:** At baseline, the DM2 group presented a significantly higher percentage of sites with VPI and BOP ( $p < 0.01$ ). No significant differences between groups were observed for the other clinical parameters. Non-surgical periodontal treatment resulted in a significant improvement of clinical parameters. At 3 months post-treatment, the DM2 group presented significantly higher percentage of sites with VPI, GBI, BOP and mean PD ( $p < 0.05$ ). Regarding the microbiological analysis, at baseline, only *C. rectus* and *S. anginosus* were founded significantly higher levels, in deep sites, in the DM2 and control groups, respectively. Significant reductions in the percentual and counts of major periodontal pathogens were observed after therapy, in both groups. The activity of TPS was similar in both groups at baseline and post-treatment. The MPO activity in the GCF presented lower values ( $p < 0.05$ ) in the DM2 group at baseline and post-treatment compared to controls. A significant reduction in enzymatic activity for both groups, after periodontal therapy, was observed in saliva and GCF.

**Conclusions:** No significant differences between groups were observed for TPS activity. The diabetic individuals presented lower MPO activity in the GCF. No significant differences between groups, for the majority of the periodontal pathogens evaluated, were detected. Non-surgical periodontal

treatment was effective in improving the clinical periodontal status, reducing putative periodontal pathogens and the salivary and GCF enzymatic activity in both groups.

**Keywords:** Periodontal diseases; Diabetes mellitus; peroxidases; periodontium -microbiology

.

## **1 Introdução**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Federação Internacional de Diabetes (IDF) anunciaram que o Diabetes mellitus constitui uma epidemia global emergente. Existe no mundo inteiro 180 milhões de portadores de diabetes já diagnosticados, sendo que no Brasil estima-se que a doença atinja 12% (20 milhões) da população<sup>54</sup>.

O Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante de defeito na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a alterações a longo prazo como disfunção e falha em vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos<sup>4</sup>.

O DM é atualmente considerado um problema de saúde pública com elevada prevalência tanto nas populações desenvolvidas como subdesenvolvidas. No Brasil, um estudo multicêntrico coordenado pelo Ministério da Saúde em 1992 revelou que o DM acometia 7,6% da população adulta (30 a 69 anos de idade). Aproximadamente metade dos pacientes desconhece o diagnóstico e 25% dos reconhecidamente portadores de DM não faz qualquer tipo de tratamento<sup>54</sup>.

O controle metabólico ou glicêmico apresenta uma estreita relação com o risco de desenvolvimento de complicações crônicas do DM. Segundo estudos clínicos prospectivos e randomizados como DCCT<sup>25</sup>

(1993) e UKPDS<sup>35</sup> (1998), valores de HbA1c acima de 7% estão associados a um maior risco de desenvolvimento de complicações crônicas tanto no DM 1<sup>25</sup> como no DM 2<sup>35</sup>.

No campo da Odontologia, o DM propicia a ocorrência de uma série de complicações que podem resultar no comprometimento da qualidade de vida e interferir no controle metabólico da doença, tornando fundamental a participação do cirurgião-dentista no acompanhamento do paciente portador de DM.

A condição metabólica peculiar dos indivíduos portadores de DM é a elevação da glicemia com conseqüente formação de substâncias denominadas produtos finais da glicação avançada (AGEs). Macrófagos e células endoteliais apresentam receptores específicos para AGEs denominados RAGEs<sup>65</sup>. A interação entre eles ativa mecanismos e sinais intracelulares levando ao aumento do estresse oxidativo, aumento da permeabilidade vascular, maior secreção de fatores de adesão celular e estímulo à secreção de citocinas inflamatórias<sup>118</sup>. Esta pode ser, portanto, uma hipótese válida para explicar o porquê dos pacientes portadores de DM apresentarem maior severidade na expressão da doença periodontal.

A periodontite é considerada a sexta complicação do diabetes<sup>52</sup>. Ambas as doenças, Diabetes mellitus e doença periodontal, podem estimular um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, resultando em um efeito deletério aos tecidos periodontais<sup>62</sup>.

Muitos autores<sup>6,8,12,28,31,34,45,76,99</sup> relatam maior incidência e severidade da doença periodontal em pacientes portadores de DM quando comparados a indivíduos sistemicamente saudáveis.

Nos últimos anos, métodos avançados para avaliação do controle metabólico nos indivíduos portadores de DM, da condição periodontal, de fatores de risco microbiológicos e indicadores de risco na saliva e no fluido sulcular gengival, têm gerado novas informações na tentativa de se elucidar a inter-relação entre DM e doença periodontal. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a maior prevalência e severidade da doença periodontal observada em indivíduos portadores de DM. Estes incluem alterações no fluido sulcular gengival, na vascularização dos tecidos periodontais, na resposta imunoinflamatória do hospedeiro, no metabolismo do colágeno, em padrões genéticos e na microbiota subgengival<sup>57,61</sup>.

Em relação aos parâmetros microbiológicos, poucos estudos<sup>16,47,104</sup> demonstraram diferenças entre portadores e não portadores de DM com periodontite quanto à colonização bacteriana subgengival, enquanto outros<sup>12,34,82,119,120</sup> não observaram diferenças significantes.

Em estudo avaliando somente indivíduos portadores de *DM insulino-dependentes* com pobre controle glicêmico, Mandell et al.<sup>56</sup> (1992) revelaram níveis aumentados de patógenos periodontais como *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica* spp., *Bacteroides*

*gracilis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus* e maior prevalência de *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *C. rectus* em sítios com periodontite.

Ao realizar a comparação entre indivíduos portadores de DM e indivíduos sistemicamente sadios, alguns estudos<sup>69,119</sup> observaram que a composição da microbiota detectada em sítios com doença periodontal de pacientes portadores de diabetes tipo 2 (DM2) é similar àquela observada na doença periodontal crônica de pacientes sistemicamente saudáveis. Da mesma forma, Sbordone et al.<sup>81,82</sup> (1995,1998) não encontraram diferenças significantes na microbiota subgingival de uma população de adolescentes com diabetes tipo 1 (DM1) quando comparados a seus irmãos não portadores DM, concordando com os achados de Zambon et al.<sup>120</sup> (1988) em adultos com DM1.

Entretanto, em estudo recente, Ciantar et al.<sup>16</sup> (2005) registraram maiores proporções de espécies de *Capnocytophaga* em indivíduos portadores de DM descompensados com periodontite quando comparados a indivíduos sistemicamente sadios com periodontite. Tal estudo veio confirmar os resultados de Mashimo et al.<sup>60</sup> (1983) em jovens DM1 os quais observaram que espécies de *Capnocytophaga spp* foram os organismos cultiváveis predominantes de sítios com doença periodontal, constituindo em média 24% da microbiota cultivável. Por outro lado, Thorstensson et al.<sup>104</sup> (1995) observaram uma maior porcentagem de indivíduos portadores de *diabetes insulino-dependente*



com *P. gingivalis* em relação a indivíduos controle, enquanto as demais espécies apresentaram prevalência similar em ambos os grupos.

Seppala, Ainamo<sup>83</sup> (1996) investigaram a importância do controle metabólico sobre a microbiota subgengival em portadores de *diabetes insulino-dependentes*. Os autores constataram porcentagens significativamente aumentadas de espiroquetas, bacilos móveis e diminuição dos níveis de cocos em sítios com periodontite de indivíduos com pobre controle glicêmico quando comparados a pacientes bem controlados. Entretanto, para Tervonen et al.<sup>103</sup> (1994), a duração, o tipo e o estado do controle metabólico do DM parece não afetar a presença de espécies como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* na microbiota subgengival. Concordando com estes achados, Sastrowijoto et al.<sup>77</sup> (1990), em estudo longitudinal com pacientes portadores de *diabetes insulino-dependentes* com pobre controle metabólico, não observaram alterações significativas da microbiota em sítios saudáveis e sítios com periodontite após a melhora do controle metabólico.

Em relação ao efeito do tratamento periodontal em portadores de DM, Grossi et al.<sup>29</sup> (1997) revelaram que a terapia periodontal associada ou não a agentes antimicrobianos foi eficaz na redução de *P. gingivalis* em indivíduos DM2 com doença periodontal. Entretanto, Smith et al.<sup>87</sup> (1996) relataram que o tratamento mecânico

isolado não foi capaz de eliminar espécies como *T. forsythia* e *P. gingivalis* em *insulino-dependentes*.

O método empregado para avaliação microbiológica pode ser um dos fatores responsáveis pelos diferentes resultados encontrados. Utilizando o Checkerboard DNA-DNA hybridization, Hintao et al.<sup>34</sup> (2007) não observaram diferenças significantes nas 17 espécies avaliadas em amostras de placa subgingival entre portadores de DM2 e indivíduos sistemicamente saudáveis. Já Lalla et al.<sup>47</sup> (2006), utilizando o mesmo método, registraram maiores níveis de *Eubacterium nodatum* em portadores de DM1 quando comparados a controles saudáveis.

Além da determinação do agente etiológico microbiano da doença periodontal, também ressalta-se a importância de se avaliar marcadores presentes na saliva e no fluido sulcular gengival uma vez que possuem várias substâncias associadas à defesa do hospedeiro, sendo que seus níveis aumentados podem estar associados à condição periodontal<sup>7,49</sup>.

A saliva possui um papel fundamental na cavidade bucal, constituindo a primeira linha de defesa orgânica contra materiais externos bióticos e abióticos na cavidade bucal. Os principais constituintes dos sistemas de defesa existentes na saliva são: lisozima, lactoferrina, aglutininas, células fagocíticas, imunoglobulinas e peroxidases (peroxidase salivar e mieloperoxidase, SPO e MPO, respectivamente)<sup>55</sup>. Já o fluido sulcular gengival consiste em um exsudato inflamatório que é

expelido para o espaço gengival e/ou periodontal das bolsas, ao redor dos dentes. É composto de soro e materiais localmente gerados, como produtos da desorganização dos tecidos, mediadores inflamatórios e anticorpos contra os microrganismos presentes na placa bacteriana subgengival<sup>7</sup>. Por esta razão, ultimamente tem havido um enorme interesse no potencial diagnóstico da saliva<sup>6,22,31,71,86</sup> e do fluido<sup>7,9,10,64,87,110</sup>.

Dentre os múltiplos sistemas de defesa não-específicos existentes na saliva, destaca-se o sistema peroxidásico salivar, o qual é constituído de peroxidase salivar (SPO) proveniente das glândulas parótidas, de mieloperoxidase (MPO) de origem leucocitária proveniente do fluido sulcular gengival e de outros componentes. A SPO contribui com 60-80% da atividade peroxidásica total, enquanto que a MPO contribui com 20-40% desta atividade<sup>100</sup> e aumenta durante os processos inflamatórios tais como gengivite, periodontite, mucosite e outros<sup>88</sup>. Este sistema contribui para a manutenção da saúde bucal por meio de sua ação antioxidante e antibacteriana<sup>100</sup>.

A SPO contribui de várias formas para a manutenção da saúde bucal, possuindo uma ação bactericida que protege os dentes e a mucosa bucal por meio da regulação das espécies de microrganismos bucais presentes e sua quantidade<sup>55</sup>. Também previne o acúmulo de produtos tóxicos do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e inativa vários compostos cariogênicos e mutagênicos<sup>70,100</sup>. As glândulas salivares

secretam peroxidase salivar como também o íon tiocianato ( $\text{SCH}^-$ ). Esta enzima catalisa a oxidação do  $\text{SCH}^-$  pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o qual é excretado pelas bactérias bucais e células de defesa, em quantidades que variam de acordo com o estado do metabolismo celular, com a dieta e outros fatores. As formas oxidadas de  $\text{SCH}^-$  inibem o crescimento, respiração e metabolismo de várias espécies da microbiota bucal<sup>100</sup>.

Na presença de inflamação gengival, pode ser observada maior atividade da SPO com redução da mesma após retorno da higiene bucal<sup>86</sup>. Over et al.<sup>71</sup> (1993) relataram aumento na atividade desta enzima em pacientes com periodontite agressiva e crônica, quando comparados a controles.

Outra enzima importante, a MPO, pode ser detectada tanto na saliva como no fluido gengival. Constitui-se na proteína mais abundante presente nos grânulos primários de neutrófilos, sendo encontrada também em menor número nos monócitos. Esta peroxidase catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) em ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), um potente oxidante produzido pelos neutrófilos, com forte atividade antimicrobiana<sup>70</sup>.

A MPO presente no fluido sulcular gengival pode ter um grande potencial como marcador de doença periodontal<sup>5,40,89</sup>. Estudos como os de Yamalik et al.<sup>117</sup> (2000), Smith et al.<sup>88</sup> (1986), Cao, Smith<sup>13</sup> (1989) e Wei et al.<sup>110</sup> (2004) demonstraram que há um aumento no nível

de MPO no fluido gengival na presença de doença periodontal em pacientes sistemicamente saudáveis.

O tratamento periodontal convencional<sup>88,113</sup>, assim como o cirúrgico<sup>10,39</sup> podem produzir uma diminuição significativa da atividade da MPO no fluido sulcular gengival.

Estudos que avaliaram a saliva de pacientes portadores de DM (Tipo 1 e 2) comparados a indivíduos sistemicamente saudáveis relataram maior atividade da SPO<sup>22,31,101</sup> e da MPO<sup>22</sup> nos portadores de DM. Entretanto, outros não observaram diferenças na atividade da SPO<sup>6</sup> e da MPO<sup>101</sup> neste grupo de pacientes. Até o presente momento, não foram encontrados estudos avaliando a atividade da MPO no fluido sulcular gengival de portadores de DM.

Em relação à influência do controle metabólico, alguns estudos suportam a existência de uma associação entre pobre controle glicêmico e aumento da susceptibilidade à doença periodontal<sup>6,41,50,68,84,99,106</sup>, conflitando com outros estudos que não observaram tal correlação<sup>3,8,72,74,98,105</sup>.

A influência do controle metabólico na resposta ao tratamento periodontal também tem sido avaliada. Christgau et al.<sup>15</sup> (1998) concluíram que portadores de DM com bom controle metabólico tendem a responder ao tratamento periodontal básico de forma similar a pacientes sistemicamente saudáveis. Já a associação de antibióticos sistêmicos com a terapia não-cirúrgica pode proporcionar melhora significativa nos

parâmetros clínicos em indivíduos DM2 não controlados metabolicamente<sup>29,73</sup>.

Por outro lado, Seppala, Ainamo<sup>84</sup> (1994), em estudo longitudinal, com indivíduos *insulino-dependentes* observaram que o percentual de sítios com perda óssea alveolar proximal foi maior no grupo com pobre controle metabólico quando comparado ao grupo bem controlado, após dois anos de avaliação. Tervonen, Karjalainen<sup>102</sup> (1997) revelaram que, após 12 meses de tratamento periodontal, indivíduos DM1 com controle metabólico deficiente e múltiplas complicações crônicas apresentaram maior número de sítios com recorrência da doença periodontal quando comparados a indivíduos bem controlados e sem complicações.

Deve-se chamar a atenção para o fato de que alguns estudos que relatam boa resposta à terapia periodontal mecânica, comparando ou não a um grupo controle, apresentam uma grande variação no grau de controle metabólico da amostra<sup>27,44,48,95,111</sup>, ou não relatam o grau de controle, o que pode influenciar os resultados obtidos.

Também tem sido objeto de estudo em indivíduos portadores de DM a avaliação do efeito da terapia periodontal convencional e a associação de tratamentos diferentes (terapia convencional associada ou não a antimicrobianos locais e/ou sistêmicos) sobre o controle glicêmico, representado pelos níveis de hemoglobina glicada (Hba1c).

Alguns estudos que avaliaram os efeitos, em portadores de DM, da terapia convencional isolada, observaram melhoras apenas nos parâmetros clínicos, sem alteração no controle glicêmico, respondendo ao tratamento periodontal básico de forma similar a pacientes sistemicamente saudáveis<sup>2,38,87,111</sup>. Outros estudos que envolveram, além da terapia convencional, a utilização de antimicrobianos locais, encontraram resultados semelhantes<sup>15,48</sup>. Entretanto, Kiran et al.<sup>44</sup> (2005) observaram melhora significativa nos parâmetros clínicos e no controle metabólico (Hba1c) aos três meses após tratamento periodontal convencional em portadores de DM2. Tal resultado também foi registrado por Faria-Almeida et al.<sup>27</sup> (2006) e Navarro-Sanchez et al.<sup>64</sup> (2007).

Já a associação da terapia convencional com a administração de antibióticos locais e sistêmicos pode resultar em melhoras significativas nos parâmetros clínicos<sup>51,73</sup> e no controle metabólico<sup>29,37</sup>, provavelmente pela redução de componentes da microbiota e dos efeitos moduladores da resposta do hospedeiro.

Em virtude da escassez de estudos avaliando mecanismos de defesa não-específicos e dos resultados conflitantes em relação à microbiota subgingival de portadores de DM2 com inadequado controle metabólico, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre parâmetros clínicos, microbiológicos e de atividade enzimática nestes indivíduos comparando aos achados em pacientes sistemicamente saudáveis, ambos com periodontite crônica.

## ***2 Proposição***

Esse estudo teve como objetivo:

1. Comparar o perfil clínico, enzimático e microbiológico de pacientes portadores de diabetes tipo 2 e inadequado controle metabólico com pacientes sistemicamente saudáveis, ambos com periodontite crônica.

2. Avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre os parâmetros clínicos, microbiológicos, e enzimáticos de pacientes portadores de diabetes tipo 2 com inadequado controle metabólico com pacientes sistemicamente saudáveis, ambos com periodontite crônica.



### **3 Material e método**

#### **3.1 Cálculo da amostra**

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em dados obtidos de um estudo piloto realizado recentemente por nosso grupo (dados não publicados). Foi estimado que, com um mínimo de 20 indivíduos por grupo, poderiam ser detectadas diferenças significantes nos parâmetros clínicos entre os períodos avaliados (*baseline* e 3 meses pós-tratamento periodontal). O poder do teste foi de 80% e o intervalo de confiança foi 95%.

#### **3.2 Seleção da amostra**

Aproximadamente 500 pacientes foram submetidos à anamnese para inclusão na amostra deste estudo. Dentre eles, 160 pacientes sistemicamente saudáveis e 180 pacientes portadores de DM2 realizaram uma triagem clínica. Destes, apenas 49 pacientes (26 sistemicamente saudáveis e 23 DM2) apresentavam-se dentro dos critérios necessários para sua inclusão na amostra. Os indivíduos foram selecionados no período compreendido entre junho de 2005 a dezembro de 2006.

No decorrer do estudo, foram excluídos, devido a abandono do tratamento, à falta às consultas de retorno e a utilização de

antibióticos, seis indivíduos pertencentes ao grupo controle e três portadores de DM2.

Desta forma, cada grupo experimental foi composto da seguinte maneira:

GRUPO DM2 - 20 pacientes portadores de Diabetes mellitus tipo 2 com inadequado controle metabólico e presença de periodontite crônica<sup>36</sup>.

GRUPO CONTROLE - 20 pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite crônica<sup>36</sup>.

*Critérios gerais de inclusão na amostra:*

- Ambos os sexos;
- Idade entre 30 e 60 anos;
- Presença de, no mínimo, 15 dentes naturais;
- Diagnóstico compatível com periodontite crônica moderada à severa, localizada ou generalizada<sup>36</sup>.
- Presença de, no mínimo, quatro dentes com profundidade de sondagem (PS)  $\geq$  5mm e nível de inserção (NI)  $\geq$  4mm, com sinais clínicos de inflamação (sangramento à sondagem), livres de cáries e/ou próteses.

*Critérios específicos de inclusão na amostra para o grupo DM2:*

Os pacientes deveriam apresentar diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2 (ADA<sup>4</sup> 2005) com controle metabólico inadequado.

Foi considerado um controle metabólico inadequado, indivíduos que apresentaram exame de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) ≥ 7%, justificando que, como 6% é considerado o limite superior para um paciente portador de DM bem controlado<sup>35</sup>, 1% acima deste valor diminuiria os riscos deste paciente estar em estado de alteração metabólica transitória.

Além disso, os pacientes deveriam apresentar autorização por escrito do endocrinologista responsável para serem submetidos ao exame clínico periodontal.

*Critérios específicos de inclusão na amostra para o grupo controle:*

Os indivíduos pertencentes ao grupo controle não poderiam apresentar nenhuma doença sistêmica grave e nem fazer uso de qualquer medicação diária que pudesse apresentar efeito colateral na cavidade bucal. Para certificar-se de que esses pacientes não eram portadores de Diabetes mellitus, foi solicitado o exame de glicemia de jejum que deveria apresentar resultado igual e/ou inferior a 100mg/dl, para posterior realização do exame clínico periodontal. Portanto, foram excluídos também os pacientes que apresentaram glicemia de jejum compatível com estados pré-diabéticos (>100 e < 126 mg/dl).

Os indivíduos pertencentes ao grupo DM2 foram avaliados quanto à história pregressa do DM (tempo de diagnóstico, medicamentos, dieta, cuidados e presença de complicações) por meio de ficha elaborada especialmente para a Clínica de Pacientes Portadores de Diabetes.

Todos os pacientes confirmaram sua aceitação para participar do estudo mediante a assinatura de um termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP (nº 85/04, Anexo 1).

### *Crítérios de exclusão da amostra*

Foram excluídos da amostra pacientes que:

- História negativa de antibioticoterapia nos últimos seis meses e de antiinflamatórios, esteróides ou não-esteróides, nos três meses antecedentes ao estudo;
- História negativa de gestação;
- História negativa de uso de anticoncepcional ou qualquer outra forma de hormônio;
- História negativa de tabagismo ou interrupção definitiva do hábito há, no mínimo, 5 anos;
- História negativa de tratamento periodontal nos últimos 12 meses.

- No decorrer do estudo não retornaram às consultas de manutenção;
- Por determinação médica, necessitavam de antibioticoterapia prévia aos procedimentos de tratamento periodontal ou no decorrer do estudo;
- Portadores de diabetes compensado ( $HbA_{1c} < 7\%$ );

### 3.3 Exame clínico intrabucal inicial

Todos os pacientes foram submetidos ao exame periodontal completo, realizado por um único examinador treinado e previamente calibrado<sup>11</sup> (Kappa 0,903).

Utilizando-se a sonda manual da Universidade da Carolina do Norte\*, foi realizado, para toda amostra, exame periodontal completo que consistiu de avaliação de índice de placa visível<sup>1</sup> (IPV), índice de sangramento marginal<sup>1</sup> (ISM), sangramento à sondagem (SS), mensuração da profundidade de sondagem (PS), avaliação da posição da margem gengival (NG) e mensuração do nível clínico de inserção (NI).

Avaliação do índice de placa visível: presença ou ausência de placa bacteriana visível a olho nu, após secagem da superfície dentária com jato de ar em todas as faces, de todos os dentes.

---

\* North Caroline Probe, Hu-Friedy, Chicago, IL.

Avaliação do índice de sangramento marginal: presença ou ausência de sangramento marginal após posicionar uma sonda periodontal milimetrada no sulco gengival, com inclinação de 60 graus em relação ao dente, percorrendo o espaço do sulco de uma proximal a outra, em todas as faces, de todos os dentes.

Posição da margem gengival: distância da margem gengival à junção cimento-esmalte, medida com sonda periodontal milimetrada em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, méso-vestibular, disto-lingual, lingual e méso-lingual.

Mensuração da profundidade de sondagem: distância da margem gengival ao fundo do sulco gengival, medida com sonda periodontal milimetrada em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, méso-vestibular, disto-lingual, lingual e méso-lingual.

Sangramento à sondagem: presença ou ausência de sangramento, decorrido um tempo de 30 segundos depois de mensurada a profundidade de sondagem.

Mensuração do nível clínico de inserção: corresponde à somatória das medidas da posição da margem gengival e profundidade de sondagem para cada sítio, de cada elemento dentário.

Supuração: presença ou ausência de supuração, após a mensuração da profundidade de sondagem.

### *3.4 Procedimentos radiográficos*

O exame radiográfico intrabucal de cada paciente constou de tomadas periapicais realizadas com auxílio de posicionadores autoclaváveis. O filme radiográfico foi embalado com filme plástico para protegê-lo do contato com a saliva e mucosa bucal dos pacientes. Posteriormente, as imagens radiográficas de boca toda foram utilizadas para o diagnóstico, planejamento e tratamento periodontal dos pacientes.

### *3.5 Coleta de saliva*

Todos os pacientes foram orientados a não consumirem nenhum tipo de alimentação por pelo menos uma hora antes da coleta de uma amostra de saliva. Todas as coletas foram realizadas no período matutino. Aproximadamente 2 mL de saliva não estimulada foi coletada e acondicionada em tubos tipo *ependorf* devidamente codificados. As amostras foram centrifugadas a 13200 rpm, 4°C, por 30 minutos e, posteriormente, congeladas em freezer (-20°C) para avaliação da atividade enzimática após 24 horas.

### *3.6 Coleta de fluido sulcular gengival*

Com auxílio da ficha clínica periodontal, foram selecionados para cada indivíduo, quatro sítios profundos com doença periodontal (profundidade de sondagem maior ou igual a 5mm e nível clínico de

inserção maior ou igual a 4mm, com sangramento à sondagem), em dentes diferentes, não-adjacentes.

O procedimento de coleta foi realizado do seguinte modo: os sítios foram isolados com rolos de algodão estéreis e gentilmente secos com jato de ar. O fluido sulcular gengival estagnado foi coletado com auxílio de um filtro de papel especial\* introduzido no sulco gengival, permanecendo por 30 segundos. Após sua remoção, o volume de fluido foi quantificado por meio de equipamento específico para esta metodologia – Periotron 8000\*\*. As amostras foram acondicionadas separadamente em tubos tipo *ependorf* devidamente codificado contendo tampão fosfato de potássio (0,1 M) pH. 7,0 com brometo de cetiltrimetilamônio (3 mM) e levado ao refrigerador. A realização do processamento laboratorial ocorreu 24 horas após as coletas. As tiras contendo sangue foram descartadas.

### *3.7 Coleta de biofilme subgengival*

Amostras de biofilme subgengival foram coletadas dos quatro sítios profundos (profundidade de sondagem  $\geq$  5mm e nível clínico de inserção  $\geq$  4mm, com sangramento à sondagem) e de quatro sítios rasos (profundidade de sondagem  $\leq$  3mm e nível clínico de inserção  $\leq$  2mm, com sangramento à sondagem) em dentes diferentes, não-

---

\* PerioPaper®, ProFlow Inc., Amityville, NY, USA.

\*\* Periotron®, ProFlow Inc., Amityville, NY, USA



adjacentes de cada indivíduo. Os sítios profundos foram os mesmos dos quais foram realizadas as coletas de fluido sulcular gengival).

A região da coleta foi isolada com roletes de algodão e a placa supragengival removida com auxílio de gaze e curetas periodontais estéreis\*. Após este procedimento foi obtida a amostra subgengival com auxílio de curetas Mini Gracey estéreis\*. Estas eram introduzidas o mais apicalmente possível dentro do sítio. O material coletado foi depositado em *ependorfs* contendo 150 µL de solução tampão TE na concentração de 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6. Após a coleta, foram adicionados, a cada *ependorf* 100 µL de solução de NaOH 0,5 M, sendo os tubos mantidos em freezer (-18°C).

As amostras foram armazenadas da seguinte forma: as amostras dos sítios rasos foram agrupadas, em um “*pool*”, enquanto as amostras dos sítios profundos foram armazenadas isoladamente para permitir a avaliação por sítio das características da microbiota subgengival.

### 3.8 Avaliação do controle glicêmico

O controle glicêmico foi avaliado por meio do exame de hemoglobina glicada (%HbA1c) que expressa a média dos níveis glicêmicos dos últimos 60 a 90 dias utilizando o método de cromatografia

---

\* Trinity Periodontia, São Paulo, SP, Brasil.

líquida de alta eficiência\*. Esta avaliação foi realizada no *baseline* e aos três meses pós-terapia periodontal.

### 3.9 *Tratamento periodontal*

Após todas as coletas, foi realizado o tratamento periodontal não-cirúrgico de boca toda em toda a amostra que consistiu de raspagem e alisamento radicular, instruções de higiene bucal e controle da placa bacteriana. O número de sessões necessárias para realização do mesmo foi ditado de acordo com a necessidade individual de cada paciente.

Finalizado o tratamento periodontal, esses pacientes entraram em fase de acompanhamento. Os retornos foram rigorosamente marcados a cada 15 dias, para remoção da placa supragengival e reforço de instrução de higiene bucal, com sedimentação da importância do controle da placa bacteriana.

Após três meses do término do tratamento periodontal não-cirúrgico, todos os pacientes foram reavaliados clinicamente e novas coletas de saliva, fluido gengival e placa bacteriana subgengival foram executadas para a avaliação do efeito do tratamento periodontal sobre os parâmetros anteriormente citados.

Os pacientes que necessitavam de outras terapias odontológicas foram, posteriormente, encaminhados para tratamento em outros departamentos da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

---

\* DiaSTAT Hemoglobin A1c Analyzer System, BioRad Laboratories, Hercules, California, USA.

Os pacientes receberam ainda, como parte do projeto, tratamento e acompanhamento profissional quando diagnosticadas lesões de mucosa bucal incluindo a presença de xerostomia.

### *3.10 Análise enzimática*

Previamente ao início deste estudo foram realizados estudos exploratórios para o estabelecimento de ajustes necessários na metodologia do ensaio enzimático em saliva e no fluido sulcular gengival. Tais estudos visaram a adequação de técnicas tradicionais de análise de peroxidases com a finalidade de aumentar a sensibilidade das reações. Para tanto, foram realizados tratamentos prévios da amostra de saliva e de fluido, antes das análises cinéticas, com o objetivo de definir parâmetros de estocagem, centrifugação prévia e diluição da saliva e do fluido sulcular gengival.

Para a determinação da atividade peroxidásica total salivar (PTS) e da mieloperoxidase (MPO) do fluido gengival foi utilizado o método descrito por Nishioka et al.<sup>66</sup> (2003) adaptado às condições do estudo. A atividade das enzimas foi determinada espectrofotometricamente utilizando os substratos guaiacol, para a avaliação PTS (SPO + MPO), e monoclorodimedona (MCD), para avaliação da atividade da MPO.

O guaiacol constitui um dos substratos mais utilizados em ensaios de peroxidases, devido especialmente à maior sensibilidade, menor custo e facilidade de utilização.

Para a análise da PTS foram utilizados 50 µL de saliva, guaiacol (30 mM) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (1 mM) adicionados em tampão fosfato de potássio (0,1M) pH. 7.0. A oxidação do guaiacol foi avaliada pelo aumento da absorbância, no comprimento de onda de 470 nm, por 120 segundos. A velocidade inicial foi determinada pela variação da absorbância por segundo, sendo as reações realizadas a 37°C.

Quando o objetivo é medir a atividade específica da MPO, avalia-se a formação de seu produto (ácido hipocloroso - HOCL), utilizando-se a monoclorodimedona (MCD).

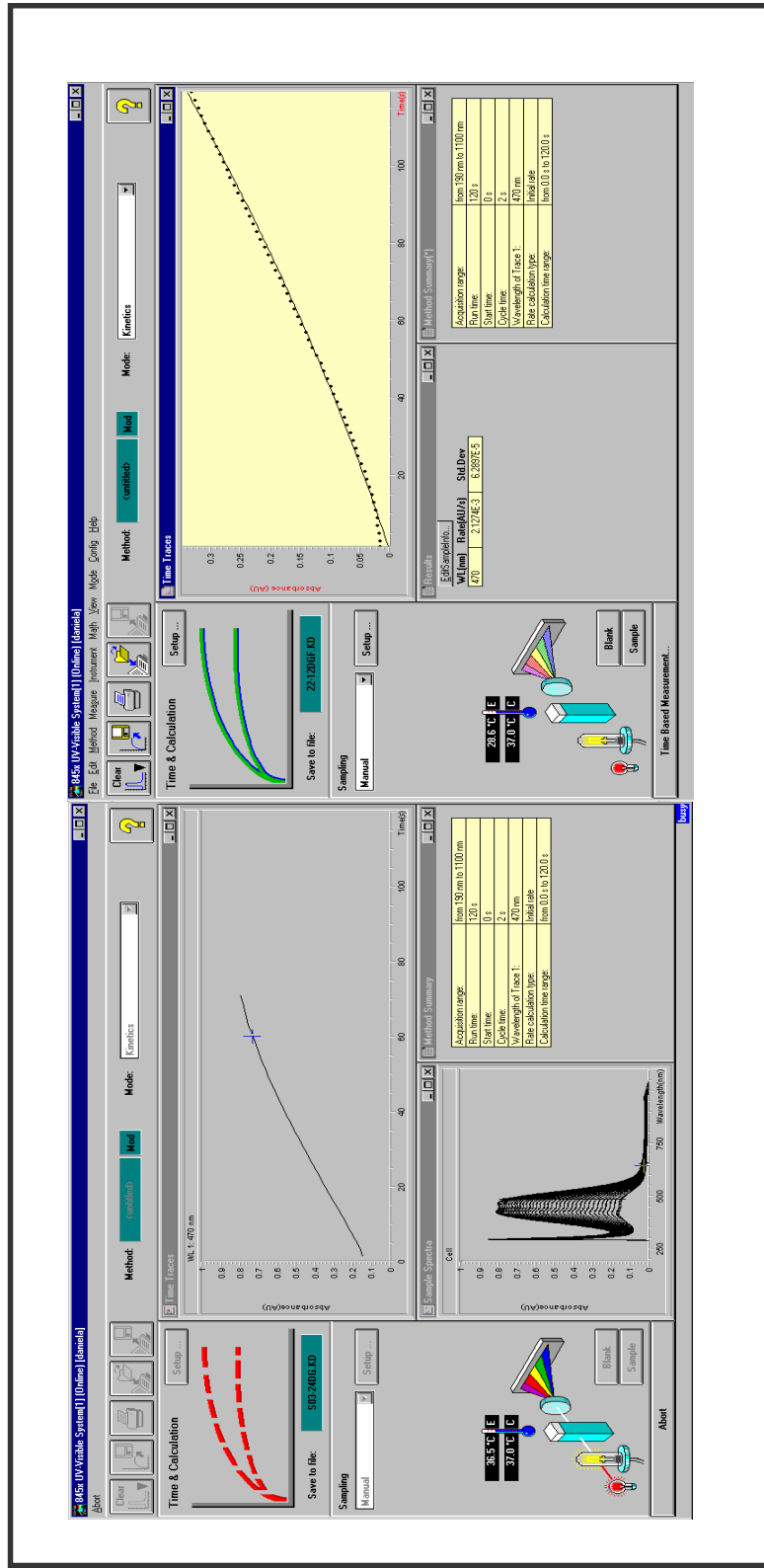
A atividade da MPO no fluido sulcular gengival foi determinada através da formação de seu produto, o HOCl. Para isso, utilizou-se monoclorodimedona, que se converte em dicloromedona por ação do HOCl, determinando queda na absorbância a 290 nm, devido à cloração da MCD. Os estudos cinéticos foram realizados utilizando-se 50µL de fluido gengival diluído em tampão fosfato de potássio (0,1 M) pH 7.0 com cloreto de sódio (NaCl) (140 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) e MCD (60 µM), seguindo a reação no comprimento de onda de 290 nm, registrando-se a queda da absorbância, por 120 segundos, a 37°C. A velocidade inicial foi determinada pela variação da absorbância por segundo.

Os ensaios espectrofotométricos foram realizados em Espectrofotômetro UV-Visível\* acoplado a uma “*Workstation*” e as leituras foram realizadas com cela termostatzada a 37°C, em cubetas de quartzo, com 1 cm de caminho óptico. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

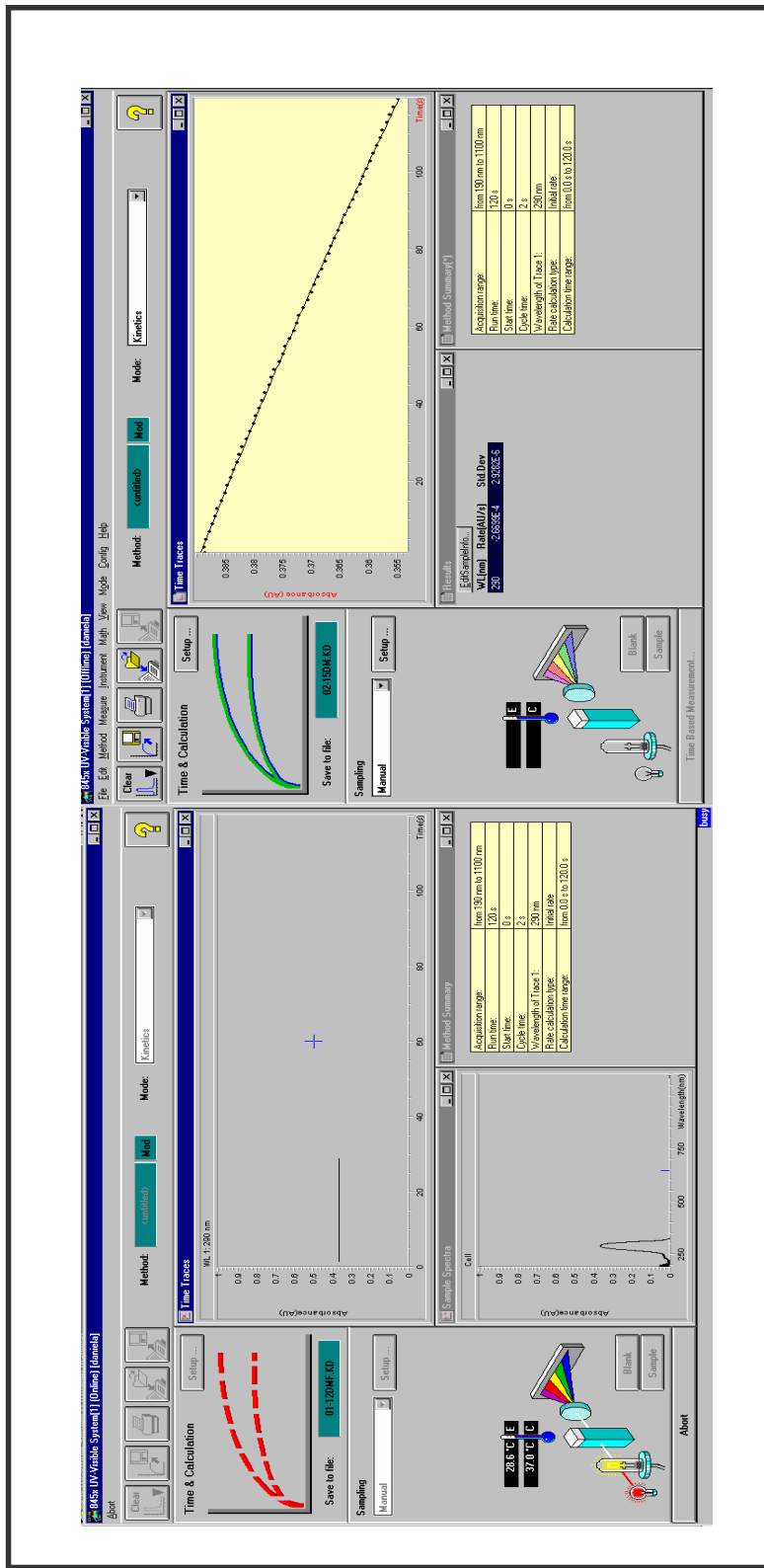
A unidade de atividade enzimática (UA) da PTS e da MPO foi determinada utilizando-se a seguinte definição: uma unidade de atividade enzimática equivale à quantidade de enzima que leva à variação de 0,0001 na absorção a 470 nm (PTS) ou a 290 nm (MPO) por segundo nas condições de ensaio. Para os cálculos da UA, tanto da PTS quanto da MPO, utilizou-se os valores de velocidade inicial de reação ( $v_0$ ) obtidos dos gráficos ( $\Delta A_{470\text{nm}}$  ou  $\Delta A_{290\text{nm}}$  X tempo reação em segundos) (Figuras 1 e 2).

---

\* Agilent Technologies 8453; Inc. Life Sciences and Chemical Analysis Santa Clara, USA.



**FIGURA - 1** Ensaio espectrofotométrico avaliando a atividade da PTS representação dos gráficos com valores de velocidade inicial de reação *versus* tempo da reação em segundos.



**FIGURA - 2** Ensaio espectrofotométrico avaliando a atividade da MPO e representação dos gráficos com valores de velocidade inicial de reação *versus* tempo da reação em segundos.

### 3.11 Análise microbiológica

A identificação bacteriana diretamente nas amostras de biofilme subgengival foi realizada pela técnica de “*checkerboard DNA-DNA hybridization*” descrita por Socransky et al.<sup>93</sup> (1994) e modificada por Haffajee et al.<sup>32</sup> (1997). As sondas de DNA foram confeccionadas utilizando-se o “*Random primer digoxigenin labeling kit*”<sup>\*</sup> conforme as instruções do fabricante. Todas as cepas bacterianas utilizadas na confecção das sondas genômicas foram obtidas da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia Oral, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Tabela 1). As suspensões bacterianas foram fervidas por 10 minutos e em seguida neutralizadas pela adição de 800 µL de 5 M de acetato de amônia.

Cada uma das amostras contendo o DNA desnaturado foi depositada em canaletas do “*Minislot 30*”<sup>\*\*</sup> (Figura 3), sobre uma membrana de nylon de 15 X 15 cm<sup>\*\*\*</sup>. Para permitir a fixação do DNA das amostras nas membranas, as mesmas foram incubadas a 120°C por 20 minutos em forno convencional<sup>\*\*\*\*</sup>. As duas últimas canaletas do *Minislot* foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies investigadas pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células bacterianas.

---

\* Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA.

\*\* Immunetics, Cambridge, MA, USA.

\*\*\* Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

\*\*\*\* Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil.



Após fixação do DNA nas membranas, essas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1 hora numa solução contendo 50% formamida, 1% caseína, 5 X SSC, 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “*Miniblotter 45*”<sup>\*</sup> (Figura 4), com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às canaletas do “*Miniblotter*”. Em cada canaleta foram colocados 135 µL de cada sonda específica diluída em solução de hibridização contendo 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 ng/mL de sonda de DNA específica. O aparato foi então incubado a 42°C por no mínimo 16 horas para hibridização.

Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do “*Miniblotter*” e lavadas duas vezes por 20 minutos, a 68°C, numa solução adstringente (0,1 X SSC, 0,1% SDS), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora numa solução contendo 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína (pH 8,0), e por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina<sup>†</sup>, numa diluição de 1/15.000. As membranas foram, então, lavadas com uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de *Tween* 20 (pH 8,0), 2 vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0,1 M de Tris - HCl e

---

<sup>\*</sup> Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA.

0,1 M de NaCl (pH 9,5). Em seguida, as membranas foram incubadas em uma solução contendo o substrato fluorescente ECF<sup>®\*</sup>.

Após incubação por 24 horas, os sinais de fluorescência resultantes da hibridização da sonda com a amostra foram captados por um sistema de captação de imagens<sup>\*\*</sup> (Figura 5).

A leitura dos sinais foi realizada visualmente por um único indivíduo treinado, e os sinais detectados comparados aos sinais dos controles de  $10^5$  e  $10^6$  presentes na mesma membrana. A detecção do sinal e a análise semiquantitativa das espécies bacterianas foram estimadas como: 0 = não detectável; 1 <  $10^5$ ; 2 =  $10^5$ ; 3 =  $10^5$ - $10^6$ ; 4 =  $10^6$  e 5 >  $10^6$  células bacterianas. A sensibilidade deste teste foi ajustada para permitir a detecção de pelo menos  $10^4$  células de cada espécie através do ajuste da concentração de cada sonda genômica. Este procedimento foi empregado a fim de fornecer a mesma sensibilidade de detecção para cada sonda. A não detecção de sinal foi interpretada como sendo zero. Entretanto, este valor não implicou na ausência total de determinada espécie, já que de 1 até 1.000 células bacterianas poderiam estar presentes na amostra<sup>94</sup>.

---

\* Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

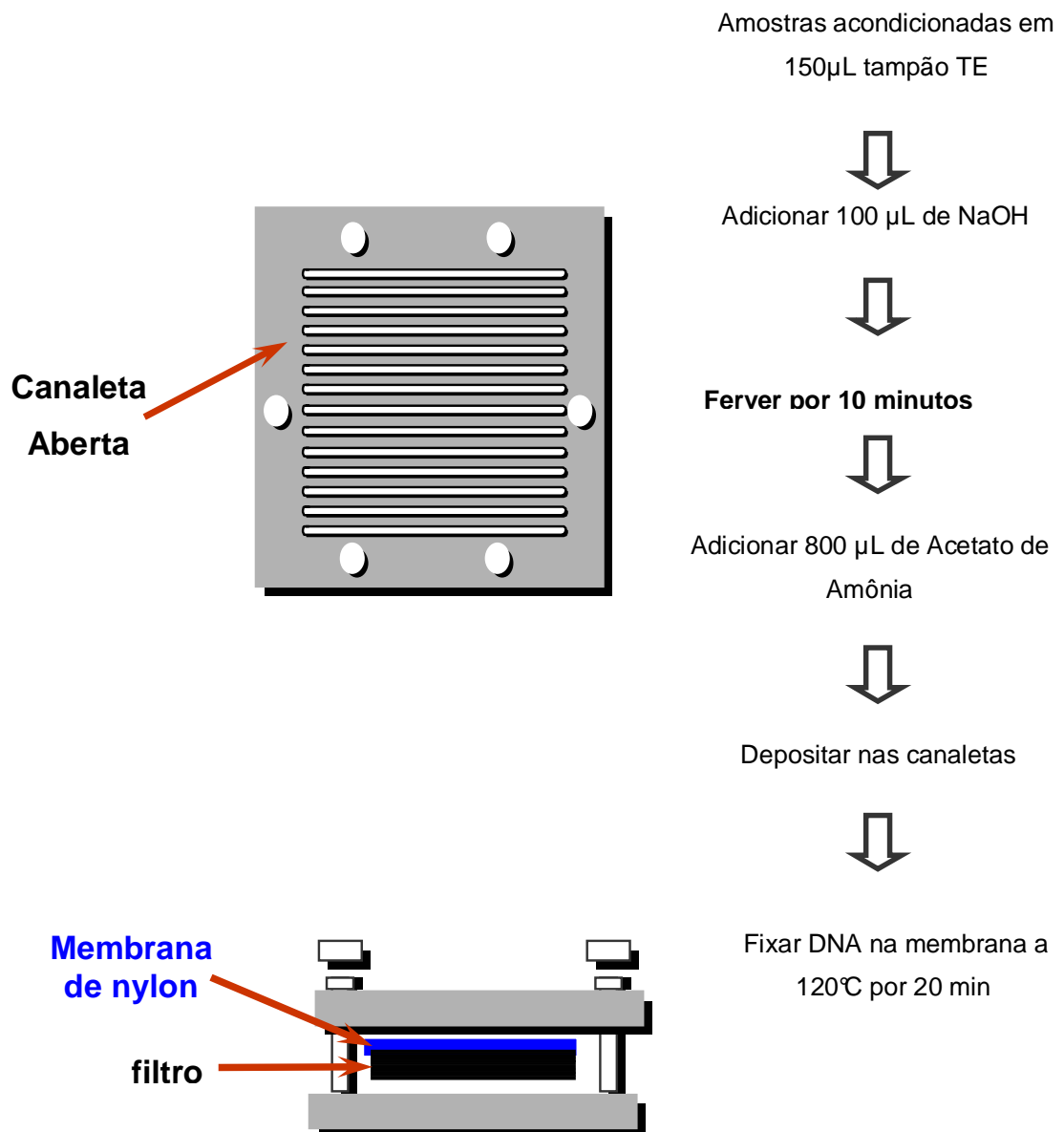
\*\* Storm<sup>™</sup> 860, Molecular Dynamics / Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

**TABELA 1-** Espécies subgengivais utilizadas para construção das sondas genômicas testadas contra amostras de placa subgengival

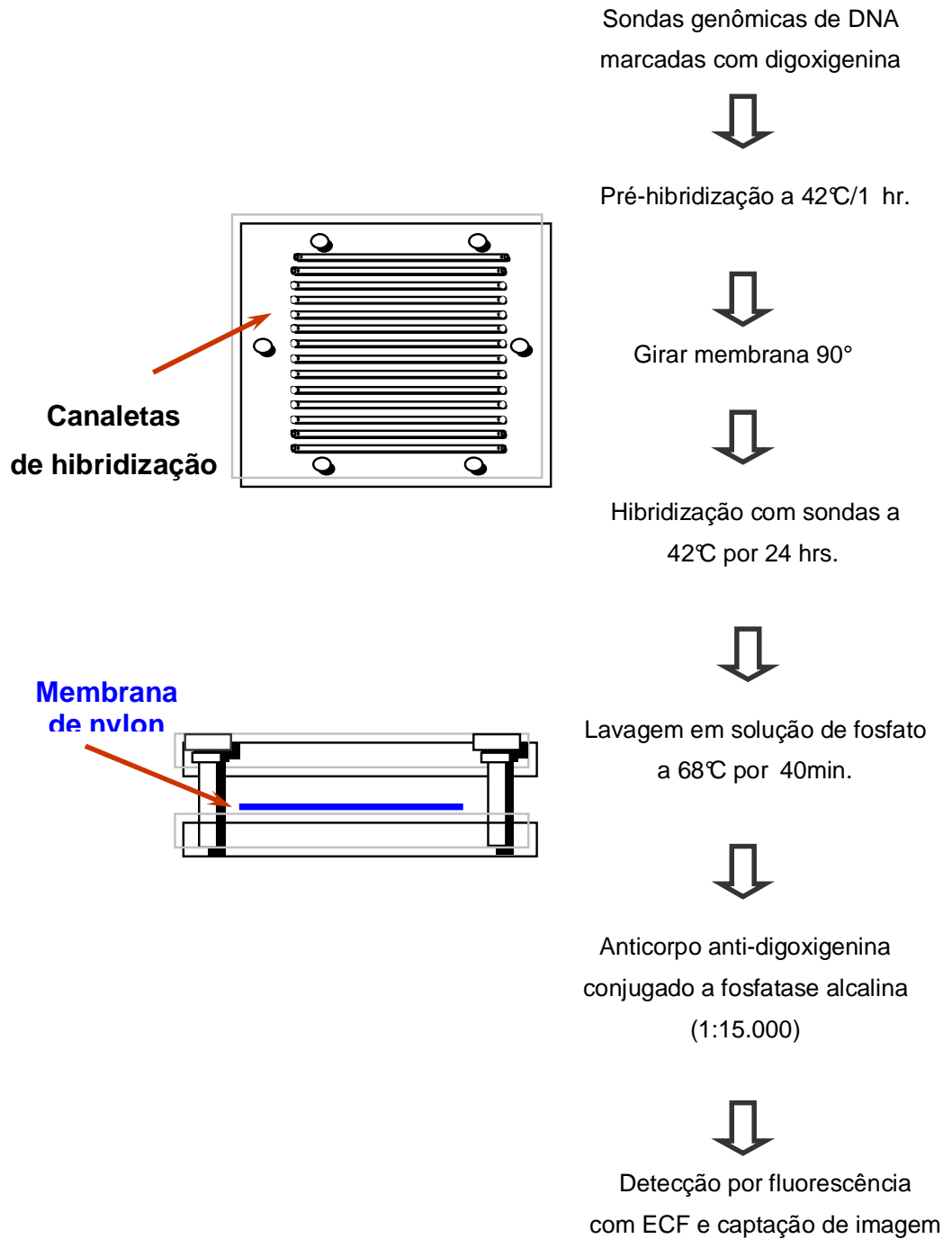
<b>Espécies</b>	<b>Cepas</b>	<b>Espécies</b>	<b>Cepas</b>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a</i>	43718 <sup>a</sup>	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 <sup>a</sup>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans b</i>	29523 <sup>a</sup>	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 <sup>a</sup>	<i>Parvimonas micra</i>	33270 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 <sup>a</sup>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 <sup>a</sup>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 <sup>a</sup>	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces naeslundii II (A. viscosus)</i>	43146 <sup>a</sup>	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 <sup>a</sup>
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 <sup>a</sup>	<i>Propionibacterium acnes</i>	11827 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 <sup>a</sup>	<i>Selenomonas noxia</i>	43541 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 <sup>a</sup>
<i>Campylobacter showae</i>	51146 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus mitis</i>	49456 <sup>a</sup>
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus oralis</i>	35037 <sup>a</sup>
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 <sup>a</sup>
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 <sup>a</sup>
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 <sup>a</sup>
<i>Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum</i>	10953 <sup>a</sup>	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 <sup>a</sup>
<i>Fusobacterium nucleatum ss. vincentii</i>	49256 <sup>a</sup>	<i>Treponema denticola</i>	B1 <sup>b</sup>
<i>Fusobacterium nucleatum ss. nucleatum</i>	25586 <sup>a</sup>	<i>Veillonella parvula</i>	10790 <sup>a</sup>
<i>Gemella morbillorum</i>	27824 <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)

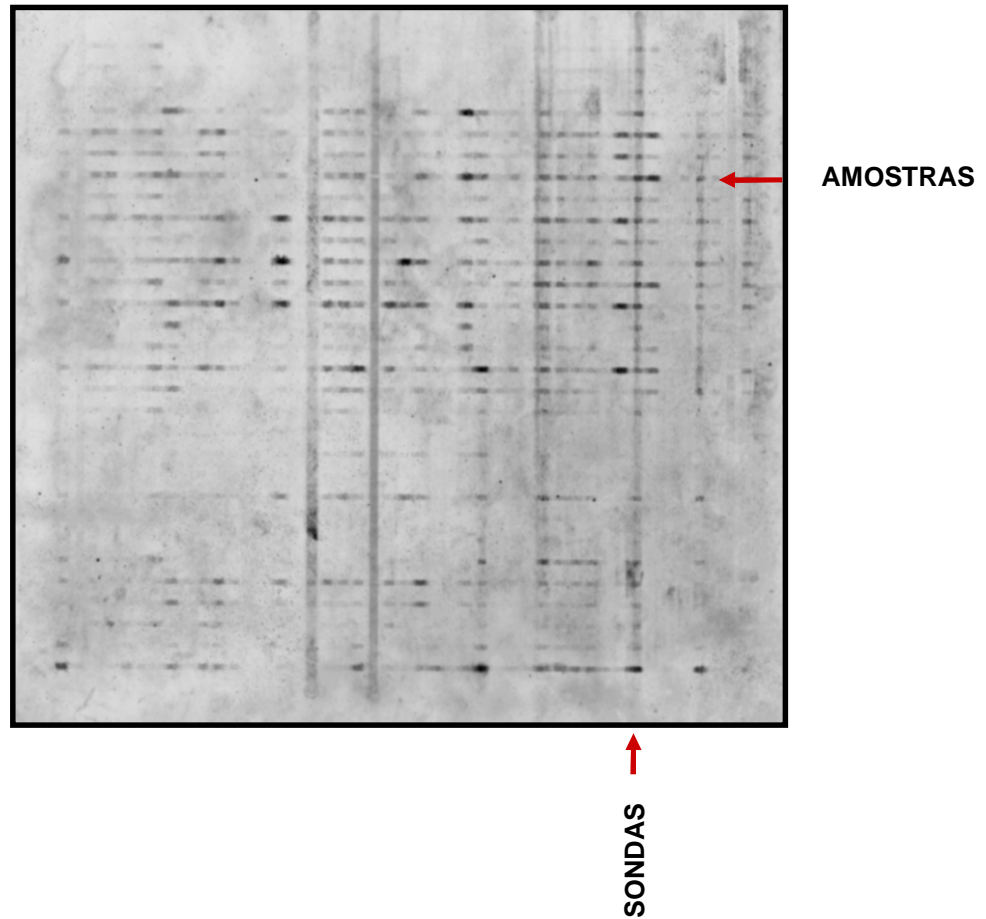
<sup>b</sup> The Forsyth Institute, Boston , MA



**FIGURA 3** - Esquema do aparato "Minislot 30".



**FIGURA 4** - Esquema do aparato “*Miniblotter 45*” e hibridização com as sondas de DNA.



**FIGURA 5** - Padrão de hibridização das sondas de DNA com as amostras de biofilme subgingival de pacientes em forma de tabuleiro de xadrez.

### 3.12 *Análise estatística*

A análise dos dados foi realizada por meio do *software* BioStat 3.0\* considerando-se o indivíduo como unidade de estudo.

---

\* Optical Digital Optical Technology, Belém, Brasil.

Os valores resultantes dos dados clínicos, microbiológicos e enzimáticos foram analisados por métodos estatísticos não-paramétricos. Os dados foram apresentados em valores de média, desvio-padrão, mediana e quartis (25% e 75%).

Para os dados de índice de placa visível (IPV), índice de sangramento marginal (ISM), sangramento à sondagem (SS) e presença de supuração (SUP), foi obtido o percentual de sítios positivos por paciente, e posteriormente um valor para o grupo. Os dados de profundidade de sondagem (PS) e de nível clínico de inserção (NI) foram expressos de duas formas: por distribuição de freqüências (em intervalos determinados) e em valor médio, em milímetros. Foi obtido primeiramente o percentual para o indivíduo e, posteriormente, para o grupo. O volume do fluido sulcular gengival foi expresso em valor mediano de volume coletado ( $\mu\text{L}$ ).

Para a atividade enzimática no fluido foram obtidos dois valores: atividade enzimática por sítio – (UA/sítio) e atividade enzimática por  $\mu\text{L}$  de fluido coletado – (UA / $\mu\text{L}$ ). Para a atividade enzimática por sítio, primeiramente foi obtido um valor mediano da atividade enzimática nos quatro sítios de cada indivíduo e posteriormente obtido um valor mediano para o grupo. Já para a atividade enzimática por  $\mu\text{L}$  de fluido coletado, inicialmente o valor da atividade enzimática em cada sítio foi dividido pelo volume de fluido sulcular coletado para o sítio, sendo posteriormente obtido um valor mediano para cada indivíduo e para o grupo.

Os dados microbiológicos foram expressos em porcentagem média de sítios colonizados (prevalência) por cada espécie e nível médio de cada espécie em cada amostra. Para a análise de prevalência foi considerada somente ausência (0) ou presença (>0) do microrganismo. Já os níveis das diferentes espécies foram determinados por meio da transformação dos registros 0 a 5 obtidos de controles  $10^5$  e  $10^6$  das contagens bacterianas. A frequência e os níveis de cada espécie bacteriana foram computados para cada indivíduo e posteriormente foi determinado um valor médio para o grupo.

Todas as análises referentes aos dados microbiológicos foram realizadas utilizando-se ajustes para comparações múltiplas como proposto por Socransky et al.<sup>91</sup> (1991). Foi aplicada a fórmula  $0.05=1(1-k)^{36}$ , onde k é o valor equivalente ao  $p<0.05$  quando ajustado para a comparação de 36 espécies bacterianas. Desta forma, as diferenças detectadas no presente estudo foram consideradas significantes quando  $p<0,001$ .

Para as análises foram utilizados os testes de Wilcoxon (comparação intragrupo) e Mann-Whitney (comparação intergrupos) e correlação de Spearman. O nível de significância estabelecido foi de 5% e o intervalo de confiança foi de 95%.



#### ***4 Capítulo 1 – Avaliação Enzimática***

##### ***EFFECT OF NON-SURGICAL PERIODONTAL THERAPY ON PEROXIDASE ACTIVITY IN DIABETIC PATIENTS***

Artigo submetido para publicação no periódico: Journal of Clinical  
Periodontology em 14 de Novembro de 2007 (Carta em anexo).

**(Anexo 4)**

**EFFECT OF NON-SURGICAL PERIODONTAL THERAPY ON PEROXIDASE  
ACTIVITY IN DIABETIC PATIENTS**

Daniela Gonçalves<sup>1</sup>, Fernanda Oliveira Bello Correa<sup>1</sup>, Najeh Maissar Khalil<sup>2</sup>,  
Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira<sup>3</sup>, Silvana Regina Perez Orrico<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Midwest State University (UNICENTRO), Guarapuava, PR, Brazil

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Chemical Technology, Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil

**Running title:** Enzymatic findings in diabetics

**Keywords:** periodontal disease/therapy; diabetes mellitus; myeloperoxidase; salivary peroxidase; glycemic control.

**Address Correspondence and Reprint Requests to:**

Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico  
Depto. de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara -  
UNESP Rua Humaitá, 1680, Cep: 14801-903 Araraquara, SP, Brasil  
Phone: 55 (16) 3301-6377 Fax: 55 (16) 3301-6369  
E-mail: s-orrico@foar.unesp.br

**Conflict of interest and source of funding statement**

The authors declare that they have no conflict of interests.

This study was supported in part by grants from the Coordination for Postgraduate Courses in Higher Education (CAPES, Brazil), by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, Brazil; Process #04/08142-0) and by the Foundation for the Development of UNESP (FUNDUNESP, Brazil; Process #00006/05-DFP).

### **ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate the effect of periodontal therapy on clinical parameters as well as on total salivary peroxidase (TSP) activity and myeloperoxidase (MPO) activity in the gingival crevicular fluid (GCF) of patients with type 2 diabetes mellitus and systemically healthy individuals.

**Material and Methods:** 20 type 2 diabetes patients with inadequate metabolic control (test group) and 20 systemically healthy individuals (control group), both groups with chronic periodontitis, were enrolled. Periodontal clinical parameters, namely periodontal probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), visible plaque index (VPI), bleeding on probing (BOP), gingival bleeding index (GBI) and presence of suppuration (SUP), as well as TSP activity and GCF MPO activity were assessed before and 3 months after non-surgical periodontal therapy.

**Results:** At baseline and 3 months posttreatment, the test group presented a higher percentage of sites with VPI and BOP ( $p < 0.01$ ). MPO activity in the GCF presented lower values ( $p < 0.05$ ) for the test group at both baseline and posttreatment period. The periodontal treatment resulted in a significant improvement of most clinical and enzymatic parameters for both groups ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** In both groups, the periodontal therapy was effective in improving most clinical parameters and reducing salivary and GCF enzymatic activity. The diabetic individuals presented lower MPO activity in the GCF.

### **Clinical Relevance**

**Scientific rationale for study:** The increased prevalence and severity of periodontitis in diabetics have been demonstrated. However, few studies have addressed the non-immunological defense mechanisms in individuals with inadequate metabolic control of diabetes. This study investigated the effect of periodontal therapy on the periodontal status and peroxidase activity in diabetics with inadequate metabolic control compared to systemically healthy individuals.

**Principal findings:** Periodontal therapy was effective in reducing infection with improvement of most clinical and enzymatic parameters evaluated in both groups.

**Practical implications:** Diabetic patients with periodontitis, even with inadequate metabolic control, might respond favorably to non-surgical periodontal therapy.

### **Introduction**

Immunoinflammatory reaction represents host's response to the microbiota and its products. In sites with active periodontal disease, it is clinically manifested by a series of alterations, including the increase of gingival crevicular fluid (GCF) flow (Kinane & Lappin 2001). For this reason, there has currently been a great interest in the diagnostic potential of GCF.

Saliva and GCF have several substances associated to host's defense and their increased levels may be related to the periodontal status, which might

allow identifying and monitoring patients with potential periodontitis progression (Lamster 1997; Armitage 2004). The salivary peroxidase system is one of the most important non-immunological defense systems in saliva. It is constituted by salivary peroxidase (SPO), originating from the parotid glands, leukocyte-derived myeloperoxidase (MPO) originating from the GCF, and other components (Tenovuo & Pruitt 1984).

SPO contributes in several manners to the maintenance of oral health. This enzyme has a bactericidal action that protects the teeth and oral mucosa by regulating the oral microbial species and their number (Mandel et al. 1989). It also prevents the accumulation of toxic products from hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and inactivates several cariogenic and mutagenic compounds (Tenovuo & Pruitt 1984; O'Brien 2000). SPO activity increases in the presence of gingival inflammation, returning to normal levels when oral health is restored (Smith et al. 1984).

Another important enzyme, MPO, may be detected both in saliva and in the GCF. It is the most abundant protein present in the primary neutrophil granules, and it is also found in monocytes though in a lesser amount. MPO catalyzes the conversion of  $H_2O_2$  and chloride ( $Cl^-$ ) into hypochlorous acid (HOCl), which is a potent oxidant produced by neutrophils, with a strong antimicrobial activity (O'Brien 2000). The relative contribution of MPO to total salivary peroxidase (TSP) activity depends on the presence of periodontal or oral inflammation (Smith et al. 1984).

GCF MPO may have a great potential as a periodontal disease marker (Karhuvaara et al. 1990; Smith et al 1992). It has been demonstrated that there is an increase in MPO level in the GCF in systemically healthy patients with

periodontitis (Smith et al 1986; Cao & Smith 1989; Yamalik et al. 2000; Wei et al. 2004). Both conventional (Smith et al. 1986; Wolff et al. 1988) and surgical periodontal treatment (Buchmann et al. 2002; Jentsch et al. 2004) may produce a significant decrease in MPO activity in the GCF.

Several factors may act modifying the host's response to aggressive agents and hence altering periodontitis expression and progression. Diabetes mellitus has been recognized as an important risk factor for periodontitis (Shlossman et al. 1990; Safkan-Seppala & Ainamo 1992; L oe 1993; Lalla et al. 2007). The greater severity and prevalence of periodontal disease in diabetics may be related to GCF alterations, vascularization of periodontal tissues, host's immunoinflammatory response, collagen metabolism and genetic patterns (Manouchehr-Pour & Bissada 1983; Oliver & Tervonen 1994; Mealey & Oates 2006). Studies evaluating the immunoinflammatory response in diabetics have shown greater cytokine secretion associated to periodontitis progression in these patients (Salvi et al. 1998; Engebretson et al. 2006; Navarro-Sanchez et al. 2007). Although several non-immunological markers from GCF may be evaluated (Armitage 2004),  $\beta$ -glucuronidase, aspartate aminotransferase, elastase and metalloproteinases (MMP-8 and MMP-9) have been the most often assessed markers in diabetics (Smith et al. 1996; Alpagot et al. 2001, Engebretson et al. 2006; Kumar et al. 2006). Regarding peroxidases, studies evaluating the saliva of patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus versus healthy individuals have reported a greater SPO (Tenovuo et al. 1986; Guven et al. 1996; Dodds et al. 2000) and MPO (Dodds et al. 2000) activity in diabetics. Other authors have not found differences in SPO (Aren et al. 2003) or MPO (Tenovuo et al. 1986) activity in this group of patients.

Due to the scarcity of studies addressing these non-specific defense mechanisms in diabetics and given the lack of investigations referring to the effect of periodontal treatment on these parameters, the purpose of this study was to evaluate the effect of non-surgical periodontal therapy on clinical parameters as well as on TSP activity and MPO activity in the GCF of type 2 diabetes mellitus (DM2) patients with inadequate metabolic control and systemically healthy individuals, both groups with chronic periodontitis.

## **Material and Methods**

### **Patients**

Patients selected for entry to the study were recruited from the Clinic of Periodontics for Diabetic Patients of the Department of Diagnosis and Surgery of the School of Dentistry of Araraquara, São Paulo State University, Brazil between January 2005 and July 2006.

The sample size was calculated based on previous information from a pilot study recently conducted by our group (unpublished data). It was estimated that with a minimum of 20 subjects *per* group, significant differences in the clinical parameters, TSP activity and GCF MPO activity would be detected between the study periods (baseline and 3 months after non-surgical periodontal therapy) with 80% statistical power and 95% confidence interval.

The study population was constituted by 40 individuals of both sexes aged 30 to 60 years and presenting chronic periodontitis (AAP 1999). All subjects enrolled in the study presented at baseline a minimum of 15 natural teeth (excluding third molars) and at least 4 teeth with one or more sites with periodontal probing depth (PD)  $\geq 5$  mm, clinical attachment level (CAL)  $\geq 4$  mm,

visible plaque and bleeding on probing (BOP). The following exclusion criteria were considered for both groups: history of antibiotic therapy within the previous 6 months and antiinflammatory drugs within the previous 3 months; pregnancy or use of contraceptives or any other form of hormone; current smoker or former smoker for <5 years; and periodontal treatment within the previous 12 months. The study was conducted in full accordance with the applicable ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki, and was independently reviewed and approved by the Ethics in Human Research Committee of the School of Dentistry of Araraquara (UNESP) (Protocol number 85/04). Study purposes and procedures were fully explained to the participants and written informed consent was obtained from all of them.

Two groups with specific criteria were formed: *test group*: composed of 20 DM2 patients (ADA 2005) (8 men and 12 women; mean age =  $45.80 \pm 6.01$  years) with inadequate metabolic control (glycated hemoglobin test HbA1c  $\geq 7\%$ ) (UKPDS 1998) and mean diabetes duration of  $9.85 \pm 7.10$  years; and *control group*: composed of 20 systemically healthy patients (10 men and 10 women; mean age =  $43.65 \pm 6.01$  years) without diabetes, as confirmed by a fasting glycemia test result  $\leq 100$  mg/dL.

All DM2 patients were under supervision of an endocrinologist, with no alteration in the diabetes treatment in the last year prior to the study and were authorized by their physician to undergo periodontal treatment. Seventy percent of these patients had at least one diabetes-related complication (e.g.: hypertension, retinopathy, neuropathy or nephropathy). Fifty-five percent of the patients were receiving oral hypoglycemic agents or dietary control only, 15%



were undergoing insulin therapy and 30% were treated with a combination of insulin and oral hypoglycemic agents.

Individuals that required antibiotic prophylaxis prior to periodontal examination were excluded.

### **Intraoral Clinical Evaluation**

All patients were submitted to intraoral clinical examination by a single trained calibrated examiner ( $\kappa=0.90$ , data not shown).

The following clinical parameters were evaluated in six sites of all teeth, except for third molars: visible plaque index (VPI) (Ainamo & Bay 1975), gingival bleeding index (GBI) (Ainamo & Bay 1975), PD, CAL, BOP and presence of suppuration (SUP), using the manual periodontal probe from the University of North Carolina (Hu-Friedy<sup>®</sup>, Chicago, IL, USA). Clinical examinations were performed at baseline and 3 months after completion of the periodontal treatment.

### **Saliva Collection**

Patients were instructed not to consume any type of food within at least 1 hour before saliva collection. All collections were performed in the morning. Approximately 2 mL of non-stimulated saliva were collected and stored in labeled 1.5-mL eppendorf tubes. The samples were centrifuged during 30 minutes at 13,200 rpm and 4°C and thereafter frozen (-20°C) for analysis of the enzymatic activity after 24 hours.

### **GCF Collection**

In each individual, four sites with PD  $\geq$ 5 mm, CAL  $\geq$ 4 mm and BOP were randomly chosen in different non-adjacent teeth for GCF collection. The sites to be sampled were isolated with cotton rolls and gently air dried. Stagnated GCF samples were collected with paper strips (PerioPaper, ProFlow Inc., Amityville, NY, USA) introduced into the periodontal pocket and left for 30 seconds. GCF sample volume was measured with a calibrated Periotron 8000 equipment (Proflow Inc., Amityville, NY, USA). The samples were stored individually in labeled 1.5-mL eppendorf tubes containing potassium phosphate buffer (0.1 M, pH. 7.0) with cetyltrimethylammonium bromide (3 mM) and stored at 4°C. The laboratorial processing was undertaken within 24 hours after collections. Samples visibly contaminated with blood were discarded.

### **Enzymatic Assays**

The method described by Nishioka et al. (2003) was adapted to the study conditions for determination of TSP activity and MPO activity in the GCF. The enzymatic activity was determined spectrophotometrically using guaiacol for analysis of TSP activity and monochlorodimedon (MCD) for analysis of MPO activity.

For analysis of TSP activity, 50  $\mu$ L of saliva, guaiacol (30 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH. 7.0) were used. Guaiacol oxidation was evaluated by absorbance increase at 470 nm wavelength during 120 seconds. The initial rate of reaction was determined by absorbance variation in seconds. Reactions were performed at 37°C.

GCF MPO activity was determined by the formation of its product, HOCl. For such purpose, MCD was used, which is converted into dichlorodimedon by

the action of HOCl, with decrease of the absorbance at 290 nm wavelength due to MCD chlorination. The kinetic assays were undertaken using 50  $\mu$ L of GCF diluted in potassium phosphate buffer (0.1 M) pH 7.0 with NaCl (140 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) and MCD (60  $\mu$ M), followed by reaction at 290 nm wavelength. Absorbance decrease was recorded during 120 seconds at 37°C. The initial rate was determined by the absorbance range in seconds.

The spectrophotometric assays were undertaken in a UV-visible spectrophotometer (Agilent Technologies 8453; Inc. Life Sciences and Chemical Analysis Santa Clara, USA) coupled to a workstation. The readings were performed with a thermostated cell at 37°C in quartz cuvette with 1 cm optical pathway. All assays were made in triplicate.

TSP and MPO enzymatic activity units (AUs) were determined based on the following definition: one enzymatic AU equals the amount of enzyme that causes a variation of 0.001 in the absorbance at 470 nm (TSP) or 290 nm (MPO) wavelength under assay conditions. To calculate AU for both TSP and MPO, the values of initial rate of reaction ( $v_0$ ) obtained from the graphs ( $\Delta A_{470\text{nm}}$  or  $\Delta A_{290\text{nm}}$  versus reaction time in seconds) were used.

### **Glycemic Control**

The glycemic control was evaluated by the concentration of glycosylated hemoglobin A1c (% HbA1c) using high-performance liquid chromatography (DiaSTAT Hemoglobin A1c Analyzer System, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). This analysis was performed at baseline and 3 months after periodontal therapy.

### **Periodontal Treatment**

After all collections had been made, non-surgical periodontal therapy was performed, comprising scaling and root planing, oral hygiene instructions and biofilm control. After scaling and root planing, a professional plaque control program was performed twice a month for three months, which comprised supragingival plaque removal and reinstruction of oral hygiene procedures. Thereafter, all patients were clinically reexamined and new saliva and GCF samples were collected to evaluate the effect of the non-surgical periodontal therapy on the previously assessed clinical and enzymatic parameters.

### **Statistical Analysis**

Data analysis was performed using BioStat 3.0 software (Optical Digital Optical Technology, Belém, PA, Brazil) considering the individual as a study unit.

The clinical and enzymatic data were analyzed statistically by non-parametric statistical methods. Wilcoxon (intragroup comparison) and Mann-Whitney (intergroup comparison) tests as well as Spearman's correlation were used. Significance level was set at 5% and a 95% confidence interval was established. The tests were based on the median values with variability measures (25% and 75% quartiles).

For VPI, GBI, BOP and SUP data, the percentage of positive sites was obtained *per patient*, and thereafter a mean value was calculated for the group. For distribution of PD and CAL frequencies, measured in millimeters, the percent frequency was first obtained *per patient* and thereafter a mean value was calculated for the group. GCF volume was expressed as the median value of collected volume ( $\mu\text{L}$ ).

For enzymatic activity in the GCF, two values were obtained: enzymatic activity *per site* (AU/site) and enzymatic activity *per*  $\mu\text{L}$  of collected GCF sample (AU / $\mu\text{L}$ ). For AU/site, a median value of enzymatic activity in the four sites of each individual was first obtained and then a median value was calculated for the group. For AU / $\mu\text{L}$ , the value of enzymatic activity in each site was divided by the volume of GCF collected *per site*, and thereafter a median value was obtained for each individual and for the group.

## **Results**

The total of patients completed all phases of this study. No drop out occurred.

### **Clinical Findings**

Medians and quartiles of the clinical parameters recorded for both groups at baseline and 3 months posttreatment are summarized in Tables 1 and 2. At baseline, the test group presented significantly higher percent values for VPI ( $p < 0.001$ ) and BOP ( $p < 0.001$ ) compared to the control group. The other clinical parameters did not differ significantly between the groups.

In both groups, the non-surgical periodontal treatment yielded a significant reduction in the percentage of sites with VPI, GBI, BOP, PD between 4-6 mm, PD  $\geq 7$  mm and CAL  $\geq 7$  mm, while the percentage of sites with CAL between 4-6 mm increased significantly, probably due to the decrease in the percentage of sites with CAL  $\leq 7$  mm.

Intergroup comparison at 3 months revealed a higher percentage of sites with VPI ( $p < 0.001$ ), GBI ( $p < 0.001$ ) and BOP ( $p = 0.002$ ) in the test group.

In the test group, the periodontal treatment resulted in a non-significant decrease in the HbA1c ( $p=0.7937$ ) values from baseline (mean  $\pm$  SD:  $9.43 \pm 1.80$ ) to the 3-month interval (mean  $\pm$  SD:  $9.03 \pm 1.94$ ).

The periodontal treatment had no adverse effect in the patients of either groups.

### **Biochemical Analyses**

There were no statistically significant differences ( $p>0.05$ ) between the groups with respect to salivary enzymatic activity at either baseline or 3 months. The analysis of the enzymatic activity in the GCF showed significantly lower values for the test group ( $p<0.05$ ) at baseline and at 3 months. In both groups, the periodontal treatment was effective in reducing the enzymatic activity in saliva and in the GCF ( $p<0.05$ ) (Table 1 and 2).

For the control group, there was a positive correlation between TSP activity and the presence of teeth with SUP ( $r = 0.7466$ ;  $p=0.0001$ ). The test group did not present a correlation with any of the evaluated parameters.

### **Discussion**

The present study evaluated the effect of non-surgical periodontal therapy on clinical parameters and on TSP activity and GCF MPO activity in DM2 patients with inadequate metabolic control compared to systemically healthy individuals.

The DM2 patients presented significantly higher VPI and BOP values at baseline. These results are consistent with those of other studies that found a higher risk to periodontal disease in type 1 and type 2 diabetics compared to non-diabetic individuals (Bridges et al. 1996; Guven et al. 1996; Aren et al. 2003; Lalla et al. 2007) and a positive association between poor metabolic control and

increase of the susceptibility to periodontitis (Seppala & Ainamo 1994; Karjalainen & Knuutila 1996; Novaes et al. 1996; Taylor et al. 1998; Lim et al. 2007).

In both groups, the conventional periodontal treatment improved most evaluated clinical parameters. These findings corroborate those of previous studies, which employed conventional periodontal therapy alone in diabetics and observed improvement only in the clinical parameters, without significant alteration in glycemic control (Smith et al. 1996; Cristgau et al. 1998; Janket et al. 2005).

While a considerable improvement in the clinical parameters was evident 3 months after periodontal treatment, a higher percentage of sites with gingival bleeding and BOP was observed in the test group. It is likely that patients' inadequate metabolic control contributed to these results. In addition, higher VPI values were found in the test group after treatment, in spite of the rigorous periodontal monitoring program to which the patients were submitted. This finding may be related to the fact that diabetics with inadequate metabolic control may be less compliant with oral self-care (Karjalainen et al. 1994) and maintenance of a good oral health status (Syrjala et al. 1999).

Diabetic individuals present a deficiency in the defense mechanisms against infectious agents (Manouchehr et al. 1981; Sawant 1993). Studies investigating immunological defense mechanisms have demonstrated an increase in the production of individual cytokines and pro-inflammatory mediators (Salvi et al. 1997; Kumar et al. 2006; Engebretson et al. 2006; Navarro-Sanchez et al. 2007). However, there are few studies addressing the non-immunological

defense mechanisms in individuals with inadequate metabolic control of diabetes mellitus.

In the present study, there was no significant difference in TSP activity between the test and control groups at baseline and 3 months posttreatment. These results are consistent with those of Aren et al. (2003), who investigated whether periodontal destruction and alterations in the salivary status were present with duration of diabetes in children with type 1 insulin-dependent diabetes mellitus (DM1) compared to healthy controls. Guven et al. (1996) reported greater SPO activity in patients with insulin-dependent diabetes mellitus compared to healthy individuals, which has also been observed by Tenovuo et al. (1986) though without report of metabolic control. Regarding salivary MPO activity, Tenovuo et al. (1986) have not find differences between type 1 diabetics and healthy individuals, while Dodds et al. (2000) have reported a greater concentration of SPO and MPO in patients with poorly controlled diabetes mellitus. Nevertheless, there are some methodological differences between the present study and the above-mentioned investigations. In this study, we evaluated enzyme activity rather than its concentration, as did some of those authors and the diabetic group was formed exclusively by DM2 patients, unlike some of those studies.

In the present study, the TSP activity of the control group was positively correlated to the presence of SUP and might be the cause of the larger number of polymorphonuclear neutrophils (PMN) in saliva via gingival exudation.

GCF MPO activity was significantly lower in the test group compared to the healthy controls. As far as it could be ascertained, this is the first study to



investigate MPO activity in the GCF and the effect of periodontal treatment on the activity of this enzyme in the gingival fluid of individuals with diabetes mellitus.

Several studies (Cao & Smith 1989; Karhuvaara et al. 1990; Smith et al. 1992; Wolff et al. 1997; Yamalik et al. 2000; Wei et al. 2004) have demonstrated an increase in MPO levels and/or activity in the GCF of patients with periodontitis. However, these evaluations have been performed in systemically healthy individuals.

The findings of the present study may be supported by the results of previous studies (Sato et al. 1992; Sato et al. 1997; Uchimura et al. 1999), which reported lower MPO activity in the leukocytes of DM2 patients compared to healthy controls. On the other hand, Wykretowicz et al. (1993) detected low intracellular MPO activity in DM2 patients, whereas Lanza (1998) reported that diabetes mellitus is a clinical condition in which secondary MPO deficiency might occur. Regarding metabolic control, Sato et al. (1992) and Kemono et al. (1985) observed a decrease in MPO activity in the blood of patients with poorly controlled diabetes mellitus, being that the improvement in metabolic control did not alter the enzymatic activity (Kemono 1985).

PMN play an important role in the maintenance of the periodontal health against the bacterial challenge. Nevertheless, the occurrence of dysfunctions in these cells with respect of chemotaxis, adherence and phagocytosis has been observed in diabetics (Manouchehr-Pour et al. 1981; Marhoffer et al. 1992; Sawant 1993; Gustke et al. 1998; Delamaire et al. 1997), which may be related to the inadequate metabolic control of diabetes mellitus (Wierusz-Wysocka et al. 1993).

MPO originates from the primary neutrophil granule and the evaluation of its activity has been used in studies that investigate PMN function (Okouchi et al. 2002; Okouchi et al. 2004). Therefore, it may be raised the hypothesis that the lower MPO activity observed in the GCF of patients with inadequate metabolic control of diabetes might derive from a deficit in the primary defense mechanism of these individuals in response to the aggressive agent.

In both groups, the periodontal treatment reduced significantly TSP activity and GCF MPO activity. These results are similar to those observed by Smith et al. (1984) in a study with experimental gingivitis in healthy individuals, in which an increase of TSP activity was observed in the presence of gingival inflammation with decrease after restarting oral hygiene habits.

Regarding GCF MPO activity, several studies (Smith et al. 1986; Wolff et al. 1988; Buchmann et al. 2002; Jentsch et al. 2004) have demonstrated that the periodontal treatment produces a significant decrease of MPO activity and levels in the GCF of systemically healthy individuals.

Within the limitations of this study, it may be concluded that TSP activity was similar for individuals with type 2 diabetes with inadequate metabolic control and systemically healthy individuals. However, an important finding was the lower GCF MPO activity in the diabetic group. The periodontal treatment was effective in reducing infection with consequent improvement of most clinical and enzymatic parameters evaluated in both groups. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate the decrease of TSP activity and GCF MPO activity after periodontal therapy in diabetic individuals, which indicates that, in spite of the inadequate metabolic control, these patients may respond favorably to periodontal treatment.

Although the present study reached significant results, one of its limitations was the small sample size due to the use of restrict inclusion and exclusion criteria in an attempt to minimize the presence of confounding factors that could bias the outcomes. Due to the lack of currently available studies addressing non-immunological defense mechanisms in diabetes mellitus patients with inadequate metabolic control, it is important to conduct further studies addressing such parameters with larger samples in order to elucidate the response to aggressive agents in these patients.

#### **Acknowledgments**

The authors are thankful to Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti and Prof. Dr. José Silvio Govone.

#### **References**

- Ainamo, J. & Bay, I. (1975) Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal* **25**, 229-235.
- Alpagot T., Silverman S., Lundergan W., Bell C., Chambers D.W (2001) Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. *J Periodontal Res* 36, 169-74.
- Aren, G., Sepet, E., Ozdemir, D., Dincag, N., Guvener, B. & Firatli, E. (2003) Periodontal health, salivary status, and metabolic control in children with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Periodontology* **74**, 1789-1795.
- Armitage, G. C. (2004) Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontology 2000* **34**, 109-119.

- Bridges, R. B., Anderson, J. W., Saxe, S. R., Gregory, K. & Bridges, S. R. (1996) Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *Journal of Periodontology* **67**, 1185-1192.
- Buchmann, R., Hasilik, A., Nunn, M. E., Van Dyke, T. E. & Lange, D. E. (2002) PMN responses in chronic periodontal disease: evaluation by gingival crevicular fluid enzymes and elastase-alpha-1-proteinase inhibitor complex. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 563-572.
- Cao, C. F. & Smith, Q. T. (1989) Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. *Journal of Clinical Periodontology* **16**, 17-20.
- Christgau, M., Palitzsch, K. D., Schmalz, G., Kreiner, U. & Frenzel, S. (1998) Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 112-124.
- Delamaire, M., Maugeudre, D., Moreno, M., Le Goff, M. C., Allanic, H. & Genetet, B. (1997) Impaired leukocyte functions in diabetic patients. *Diabetes Medicine* **14**, 29-34.
- Dodds, M. W., Yeh, C. K. & Johnson, D. A. (2000) Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* **28**, 373-381.
- Engbretson S.P., Vossughi F., Hey-Hadavi J., Emingil G., Grbic J.T. (2006) The influence of diabetes on gingival crevicular fluid beta-glucuronidase and interleukin-8. *J Clin Periodontol* **33**, 784-90.

- Gustke, C. J., Stein, S. H., Hart, T. C., Hoffman, W. H., Hanes, P. J., Russell, C. M., Schuster, G. S. & Watson, S. C. (1998) HLA-DR alleles are associated with IDDM, but not with impaired neutrophil chemotaxis in IDDM. *Journal of Dental Research* **77**, 1497-1503.
- Güven, Y., Satman, I., Dinçcag, N. & Alptekin, S. (1996) Salivary peroxidase activity in whole saliva of patients with insulin-dependent (type-1) diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology* **23**, 879-881.
- Janket, S. J., Wightman, A., Baird, A. E., Van Dyke, T. E. & Jones, J. A. (2005) Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *Journal of Dental Research* **84**, 1154-1159.
- Jentsch, H., Sievert, Y. & Gocke, R. (2004) Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 511-514.
- Karjalainen, K. M., Knuutila, M. L. & von Dickhoff, K. J. (1994) Association of the severity of periodontal disease with organ complications in type 1 diabetic patients. *Journal of Periodontology* **65**, 1067-1072.
- Karjalainen, K. M. & Knuutila, M. L. (1996) The onset of diabetes and poor metabolic control increases gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology* **23**, 1060-1067.
- Karhuvaara, L., Tenovuori, J. & Sievers, G. (1990) Crevicular fluid myeloperoxidase--an indicator of acute gingival inflammation. *Proceedings of the Finnish Dental Society* **86**, 3-8.

- Kemona, H., Podkowicz, K. & Prokopowicz, J. (1985) Cytochemical indices of leukocytes in patients with diabetes mellitus. *Folia Haematologica Internationales Magazin fur Klinische und Morphologische Blutforschung* **112**, 97-202.
- Kinane, D. F. & Lappin, D. F. (2001) Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontologica Scandinavica* **59**, 154-160.
- Kumar, M. S., Vamsi, G., Sripriya, R. & Sehgal, P. K. (2006) Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *Journal of Periodontology* **77**, 1803-1808.
- Lalla, E., Cheng, B., Lal, S., Kaplan, S., Softness, B., Greenberg, E., Goland, R. S. & Lamster, I. B. (2007) Diabetes mellitus promotes periodontal destruction in children. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 294-298.
- Lamster, I. B. (1997) Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Annals of Periodontology* **2**, 123-137.
- Lanza, F. (1998) Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *Journal of Molecular Medicine* **76**, 676-681.
- Lim, L. P., Tay, F. B., Sum, C. F. & Thai, A. C. (2007) Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 118-123.
- Loe, H. (1993) Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **16**, 329-334.
- Mandel, I. D. (1989) The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *Journal of the American Dental Association* **119**, 298-304.

- Manouchehr-Pour, M. & Bissada, N. F. (1983) Periodontal disease in juvenile and adult diabetic patients: a review of the literature. *Journal of the American Dental Association* **107**, 766-770.
- Manouchehr-Pour, M., Spagnuolo, P. J., Rodman, H. M. & Bissada, N. F. (1981) Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease. *Journal of Periodontology* **52**, 410-405.
- Marhoffer, W., Stein, M., Maeser, E. & Federlin, K. (1992) Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* **15**, 256-260.
- Mealey, B. L. & Oates, T. W. (2006) American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of Periodontology* **77**, 1289-1303.
- Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. (2007) 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) **34**, 835-43.
- Nishioka, T., Maki, K., Kimura, M. & Takahama, U. (2003) Determination of salivary peroxidase activity in human mixed whole saliva. *Archives of Oral Biology* **48**, 397-400.
- Novaes Junior, A. B., Gutierrez, F. G. & Novaes, A. B (1996) Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I - Probing pocket depth and clinical attachment. *Brazilian Dental Journal* **7**, 65-73.
- O'Brien P. J. (2000) Peroxidases. *Chemical Biology Interaction* **1**, 113-139.

- Okouchi, M., Okayama, N., Imai, S., Omi, H., Shimizu, M., Fukutomi, T. & Itoh, M. (2002) High insulin enhances neutrophil transendothelial migration through increasing surface expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 via activation of mitogen activated protein kinase. *Diabetologia* **45**, 1449-1456.
- Okouchi, M., Okayama, N., Omi, H., Imaeda, K., Fukutomi, T., Nakamura, A. & Itoh, M. (2004) Protective actions of gliclazide on high insulin-enhanced neutrophil-endothelial cell interactions through inhibition of mitogen activated protein kinase and protein kinase C pathways. *Microvascular Research* **67**, 1-8.
- Oliver, R. C. & Tervonen, T. (1994) Diabetes--a risk factor for periodontitis in adults? *Journal of Periodontology* **65**, 530-538.
- Safkan-Seppala, B. & Ainamo, J. (1992) Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology* **19**, 24-29
- Salvi, G. E., Yalda, B., Collins, J. G., Jones, B. H., Smith, F. W., Arnold, R. R. & Offenbacher, S. (1997) Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Journal of Periodontology* **68**, 127-135.
- Salvi G.E., Beck J.D., Offenbacher S. (1998) PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol* **3**, 40-50.
- Sato, N., Kashima, K., Tanaka, Y., Shimizu, H. & Mori, M. (1997) Effect of granulocyte-colony stimulating factor on generation of oxygen-derived free



radicals and myeloperoxidase activity in neutrophils from poorly controlled NIDDM patients. *Diabetes* **46**, 133-137.

Sato, N., Shimizu, H., Suwa, K., Shimomura, Y., Kobayashi, I. & Mori, M. (1992) MPO activity and generation of active O<sub>2</sub> species in leukocytes from poorly controlled diabetic patients. *Diabetes Care* **15**, 1050-1052.

Sawant, J. M. (1993) Biochemical changes in polymorphonuclear leucocytes in diabetic patients. *Journal of Postgraduate Medicine* **39**, 183-186.

Seppala, B. & Ainamo, J. (1994) A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 161-165.

Shlossman, M., Knowler, W. C., Pettitt, D. J. & Genco, R. J. (1990) Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *Journal of the American Dental Association* **121**, 532-536.

Smith, A. J., Smith, G., Basu, M. K. & Walsh, T. F. (1984) Changes in salivary peroxidase activity observed during experimentally-induced gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* **11**, 373-378.

Smith, Q. T., Au, G. S., Freese, P. L., Osborn, J. B. & Stoltenberg, J. L. (1992) Five parameters of gingival crevicular fluid from eight surfaces in periodontal health and disease. *Journal of Periodontal Research* **27**, 466-475.

Smith, G. T., Greenbaum, C. J., Johnson, B. D. & Persson, G. R. (1996) Short-term responses to periodontal therapy in insulin-dependent diabetic patients. *Journal of Periodontology* **67**, 794-802. Erratum in: *Journal of Periodontology* **67**, 1368.

- Smith, Q. T., Hinrichs, J. E. & Melnyk, R. S. (1986) Gingival crevicular fluid myeloperoxidase at periodontitis sites. *Journal of Periodontal Research* **21**, 45-55.
- Syrjala, A. M., Knecht, M. C. & Knuutila, M. L. (1999) Dental self-efficacy as a determinant to oral health behaviour, oral hygiene and HbA1c level among diabetic patients. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 616-621.
- Taylor, G. W., Burt, B. A., Becker, M. P., Genco, R. J. & Shlossman, M. (1998) Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Annals of Periodontology* **3**, 30-39.
- Tenovuo, J., Lehtonen, O. P., Viikari, J., Larjava, H., Vilja, P. & Tuohimaa, P. (1986) Immunoglobulins and innate antimicrobial factors in whole saliva of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Dental Research* **65**, 62-66.
- Tenovuo, J. & Pruitt, K. M. (1984) Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. *Journal of Oral Pathology* **13**, 573-584.
- Uchimura, K., Nagasaka, A., Hayashi, R., Makino, M., Nagata, M., Kakizawa, H., Kobayashi, T., Fujiwara, K., Kato, T., Iwase, K., Shinohara, R., Kato, K. & Itoh, M. (1999) Changes in superoxide dismutase activities and concentrations and myeloperoxidase activities in leukocytes from patients with diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications* **13**, 264-270.
- Wei, P. F., Ho, K. Y., Ho, Y. P., Wu, Y. M., Yang, Y. H. & Tsai, C. C. (2004) The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research* **39**, 287-293.

- Wierusz-Wysocka, B., Wykretowicz, A., Byks, H., Sadurska, K. & Wysocki, H. (1993) Polymorphonuclear neutrophils adherence, superoxide anion (O<sub>2</sub>-) production and HBA1 level in diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* **21**, 109-114.
- Wolff, L. F., Smith, Q. T., Snyder, W. K., Bedrick, J. A., Liljemark, W. F., Aepli, D. A. & Bandt, C. L. (1988) Relationship between lactate dehydrogenase and myeloperoxidase levels in human gingival crevicular fluid and clinical and microbial measurements. *Journal of Clinical Periodontology* **15**, 110-115.
- Wykretowicz, A., Wierusz-Wysocka, B., Wysocki, J., Szczepanik, A. & Wysocki, H. (1993) Impairment of the oxygen-dependent microbicidal mechanisms of polymorphonuclear neutrophils in patients with type 2 diabetes is not associated with increased susceptibility to infection. *Diabetes Research and Clinical Practice* **19**, 195-201.
- Yamalik, N., Caglayan, F., Kilinc, K., Kilinc, A. & Tumer, C. (2000) The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *Journal of Periodontology* **71**, 460-467.
- [No authors listed] (2005) American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **28**, S37-S42.
- [No authors listed] (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 Sep **12**, 352(9131):837-53. Erratum in: *Lancet* 1999 Aug 14;354(9178):602.

[No authors listed] (1999) International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, *Annals of Periodontology* 1999 **4**, 1-112.

Table 1. Medians and quartiles (25% - 75%) of the clinical and enzymatic parameters for the control (n=20) and test (n=20) groups at baseline.

<b>Clinical and Enzymatic Parameters</b>	<b>Control group</b>	<b>Test group</b>
VPI (%)*	65.20 (51.16-78.69)	85.30 (81.02-94.80)
GBI (%)	38.90 (21.79-52.43)	40.90 (31.76-61.60)
BOP (%)*	80.90 (68.00-89.16)	94.72 (83.10-100.00)
PD ≤3 mm (%)	63.50 (48.00-72.25)	50.50 (25.25-70.25)
PD 4-6 mm (%)	30.50 (22.50-39.25)	40.50 (25.75-52.25)
PD ≥ 7 mm (%)	5.50 (3.00-10.00)	9.50 (2.00-18.00)
CAL ≤ 3 mm (%)	44.50 (30.32-50.75)	18.69 (11.17-46.87)
CAL 4-6 mm (%)	37.59 (35.32-49.13)	44.93 (36.70-50.38)
CAL ≥ 7 mm (%)	17.00 (11.91-21.35)	22.41 (9.12-41.87)
SUP (%)	6.00 (2.00-10.50)	9.50 (4.25-17.25)
TSP activity (AU) (x10 <sup>-3</sup> )	7.10 (4.60 - 13.80)	11.00 (3.80 -24.70)
MPO activity /site (AU)*	2.41(1.17 - 3.46)	0.47 (0.29 - 0.91)
MPO activity /μL (AU/μL)*	0.04 (0.02 - 0.07)	0.009 (0.006 - 0.01)
GCF volume (μL)	0.86 (0.68 - 0.93)	0.77 (0.65 - 0.96)

VPI = visible plaque index; GBI = gingival bleeding index; BOP = bleeding on probing; PD = probing depth; CAL = clinical attachment level and SUP = presence of suppuration; TSP activity = total salivary peroxidase activity; MPO/site (UA) = myeloperoxidase activity in the gingival crevicular fluid (GCF) *per* site; MPO/μL (UA) = myeloperoxidase activity in the GCF *per* μL of collected fluid. \* indicates statistically significant difference between the control and test groups at baseline (Mann-Whitney U test; α= 5%).

Table 2. Medians and quartiles (25% - 75%) of the clinical and enzymatic parameters for the control (n=20) and test (n=20) groups at 3 months after periodontal treatment.

<b>Clinical and Enzymatic Parameters</b>	<b>Control group</b>	<b>Test group</b>
VPI (%)*	7.50 (5.88-10.45) <sup>A</sup>	15.00 (10.43-17.80) <sup>A</sup>
GBI (%)*	3.55 (0.00-4.22) <sup>A</sup>	8.10 (5.88-10.26) <sup>A</sup>
BOP (%)*	12.72 (8.62-19.63) <sup>A</sup>	25.60 (19.34-29.45) <sup>A</sup>
PD ≤3 mm (%)	90.50 (87.70-96.00) <sup>A</sup>	85.50 (75.25-95.00) <sup>A</sup>
PD 4-6 mm (%)	8.50 (4.00-11.25) <sup>A</sup>	13.00 (5.00-23.25) <sup>A</sup>
PD ≥ 7 mm (%)	0.00 (0.00-0.00) <sup>A</sup>	0.50 (0.00-1.25) <sup>A</sup>
CAL ≤ 3 mm (%)	39.73 (33.68-50.88)	26.58 (13.67-51.01)
CAL 4-6 mm (%)	53.67 (46.61-57.79) <sup>A</sup>	55.11 (40.03-64.77) <sup>A</sup>
CAL ≥ 7 mm (%)	6.24(1.99-10.42) <sup>A</sup>	10.18 (2.38-19.70) <sup>A</sup>
SUP (%)	0.00 (0.00-0.00) <sup>A</sup>	0.00 (0.00-1.00) <sup>A</sup>
TSP activity (AU) (x10 <sup>-3</sup> )	3.70 (2.80 - 6.60) <sup>A</sup>	4.90 (3.90 -6.40) <sup>A</sup>
MPO activity /site (AU)*	0.54 (0.29 - 1.05) <sup>A</sup>	0.24 (0.19 - 0.36) <sup>A</sup>
MPO activity /μL (AU/μL)*	0.01(0.005 - 0.02) <sup>A</sup>	0.004(0.003 - 0.007) <sup>A</sup>
GCF volume (μL)	0.33 (0.20 - 0.47) <sup>A</sup>	0.34 (0.21 - 0.55) <sup>A</sup>

VPI = visible plaque index; GBI = gingival bleeding index; BOP = bleeding on probing; PD = probing depth; CAL = clinical attachment level and SUP = presence of suppuration; TSP activity = total salivary peroxidase activity; MPO/site (UA) = myeloperoxidase activity in the gingival crevicular fluid (GCF) *per site*; MPO/μL (UA) = myeloperoxidase activity in the GCF *per μL* of collected fluid. \* indicates statistically significant difference between the control and test groups at 3 months after periodontal treatment (Mann-Whitney U test; α= 5%). Superscript letter <sup>A</sup> indicates statistically significant difference between baseline and the 3-month period (Wilcoxon test; α= 5%).

**5 Capítulo 2 – Avaliação Microbiológica**

***MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL CHANGES AFTER  
PERIODONTAL THERAPY IN TYPE 2 DIABETICS WITH  
PERIODONTITIS.***

Artigo a ser submetido para publicação no periódico: Journal of  
Periodontology.

Microbiological and clinical changes after periodontal therapy in type 2 diabetics with periodontitis.

Daniela Gonçalves, MS\*; Fernanda Oliveira Bello Correa, MS\*; Carina Maciel da Silva Boghossian, MS<sup>†</sup>; Ana Paula Vieira Colombo, PhD<sup>†</sup>; Silvana Regina Perez Orrico, PhD\*

\* Department of Diagnostics and Surgery, School of Dentistry, São Paulo State University, UNESP, Araraquara, Brazil.

† Department of Medical Microbiology, Institute of Microbiology of Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

**Address Correspondence and Reprint Requests to:**

Profa Dra. Silvana Regina Perez Orrico

Depto Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil. 14801-903

Phone: 55 (16) 3301-6377 Fax: 55 (16) 3301-6369.

E-mail: [s-orrico@foar.unesp.br](mailto:s-orrico@foar.unesp.br)

This study was supported in part by the Coordination for Postgraduate Courses in Higher Education (CAPES, Brazil), by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, Brazil; Process #04/08142-0) and by the Foundation for the Development of UNESP (FUNDUNESP, Brazil; Process #00006/05-DFP).

Number of tables: 6

Number of figures: 0



**Running title:** Post therapy microbiological findings in diabetics

### **Abstract**

**Background:** The increased prevalence and severity of periodontitis in diabetics have been well demonstrated. However, the composition of the periodontal microbiota in these patients is still unclear. The present study compared the effects of non-surgical periodontal therapy (SRP) on clinical parameters as well as on the subgingival microbiota between type 2 diabetes mellitus patients with inadequate metabolic control (DM2) and systemically healthy individuals (SH).

**Methods:** Twenty DM2 and 20 SH patients both with chronic periodontitis were enrolled. In this study, clinical assessments included visible plaque index (VPI), bleeding on probing (BOP), gingival bleeding index (GBI), suppuration (SUP), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL). Subgingival plaque samples were obtained from 4 shallow and 4 deep sites of each subject and tested for the presence and levels of 36 bacterial taxa by checkerboard. The clinical and microbiological parameters were assessed before and 3 months after SRP. **Results:** The DM2 group presented significantly higher percentage of sites with VPI and BOP ( $p < 0.01$ ) at baseline, and VPI, GBI, BOP and PD ( $p < 0.05$ ) at 3 months compared to SH controls. At baseline, significant differences between groups were found only for mean levels of *C. rectus* (DM2) and *S. anginosus* (SH) in deep sites. The SRP resulted in a significant improvement of all clinical parameters ( $p < 0.05$ ) and reduction of major periodontal pathogens in both groups ( $p < 0.001$ ).

**Conclusions:** Non-surgical periodontal treatment significantly improved the periodontal status and was effective in reducing putative periodontal pathogens in

type 2 diabetic subjects with inadequate metabolic control comparable to systemically healthy individuals.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus; periodontal disease/therapy; subgingival microbiota; checkerboard

### **Introduction**

Diabetes mellitus consist of a group of disorders that include reduction and/or absence of insulin production. The chronic hyperglycemia is associated with increased risk of developing systemic complications over the years, including microangiopathy, neuropathy, nephropathy, microvascular disease and delayed wound healing<sup>1</sup>. Furthermore, periodontal disease has been described as the sixth complication of diabetes mellitus<sup>2</sup>.

Patients with diabetes (type 1 or type 2) have increased prevalence, extension and severity of periodontal diseases compared to non-diabetic subjects<sup>3-7</sup>. Moreover, studies have suggested that poorly controlled diabetic subjects present more severe periodontal disease than well-controlled diabetic subjects<sup>8,5,9</sup>.

Several mechanisms have been proposed in order to explain the higher prevalence and severity of periodontal disease in patients with diabetes, such as alterations in the gingival crevicular fluid, periodontal tissue vascularization, collagen metabolism, host immune inflammatory response, specific genetic profiles and periodontal microbiota<sup>10,11</sup>.

Regarding the microbiological parameters, few studies<sup>12-14</sup> have reported significant differences in the periodontal microbiota between diabetic and non-

diabetic individuals with chronic periodontitis. In contrast, other investigations<sup>6,15-17</sup> have not shown differences in the colonization of periodontal organisms between these patients. In relation to the influence of metabolic control in the ecology of periodontal microbiota, Seppaa; Ainamo<sup>18</sup> reported differences between poorly controlled and well-controlled diabetic subjects with periodontitis, whereas Tervonen et al.<sup>19</sup> suggested that the level of glycemic control may not affect the presence of some species in the subgingival environment. In addition, improvement in metabolic control does not seem to be associated with significant alterations in the microbiota composition in healthy and periodontitis sites from patients with diabetes<sup>20</sup>.

On the other hand, studies have shown that mechanical periodontal therapy in combination or not with antimicrobial agents might be very effective in reducing the prevalence of periodontal pathogens in subjects with type 1 and 2 diabetes and periodontal disease<sup>21,22</sup>. However, other investigators have reported that mechanical periodontal therapy alone was not capable of eliminating *T. forsythia* and *P. gingivalis* in diabetic patients<sup>7,23</sup>.

Given the controversial findings and limited data, the aim of the present study was to investigate the effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and composition of the subgingival microbiota of chronic periodontitis patients with either type 2 diabetes and inadequate metabolic control or systemic health.

## **Material and methods**

### **Subject Population**

Forty adult subjects who sought dental treatment at the School of Dentistry of the Sao Paulo State University (UNESP-Araraquara) Brazil, from June 2005 to December 2006 were recruited for the study. Informed consent was obtained from all enrolled individuals. The study protocol was independently reviewed and approved by the Ethics in Human Research Committee of the School of Dentistry of Araraquara (UNESP) (Protocol number 85/04). The patients were categorized into 2 groups: 20 individuals (8 men and 12 women; mean age =  $45.80 \pm 6.01$  years) with Diabetes mellitus type 2<sup>1</sup> (DM2), inadequate glycemic control (HbA1c  $\geq 7\%$ ) (UKPDS<sup>24</sup>), and mean diabetes duration of  $9.85 \pm 7.10$  years; and 20 systemically healthy (SH) subjects (10 men and 10 women; mean age =  $43.65 \pm 6.01$  years) as confirmed by fasting plasma glucose test. All subjects that participated in this study presented at least 15 natural teeth (except third molars), were over 30 years of age, and had moderate to severe chronic periodontitis<sup>25</sup>; i.e. at least 4 teeth with one or more sites with probing depth (PD)  $\geq 5$  mm, clinical attachment level (CAL)  $\geq 4$  mm, and bleeding on probing (BOP). Exclusion criteria included pregnancy, use of contraceptives or other hormones, smoking or cessation of smoking for less than 5 years, use of local or systemic antimicrobial agents within 6 months and antiinflammatory drugs within 3 months prior to the entry into the study, and periodontal treatment in the last 12 months. In addition, subjects requiring antibiotics for clinical monitoring and treatment were excluded. All DM2 patients were under endocrinologist supervision and with no alteration in the diabetes treatment in the last year prior to the study and were authorized by their physician to undergo

periodontal treatment. Seventy percent of these patients had at least one diabetes-related complication (e.g.: hypertension, retinopathy, neuropathy or nephropathy). Fifty-five percent of the patients were receiving oral hypoglycemic agents or dietary control only, 15% were undergoing insulin treatment and 30% were treated with a combination of insulin and oral hypoglycemic agents.

### **Clinical Examination**

Periodontal clinical measurements were performed by one calibrated examiner ( $\kappa=0.90$ , data not shown) at six sites per tooth in all teeth except third molars, at baseline and 3 months post-therapy. They included PD and CAL measured by a North Carolina manual periodontal probe<sup>3</sup>, presence or absence of BOP and suppuration (SUP), visible plaque (VPI) and gingival marginal bleeding (GBI) indexes<sup>26</sup>.

### **Sampling**

After removal of supragingival biofilm with a sterile gauze, individual subgingival biofilm samples were taken from 4 deep sites (PD  $\geq$  5 mm and CAL  $\geq$  4 mm) presenting BOP from non-adjacent teeth, using Gracey curettes<sup>4</sup>. In addition, a pool of samples from 4 shallow sites (PD  $\leq$  3 mm and CAL  $\leq$  2 mm) was obtained. Each sample was placed in 1.5 mL tubes containing 150  $\mu$ L of TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6). The sampling was repeated at the same sites 3 months after the conventional periodontal treatment.

---

<sup>3</sup> North Carolina Probe, Hu-Friedy, Chicago, IL.

<sup>4</sup> Trinity Periodontia, São Paulo, SP, Brazil.

### Identification of bacterial species

The presence and levels of 36 bacterial taxa (Table 1) were determined using a modification<sup>27</sup> of the checkerboard DNA-DNA hybridization method<sup>28</sup>. Samples were lysed by adding 100  $\mu$ l 0.5 M NaOH and boiling for 10 min. After neutralizing with 800  $\mu$ l 5M ammonium acetate, each sample with denatured DNA was fixed in individual lanes on a nylon membrane<sup>||</sup> using a slot device<sup>¶</sup>. Digoxigenin-labeled whole genomic DNA probes<sup>#</sup> were hybridized at 90° to the lanes of the biofilm samples. Bound probes were detected using phosphatase-conjugated antibody to digoxigenin<sup>\*\*</sup> and fluorescence<sup>††</sup>, captured by an image system<sup>‡‡</sup>. Signals were evaluated visually by comparison with the standards at 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> bacterial cells for the test species on the same membrane. They were recorded as: 0, not detected; 1, < 10<sup>5</sup> cells; 2, approximately 10<sup>5</sup>; 3, 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> cells; 4, approximately 10<sup>6</sup>; 5, >10<sup>6</sup> cells. The sensitivity and specificity of the probes were determined as reported by Socransky et al.<sup>29</sup>. The sensitivity of the assay was adjusted to permit detection of the 10<sup>4</sup> cells of a given species by adjusting the concentration of each DNA probe. This procedure was carried out in order to provide the same sensitivity of detection for each probe. Failure to detect a signal was recorded as zero, although conceivably, counts in the 1 to 1,000 range could have been present.

---

<sup>||</sup> Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>¶</sup> Immunetics, Cambridge, MA, USA.

<sup>#</sup> Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA.

<sup>\*\*</sup> Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA.

<sup>††</sup> ECF<sup>®</sup>; Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>‡‡</sup> Storm<sup>™</sup> 860, Molecular Dynamics / Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP, Brazil.

### **Therapeutic procedures**

After baseline clinical measurements and sampling were performed, all subjects received full mouth scaling and root planing (SRP) under local anesthetic and instructions in proper home care procedures. SRP was performed in 4 – 6 weekly sessions of approximately 1 hour each. Following that, the patients entered a maintenance therapy program that included professional supragingival prophylaxis and reinforcement in home care procedures every 2 weeks during three months. At the end of this period, clinical measurements and subgingival biofilm sampling were performed in all patients.

### **Glycemic Control**

The glycemic control was evaluated by the concentration of glycosylated hemoglobin A1c (% HbA1c) using high-performance liquid chromatography<sup>§§</sup> at baseline and 3 months after completion of the periodontal treatment.

### **Statistical analysis**

The statistical program BioStat 3.0<sup>||</sup> was used for all the analyses. Statistical testing was performed on a “subject-based” assessment.

For the parameters VPI, GBI, BOP, SUP, % PD and CAL  $\geq 5$ mm, the percentage of positive sites was obtained *per* patient, and averaged within each group. For PD and CAL (mm), a mean value was obtained for all sites *per* patient and averaged across subjects within each group.

---

<sup>§§</sup> DiaSTAT Hemoglobin A1c Analyzer System, BioRad Laboratories, Hercules, California, USA.

<sup>||</sup> Optical Digital Optical Technology, Belém, Brazil.

Microbial data were expressed as mean % of colonized sites (prevalence) and mean counts  $\times 10^4$  (level) for each species. In the analysis of prevalence, it was considered the absence or presence of the microorganism. The levels of different species were determined by transforming the scores 0 to 5 obtained from de controls  $10^5$  and  $10^6$  in bacterial counts. The mean frequency and levels of each bacteria were computed for each subject and averaged across subjects within the groups. Significance of differences in clinical and microbiological data between groups at baseline was determined using the Mann Whitney test, whereas differences within groups along time were determined by Wilcoxon test. Adjustments were made for multiple comparisons as described by Socransky et al.<sup>30</sup>. The significance level was set at 5% and a 95% confidence interval was established.

## **Results**

### **Clinical findings**

The clinical parameters recorded for both groups at baseline and 3 months after completion of the periodontal therapy are summarized in Table 2. At baseline, the individuals from the DM2 group presented significantly higher mean percentage of VPI ( $p < 0.001$ ) and BOP ( $p < 0.001$ ; Mann-Whitney tes) compared to the control group. The other clinical parameters did not differ significantly between groups. After SRP, both groups showed a significant improvement ( $p < 0.05$ ; Wilcoxon sign test) in all clinical parameters. At 3 months, the DM2 group presented higher values of VPI ( $p < 0.001$ ), GBI ( $p < 0.001$ ), BOP ( $p < 0.01$ ) and PD ( $p < 0.05$ ) than the SH group. In relation to changes in the clinical parameters



from baseline to 3 months, the DM2 group presented less reductions in IPV, GBI and BOP ( $p < 0.05$ ) than the control group.

The glycemic control in DM2 patients showed no significant reduction in the HbA1c ( $p=0.7937$ ) mean values from baseline ( $9.43 \pm 1.80$ ) to the 3 month visit ( $9.03 \pm 1.94$ ). No adverse effects of SRP were observed in any patient.

### **Microbiological data**

The mean levels and prevalence of 36 taxa were computed for each patient in both groups. The bacterial species tested were ordered according to the microbial complexes described by Socransky et al.<sup>31</sup>. Overall, the species detected in the highest mean frequency (>50%) and levels ( $> 10^6$  cells) in all sites of diabetics subjects at baseline were *T. forsythia* (83.8% and  $38.97 \times 10^5$ ), *T. denticola* (77.5% and  $5.34 \times 10^5$ ), *P. gingivalis* (71.3 % and  $47.31 \times 10^5$ ), *F. nuc. polymorphum* (70% and  $5.09 \times 10^5$ ), *N. mucosa* (67.5% and  $6.47 \times 10^5$ ), *P. intermedia* (64.4% and  $7.56 \times 10^5$ ), *C. rectus* (55.6 % and  $1.73 \times 10^5$ ), *A. actinomycetemcomitans* a (55.6% and  $11.72 \times 10^5$ ), *F. nuc. nucleatum* (55% and  $23.19 \times 10^5$ ), *C. ochracea* (54.4% and  $3.04 \times 10^5$ ), *F. periodonticum* (53.1% and  $3.79 \times 10^5$ ) and *C. gingivalis* (50.6% and  $0.14 \times 10^5$ ) (data not shown). In the control group, the most predominant species were *N. mucosa* (85.6.5% and  $21.52 \times 10^5$ ), *T. forsythia* (84.4% and  $32.55 \times 10^5$ ), *T. denticola* (82.5% and  $5.10 \times 10^5$ ), *F. nuc. nucleatum* (78.8% and  $4.32 \times 10^5$ ), *F. nuc. polymorphum* (71.3 % and  $21.15 \times 10^5$ ), *S. sanguinis* (66.3% and  $5.47 \times 10^5$ ), *P. gingivalis* (62.5% and  $11.36 \times 10^5$ ), *F. periodonticum* (54.4% and  $5.51 \times 10^5$ ), *A. actinomycetemcomitans* a (53.8% and  $5.76 \times 10^5$ ), *P. intermedia* (52.5% and  $14.12 \times 10^5$ ), *S. oralis* (51.3 % and  $1.41 \times 10^5$ ) and *C. ochracea* (50.6% and

$2.72 \times 10^5$ ) (data not shown). When all sites were analysed, the pathogens *A. Viscosus* and *C. rectus* were detected in significant higher counts in the DM2 patients, and *P. micra* detected in higher levels in the control group (SH) (data not shown).

Microbiological analyses were performed separately in either shallow (PD  $\leq$  3mm and CAL  $\leq$  2mm) or deep sites (PD  $\geq$  4mm e CAL  $\geq$  3mm), at baseline and 3 months after treatment in both groups (Tables 3 to 6). At baseline, no significant differences in prevalence and levels between groups were observed at shallow sites for any species tested (Tables 3 and 4), whereas at sites with deep probing pocket depth (Tables 5 and 6), significant differences were found only for mean levels of *C. rectus* and *S. anginosus* (Table 5; Mann-Whitney test;  $p < 0.001$ , after adjusting for multiple comparisons).

In general, there was a trend for all species to reduce in prevalence and levels at shallow and deep sites in both groups after SRP. At shallow sites, a significant decrease in mean counts of *T. forsythia* was observed in the control group (Table 3). In deep sites, *T. forsythia* and *P. gingivalis* reduced significantly in levels and frequency in both groups (Tables 5 and 6). Moreover, significant decreases in mean counts were found for *T. denticola* and *P. intermedia* in the DM2 group, and for *F. periodonticum*, *F. nuc. polymorphum*, *F. nuc. nucleatum*, *N. mucosa* and *A. actinomycetemcomitans* in control subjects (Table 5).

## Discussion

The present study showed that non-surgical periodontal treatment significantly improved periodontal status and was effective in reducing most putative periodontal pathogens in type 2 diabetes patients with inadequate

metabolic control and systemically healthy patients presenting chronic periodontitis.

At baseline, DM2 individuals presented significantly higher VPI and BOP values compared to controls. This results have been previously reported by other studies<sup>3,6,17,32</sup>. Nevertheless, SRP treatment resulted in decrease of all clinical parameters evaluated in both groups. These findings corroborate previous studies that employed SRP therapy alone in diabetic individuals<sup>22,33,34,35</sup>. Although a considerable clinical improvement was evident at 3 months after treatment, DM2 subjects still presented higher percentage of sites with VPI, GBI and BOP and higher mean PD than SH individuals. These results agree with recent studies reported by Faria–Almeida et al.<sup>34</sup> and Navarro-Sanchez et al.<sup>35</sup>. Despite a rigorous periodontal maintenance program, the high VPI values in the DM2 group after treatment may be due to the fact that diabetics with inadequate metabolic control may be less compliant with oral self-care<sup>36</sup> and with the maintenance of their oral health<sup>37</sup>.

Regarding differences in levels and/or prevalence of subgingival species, only in deep sites, the suspected pathogen *C. rectus* was detected in higher counts in the DM2 patients, whereas *S. anginosus* was detected in higher levels in the control group. Mandell et al.<sup>38</sup> also observed increased levels and prevalence of *C. rectus*, as well as other periodontal pathogens at diseased sites in poorly-controlled insulin dependent diabetic individuals. Thorstensson et al.<sup>12</sup> reported that *P. gingivalis* was detected more often in diabetic than non-diabetic subjects. On the other hand, others studies in type 1 and 2 diabetics did not find significant differences between diabetics and healthy controls<sup>6,16,17</sup>. These controversial findings may result from differences in the methods employed for

microbiological analyses. Using the checkerboard method, Hintao et al.<sup>17</sup> did not detect any significant differences in 17 species in the subgingival plaque of type 2 diabetic and non-diabetics subjects. However, using the same method, Lalla et al.<sup>14</sup> observed higher levels of *Eubacterium notadum* in type 1 young diabetics compared to controls. An association of *Capnocytophaga* species with periodontitis in diabetics has also been suggested<sup>13,39</sup>. In the current study, the DM2 group showed higher levels and frequency of these species than the SH group at 3 months, although these differences were not significant.

The data of the present study indicated that non-surgical periodontal treatment significantly affected an important subset of the subgingival microbiota associated with disease in both groups. In diabetic patients, Smith et al.<sup>23</sup> reported that the mechanical periodontal therapy alone was not capable of eliminating *T. forsythia* and *P. gingivalis*. However, others studies observed reduction in the prevalence of these pathogens when SRP was employed in combination with antimicrobials<sup>21,22</sup>. In this study, the DM2 group showed a significant reduction in counts of the red complex members *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola*. In contrast, Lalla et al.<sup>7</sup> observed a modest and non-significant reduction in the levels of these species after full-mouth subgingival debridement in diabetics with periodontitis. It should be pointed out, though, that these authors employed only two sessions of SRP compared to four sessions in our study.

It has been shown that the persistence and/or increase of members of the orange complex may have a critical role in the settlement of periodontal infections, as well as their recurrence<sup>40,41</sup>. Significant decreases in mean counts of *F. periodonticum*, *F. nuc. polymorphum*, *F. nuc. Nucleatum* was observed in

the control group, while only *P. intermedia* presented a significant reduction in the DM2 group. The high percentage of sites with BOP and increased mean PD in the DM2 group at 3 months after therapy may be related to the persistence of these species of the orange complex in these patients.

Species considered to be host-compatible such as *Actinomyces* spp. and *Streptococcus* spp. showed not significant variations from baseline to the 3 month visit. The majority of *Streptococcus* spp. and few species of the genus *Actinomyces* presented a modest increase in levels and prevalence after treatment. These results are in agreement with data presented by other authors suggesting that mechanical treatment can result in a shift from pathogenic to beneficial species in the subgingival environment<sup>27,42</sup>.

Within the limitations of this study, it can be concluded that composition of the subgingival plaque was similar between patients with type 2 diabetes with inadequate metabolic control and systemically healthy individuals. Despite the inadequate metabolic control observed in the diabetic group, the periodontal treatment was effective in reducing putative periodontal pathogens with consequent improvement of all clinical parameters in these subjects.

Finally, although the present study reached significant results, one of its limitations was the small sample size due to the use of restrict inclusion and exclusion criteria in an attempt to minimize the presence of confounding factors that could bias the outcomes. Thus, it is important to conduct further studies with larger samples in order to elucidate the composition of subgingival plaque in these patients.

### **Acknowledgments**

The authors are thankful to Prof. Dr. José Silvio Govone.

### **References**

1. No authors listed. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005; 28: S37-S42.
2. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993; 16: 329-34.
3. Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol.* 1996; 67: 1185-92.
4. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 51-61.
5. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 30-9.
6. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol.* 2005; 76: 418-25.
7. Lalla E, Kaplan S, Yang J, Roth GA, Papapanou PN, Greenberg S. Effects of periodontal therapy on serum C-reactive protein, sE-selectin, and tumor necrosis factor-alpha secretion by peripheral blood-derived macrophages in diabetes. A pilot study. *J Periodontal Res.* 2007; 42: 274-82.
8. Karjalainen KM, Knuutila ML. The onset of diabetes and poor metabolic control increases gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 1060-7.

9. Lim LP, Tay FB, Sum CF, Thai AC. Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 2007; 34: 118-23.
10. Manouchehr-Pour M, Bissada NF. Periodontal disease in juvenile and adult diabetic patients: a review of the literature. *J Am Dent Assoc*. 1983; 107: 766-70.
11. Mealey BL, Oates TW; American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006; 77: 1289-303.
12. Thorstensson H, Dahlen G, Hugoson A. Some suspected periodontopathogens and serum antibody response in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol*. 1995; 22: 449-58.
13. Ciantar M, Gilthorpe MS, Hurel SJ, Newman HN, Wilson M, Spratt DA. Capnocytophaga spp. in periodontitis patients manifesting diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2005; 76: 194-203.
14. Lalla E, Kaplan S, Chang SM, et al. Periodontal infection profiles in type 1 diabetes. *J Clin Periodontol*. 2006; 33: 855-62.
15. Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG, Shlossman M, Dunford R, Genco RJ. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1988; 59: 23-31.
16. Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. *J Periodontal Res*. 2001; 36: 18-24.
17. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental

caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 175-81.

18. Seppaa B, Ainamo J. Dark field microscopy of the subgingival microflora in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 63-7.

19. Tervonen T, Oliver RC, Wolff LF, Bereuter J, Anderson L, Aeppli DM. Prevalence of periodontal pathogens with varying metabolic control of diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1994; 2: 375-9.

20. Sastrowijoto SH, van der Velden U, van Steenberghe TJ, et al. Improved metabolic control, clinical periodontal status and subgingival microbiology in insulin-dependent diabetes mellitus. A prospective study. *J Clin Periodontol.* 1990; 17: 233-42.

21. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, et al. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol.* 1997; 68: 713-9.

22. 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; 25: 112-24.

23. Smith GT, Greenbaum CJ, Johnson BD, Persson GR. Short-term responses to periodontal therapy in insulin-dependent diabetic patients. *J Periodontol.* 1996; 67: 794-802.

24. No authors listed. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-53. Erratum in: *Lancet* 1999; 354: 602.



25. No authors listed. International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-112.
26. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25: 229-35.
27. 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; 24: 324-34.
28. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994; 17: 788-92.
29. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 352-62.
30. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 766-75.
31. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 134-44.
32. Lalla E, Cheng B, Lal S, et al. Diabetes mellitus promotes periodontal destruction in children. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 294-8.
33. Lalla E, Cheng B, Lal S, et al. Diabetes-related parameters and periodontal conditions in children. *J Periodontal Res.* 2007; 42: 345-9.
34. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006; 77: 591-8.

35. 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; 34: 835-43.
36. Karjalainen KM, Knuutila ML, von Dickhoff KJ. Association of the severity of periodontal disease with organ complications in type 1 diabetic patients. *J Periodontol.* 1994; 65: 1067-72.
37. Syrjala, A. M., Knecht, M. C. & Knuutila, M. L. Dental self-efficacy as a determinant to oral health behaviour, oral hygiene and HbA1c level among diabetic patients. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 616-621.
38. Mandell RL, Dirienzo J, Kent R, Joshipura K, Haber J. Microbiology of healthy and diseased periodontal sites in poorly controlled insulin dependent diabetics. *J Periodontol.* 1992; 63: 274-9.
39. Mashimo PA, Yamamoto Y, Slots J, Park BH, Genco RJ. The periodontal microflora of juvenile diabetics. Culture, immunofluorescence, and serum antibody studies. *J Periodontol.* 1983; 54: 420-30.
40. Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1988; 15: 390-8.
41. Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 260-8.
42. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, et al. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol.* 2005; 76: 778-84.

## Tables

Table 1. Subgingival species used for the construction of whole genomic DNA probes tested against subgingival plaque samples from subjects.

Taxa	Strains	Taxa	Strains
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a</i>	43718*	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201*
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans b</i>	29523*	<i>Neisseria mucosa</i>	19696*
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860*	<i>Parvimonas micra</i>	33270*
<i>Actinomyces israelii</i>	12102*	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845*
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929*	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277*
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104*	<i>Prevotella intermedia</i>	25611*
<i>Actinomyces naeslundii II (A.viscosus)</i>	43146*	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563*
<i>Campylobacter rectus</i>	33238*	<i>Propionibacterium acnes</i>	11827*
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624*	<i>Selenomonas noxia</i>	43541*
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596*	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397*
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612*	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823*
<i>Campylobacter showae</i>	51146*	<i>Streptococcus mitis</i>	49456*
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099*	<i>Streptococcus oralis</i>	35037*
<i>Eikenella corrodens</i>	23834*	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556*
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271*	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558*
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693*	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335*
<i>Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum</i>	10953*	<i>Tannerella forsythia</i>	43037*
<i>Fusobacterium nucleatum ss. vincentii</i>	49256*	<i>Treponema denticola</i>	B1†
<i>Fusobacterium nucleatum ss. nucleatum</i>	25586*	<i>Veillonella parvula</i>	10790*
<i>Gemella morbillorum</i>	27824*		

\* ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)

† The Forsyth Institute, Boston , MA

Table 2. Mean ( $\pm$  SD) of the periodontal clinical parameters for the control (CT, n=20) and DM2 (n=20) groups at baseline and 3 months after SRP.

	Baseline	3 Months	$\Delta$ 3M-B*
<b>IPV (%)</b>			
DM2	85.62 ( $\pm$ 11.33) <sup>†</sup>	17.88 ( $\pm$ 14.23) <sup>†‡</sup>	-79.79 ( $\pm$ 14.05) <sup>†</sup>
CT	65.29 ( $\pm$ 14.87)	8.06 ( $\pm$ 2.79) <sup>‡</sup>	-87.14 ( $\pm$ 4.79)
<b>GBI (%)</b>			
DM2	47.27 ( $\pm$ 23.16)	10.81 ( $\pm$ 10.37) <sup>†‡</sup>	-74.63 ( $\pm$ 19.02) <sup>†</sup>
CT	38.38 ( $\pm$ 16.46)	2.88 ( $\pm$ 2.29) <sup>‡</sup>	-90.81 ( $\pm$ 9.50)
<b>BOP (%)</b>			
DM2	90.91 ( $\pm$ 9.87) <sup>†</sup>	28.21 ( $\pm$ 15.88) <sup>†‡</sup>	-69.21 ( $\pm$ 15.64) <sup>†</sup>
CT	76.13 ( $\pm$ 16.15)	15.79 ( $\pm$ 10.72) <sup>‡</sup>	-78.67 ( $\pm$ 13.97)
<b>SUP (%)</b>			
DM2	11.60 ( $\pm$ 9.50)	0.90 ( $\pm$ 1.70) <sup>‡</sup>	-91.41 ( $\pm$ 16.14)
CT	7.50 ( $\pm$ 7.10)	0.20 ( $\pm$ 0.50) <sup>‡</sup>	-98.78 ( $\pm$ 4.02)
<b>PD (mm)</b>			
DM2	4.18 ( $\pm$ 0.90)	2.76 ( $\pm$ 0.41) <sup>†‡</sup>	-1.42 ( $\pm$ 0.61)
CT	3.62 ( $\pm$ 0.56)	2.44 ( $\pm$ 0.30) <sup>‡</sup>	-1.17 ( $\pm$ 0.54)
<b>CAL (mm)</b>			
DM2	4.97 ( $\pm$ 1.45)	4.34 ( $\pm$ 1.29) <sup>‡</sup>	-0.63 ( $\pm$ 0.43)
CT	4.25 ( $\pm$ 1.01)	3.97 ( $\pm$ 0.83) <sup>‡</sup>	-0.46 ( $\pm$ 0.40)
<b>PD <math>\geq</math>5mm (%)</b>			
DM2	39.07 ( $\pm$ 24.17)	7.74 ( $\pm$ 7.31) <sup>‡</sup>	-82.37 ( $\pm$ 13.36)
CT	27.95 ( $\pm$ 11.24)	4.23 ( $\pm$ 4.22) <sup>‡</sup>	-83.50 ( $\pm$ 17.80)
<b>CAL <math>\geq</math>5mm (%)</b>			
DM2	51.07 ( $\pm$ 24.74)	43.58 ( $\pm$ 24.59) <sup>‡</sup>	-17.40 ( $\pm$ 17.40)
CT	42.28 ( $\pm$ 18.45)	36.37 ( $\pm$ 21.30) <sup>‡</sup>	-17.81 ( $\pm$ 25.88)

VPI = visible plaque index; GBI = gingival bleeding index; BOP = bleeding on probing; PD = probing depth; CAL = clinical attachment level and SUP = presence of suppuration. \* indicates changes from baseline to 3 months. † indicates statistically significant difference between the control and DM2 groups (Mann-Whitney U test;  $\alpha$ = 5%). ‡ indicates statistically significant difference between baseline and the 3-month period (Wilcoxon test;  $\alpha$ = 5%).

**Table 3.** Mean ( $\pm$  SD) counts ( $\times 10^4$  cells) of the subgingival species examined in biofilm samples from shallow sites of Diabetes mellitus type 2 (DM2) and systemically healthy (controls) subjects with chronic periodontitis at baseline and 3 months after therapy.

Bacterial Species *	Control		DM2	
	Baseline	Post therapy	Baseline	Post therapy
<i>P. gingivalis</i>	60.4 $\pm$ 217.6	1.2 $\pm$ 3.0	322.3 $\pm$ 450.4	66.6 $\pm$ 234.7
<i>T. forsythia</i>	139.4 $\pm$ 289.6	4.5 $\pm$ 12.1 <sup>†</sup>	221.3 $\pm$ 368.6	3.5 $\pm$ 12.9
<i>T. denticola</i>	17.9 $\pm$ 28.3	8.2 $\pm$ 24.2	38.4 $\pm$ 47.2	10.6 $\pm$ 26.0
<i>F. nu. subsp. polymorphum</i>	230.3 $\pm$ 386.3	7.9 $\pm$ 24.3	40.0 $\pm$ 46.2	106.9 $\pm$ 229.3
<i>F. nuc. subsp. vincentii</i>	0.5 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 12.0	69.4 $\pm$ 234.8	6.4 $\pm$ 23.5
<i>F. nuc. subsp. nucleatum</i>	31.5 $\pm$ 36.0	3.9 $\pm$ 12.1	209.7 $\pm$ 373.5	72.9 $\pm$ 234.3
<i>F. periodonticum</i>	60.0 $\pm$ 49.0	5.2 $\pm$ 21.8	25.1 $\pm$ 42.4	393.8 $\pm$ 466.2
<i>P. intermedia</i>	164.3 $\pm$ 352.1	1.1 $\pm$ 3.0	204.2 $\pm$ 375.4	6.9 $\pm$ 17.7
<i>P. nigrescens</i>	0.2 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.4
<i>P. micra</i>	3.4 $\pm$ 12.0	0.1 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.2
<i>C. showae</i>	0.1 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.2
<i>C. rectus</i>	0.2 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 23.2	62.8 $\pm$ 235.2
<i>E. nodatum</i>	0.2 $\pm$ 0.4	0.1 $\pm$ 0.2	131.4 $\pm$ 320.8	0.1 $\pm$ 0.2
<i>S. constellatus</i>	10.6 $\pm$ 26.3	0.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 3.2	6.4 $\pm$ 23.5
<i>C. sputigena</i>	6.1 $\pm$ 16.5	0.2 $\pm$ 0.4	8.1 $\pm$ 23.4	7.5 $\pm$ 17.7
<i>C. ochracea</i>	33.9 $\pm$ 42.6	55.8 $\pm$ 217.7	27.6 $\pm$ 38.3	75.7 $\pm$ 234.4
<i>C. gingivalis</i>	56.2 $\pm$ 217.2	0.3 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 3.2	78.7 $\pm$ 233.9
<i>E. corrodens</i>	71.5 $\pm$ 215.6	3.0 $\pm$ 12.0	72.9 $\pm$ 233.8	20.0 $\pm$ 34.4
<i>A. actinomycetemcomitans a</i>	62.2 $\pm$ 216.7	0.6 $\pm$ 2.2	148.0 $\pm$ 316.5	79.7 $\pm$ 233.1
<i>S. mitis</i>	0.6 $\pm$ 2.2	5.6 $\pm$ 16.5	6.3 $\pm$ 23.5	67.9 $\pm$ 234.4
<i>S. sanguinis</i>	81.8 $\pm$ 214.8	114.0 $\pm$ 296.9	201.3 $\pm$ 375.9	143.0 $\pm$ 317.3
<i>S. oralis</i>	17.3 $\pm$ 31.9	67.2 $\pm$ 216.3	70.6 $\pm$ 234.0	74.2 $\pm$ 233.4
<i>S. gordonii</i>	26.1 $\pm$ 40.3	74.9 $\pm$ 215.3	20.7 $\pm$ 34.1	83.4 $\pm$ 232.8
<i>S. intermedius</i>	10.6 $\pm$ 26.3	50.9 $\pm$ 217.8	11.1 $\pm$ 25.9	2.1 $\pm$ 3.8
<i>S. anginosus</i>	17.2 $\pm$ 32.0	59.5 $\pm$ 217.1	0.1 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 12.9
<i>A. odontolyticus</i>	11.6 $\pm$ 26.1	0.0 $\pm$ 0.0	20.0 $\pm$ 30.8	4.3 $\pm$ 13.0
<i>V. parvula</i>	6.2 $\pm$ 16.4	0.1 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.5
<i>A. naeslundii</i>	12.8 $\pm$ 31.4	0.1 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 23.5	1.4 $\pm$ 3.2
<i>A. israelii</i>	64.8 $\pm$ 216.8	7.9 $\pm$ 24.3	7.8 $\pm$ 17.6	0.9 $\pm$ 2.3
<i>A. gerencseriae</i>	112.1 $\pm$ 296.7	0.1 $\pm$ 0.2	73.6 $\pm$ 233.6	7.7 $\pm$ 17.6
<i>A. viscosus</i>	0.3 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.3	13.3 $\pm$ 32.0	1.0 $\pm$ 2.3
<i>P. melaninogenica</i>	13.1 $\pm$ 31.3	0.4 $\pm$ 0.5	25.9 $\pm$ 39.1	13.3 $\pm$ 28.1
<i>E. saburreum</i>	0.2 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 2.4	0.1 $\pm$ 0.3
<i>L. buccalis</i>	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0
<i>N. mucosa</i>	253.9 $\pm$ 375.1	73.3 $\pm$ 215.8	56.3 $\pm$ 49.9	338.2 $\pm$ 441.8
<i>G. morbillorum</i>	0.4 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 12.0	9.8 $\pm$ 26.1	138.4 $\pm$ 318.8
<i>A. actinomycetemcomitans b</i>	6.1 $\pm$ 21.8	3.3 $\pm$ 12.1	0.1 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.2

<i>S. noxia</i>	3.9 ± 12.1	2.9 ± 12.0	62.7 ± 235.3	16.1 ± 33.6
<i>P. acnes</i>	2.8 ± 12.0	0.1 ± 0.2	69.4 ± 234.3	0.1 ± 0.2

\* The species were ordered according to the microbial complexes described by Socransky *et al.*<sup>31</sup> (1998). †  $p < 0.001$  refer to significant difference between baseline and post therapy visits within a group (Wilcoxon test); ‡  $p < 0.001$  refers to significant difference between groups in each time point (Mann-Whitney test), after adjustment for multiple comparisons.

**Table 4.** Mean frequency ( $\pm$  SD) of the subgingival species examined in biofilm samples from shallow sites of Diabetes mellitus type 2 (DM2) and systemically healthy (controls) subjects with chronic periodontitis at baseline and 3 months after therapy.

Bacterial Species *	Control		DM2	
	Baseline	Post therapy	Baseline	Post therapy
<i>P. gingivalis</i>	50 $\pm$ 50	25 $\pm$ 43	56 $\pm$ 50	25 $\pm$ 43
<i>T. forsythia</i>	75 $\pm$ 43	40 $\pm$ 49	75 $\pm$ 43	13 $\pm$ 33
<i>T. denticola</i>	80 $\pm$ 40	50 $\pm$ 50	69 $\pm$ 46	44 $\pm$ 50
<i>F. nu. subsp. polymorphum</i>	75 $\pm$ 43	25 $\pm$ 43	63 $\pm$ 48	56 $\pm$ 50
<i>F. nuc. subsp. vincentii</i>	45 $\pm$ 50	25 $\pm$ 43	25 $\pm$ 43	25 $\pm$ 43
<i>F. nuc. subsp. nucleatum</i>	85 $\pm$ 36	30 $\pm$ 46	44 $\pm$ 50	31 $\pm$ 46
<i>F. periodonticum</i>	60 $\pm$ 49	25 $\pm$ 43	38 $\pm$ 48	63 $\pm$ 48
<i>P. intermedia</i>	50 $\pm$ 50	15 $\pm$ 36	56 $\pm$ 50	19 $\pm$ 39
<i>P. nigrescens</i>	20 $\pm$ 40	0 $\pm$ 0	13 $\pm$ 33	19 $\pm$ 39
<i>P. micra</i>	25 $\pm$ 43	10 $\pm$ 30	0 $\pm$ 0	6 $\pm$ 24
<i>C. showae</i>	5 $\pm$ 22	35 $\pm$ 48	0 $\pm$ 0	6 $\pm$ 24
<i>C. rectus</i>	15 $\pm$ 36	20 $\pm$ 40	56 $\pm$ 50	31 $\pm$ 46
<i>E. nodatum</i>	20 $\pm$ 40	5 $\pm$ 22	38 $\pm$ 48	6 $\pm$ 24
<i>S. constellatus</i>	15 $\pm$ 36	25 $\pm$ 43	25 $\pm$ 43	19 $\pm$ 39
<i>C. sputigena</i>	20 $\pm$ 40	20 $\pm$ 40	25 $\pm$ 43	19 $\pm$ 39
<i>C. ochracea</i>	55 $\pm$ 50	40 $\pm$ 49	56 $\pm$ 50	31 $\pm$ 46
<i>C. gingivalis</i>	35 $\pm$ 48	30 $\pm$ 46	44 $\pm$ 50	50 $\pm$ 50
<i>E. corrodens</i>	40 $\pm$ 49	25 $\pm$ 43	38 $\pm$ 48	31 $\pm$ 46
<i>A. actinomycetemcomitans a</i>	50 $\pm$ 50	10 $\pm$ 30	63 $\pm$ 48	38 $\pm$ 48
<i>S. mitis</i>	10 $\pm$ 30	15 $\pm$ 36	6 $\pm$ 24	38 $\pm$ 48
<i>S. sanguinis</i>	75 $\pm$ 43	60 $\pm$ 49	44 $\pm$ 50	69 $\pm$ 46
<i>S. oralis</i>	60 $\pm$ 49	60 $\pm$ 49	31 $\pm$ 46	50 $\pm$ 50
<i>S. gordonii</i>	45 $\pm$ 50	60 $\pm$ 49	38 $\pm$ 48	69 $\pm$ 46
<i>S. intermedius</i>	25 $\pm$ 43	45 $\pm$ 50	44 $\pm$ 50	38 $\pm$ 48
<i>S. anginosus</i>	50 $\pm$ 50	55 $\pm$ 50	6 $\pm$ 24	13 $\pm$ 33
<i>A. odontolyticus</i>	30 $\pm$ 46	0 $\pm$ 0	31 $\pm$ 46	31 $\pm$ 46
<i>V. parvula</i>	30 $\pm$ 46	10 $\pm$ 30	13 $\pm$ 33	31 $\pm$ 46
<i>A. naeslundii</i>	15 $\pm$ 36	10 $\pm$ 30	19 $\pm$ 39	31 $\pm$ 46
<i>A. israelii</i>	40 $\pm$ 49	20 $\pm$ 40	50 $\pm$ 50	31 $\pm$ 46
<i>A. gerencseriae</i>	50 $\pm$ 50	5 $\pm$ 22	44 $\pm$ 50	38 $\pm$ 48
<i>A. viscosus</i>	30 $\pm$ 46	10 $\pm$ 30	38 $\pm$ 48	44 $\pm$ 50
<i>P. melaninogenica</i>	45 $\pm$ 50	35 $\pm$ 48	56 $\pm$ 50	31 $\pm$ 46
<i>E. saburreum</i>	20 $\pm$ 40	20 $\pm$ 40	13 $\pm$ 33	13 $\pm$ 33
<i>L. buccalis</i>	5 $\pm$ 22	10 $\pm$ 30	19 $\pm$ 39	0 $\pm$ 0
<i>N. mucosa</i>	95 $\pm$ 22	40 $\pm$ 49	56 $\pm$ 50	69 $\pm$ 46
<i>G. morbillorum</i>	40 $\pm$ 49	35 $\pm$ 48	25 $\pm$ 43	63 $\pm$ 48
<i>A. actinomycetemcomitans b</i>	20 $\pm$ 40	10 $\pm$ 30	13 $\pm$ 33	6 $\pm$ 24

<i>S. noxia</i>	25 ± 43	15 ± 36	25 ± 43	31 ± 46
<i>P. acnes</i>	10 ± 30	5 ± 22	25 ± 43	6 ± 24

---

\* The species were ordered according to the microbial complexes described by Socransky *et al.*<sup>31</sup> (1998). No significant differences were observed between groups and periods.



**Table 5.** Mean ( $\pm$  SD) counts ( $\times 10^4$  cells) of the subgingival species examined in biofilm samples from deep sites of Diabetes mellitus type 2 (DM2) and systemically healthy (controls) subjects with chronic periodontitis at baseline and 3 months after therapy.

Bacterial Species *	Control		DM2	
	Baseline	Post therapy	Baseline	Post therapy
<i>P. gingivalis</i>	166.9 $\pm$ 342.5	26.6 $\pm$ 74.5 <sup>†</sup>	525.8 $\pm$ 405.4	50.2 $\pm$ 127.5 <sup>†</sup>
<i>T. forsythia</i>	511.7 $\pm$ 301.8	66.7 $\pm$ 108.0 <sup>†</sup>	482.2 $\pm$ 371.0	37.0 $\pm$ 74.9 <sup>†</sup>
<i>T. denticola</i>	84.0 $\pm$ 193.9	32.7 $\pm$ 76.1	58.7 $\pm$ 40.5	8.3 $\pm$ 18.2 <sup>†</sup>
<i>F. nu. subsp. polymorphum</i>	192.8 $\pm$ 215.9	43.7 $\pm$ 125.6 <sup>†</sup>	53.5 $\pm$ 39.4	51.5 $\pm$ 107.4
<i>F. nuc. subsp. vincentii</i>	19.8 $\pm$ 62.5	38.4 $\pm$ 91.0	67.9 $\pm$ 139.5	7.6 $\pm$ 17.8
<i>F. nuc. subsp. nucleatum</i>	54.9 $\pm$ 81.0	19.6 $\pm$ 53.8 <sup>†</sup>	225.9 $\pm$ 311.9	111.3 $\pm$ 199.6
<i>F. periodonticum</i>	50.1 $\pm$ 33.6	10.2 $\pm$ 19.9 <sup>†</sup>	38.0 $\pm$ 63.5	270.8 $\pm$ 375.4
<i>P. intermedia</i>	118.2 $\pm$ 193.5	16.5 $\pm$ 54.8	350.4 $\pm$ 303.0	56.4 $\pm$ 126.5 <sup>†</sup>
<i>P. nigrescens</i>	0.3 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.2
<i>P. micra</i>	22.9 $\pm$ 68.0	2.8 $\pm$ 7.0	0.0 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.2
<i>C. showae</i>	0.1 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 5.4	0.9 $\pm$ 3.5	2.1 $\pm$ 8.4
<i>C. rectus</i>	0.4 $\pm$ 0.3 <sup>‡</sup>	0.2 $\pm$ 0.2	22.0 $\pm$ 23.5	60.6 $\pm$ 134.7
<i>E. nodatum</i>	0.3 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.2	124.7 $\pm$ 245.1	0.1 $\pm$ 0.2
<i>S. constellatus</i>	5.5 $\pm$ 12.2	0.3 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 3.0	18.4 $\pm$ 63.0
<i>C. sputigena</i>	3.3 $\pm$ 5.6	0.2 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 5.2	28.6 $\pm$ 54.2
<i>C. ochracea</i>	20.5 $\pm$ 21.8	31.4 $\pm$ 74.7	28.6 $\pm$ 35.4	19.0 $\pm$ 25.1
<i>C. gingivalis</i>	63.9 $\pm$ 156.4	0.3 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 1.6	40.6 $\pm$ 81.9
<i>E. corrodens</i>	58.9 $\pm$ 97.3	4.3 $\pm$ 10.4	78.6 $\pm$ 192.4	12.8 $\pm$ 18.9
<i>A. actinomycetemcomitans a</i>	53.0 $\pm$ 88.9	2.4 $\pm$ 9.5 <sup>†</sup>	109.9 $\pm$ 227.8	36.3 $\pm$ 81.4
<i>S. mitis</i>	0.2 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 4.1	7.1 $\pm$ 19.1	16.5 $\pm$ 54.7
<i>S. sanguinis</i>	27.6 $\pm$ 57.4	42.0 $\pm$ 118.4	223.8 $\pm$ 375.6	73.9 $\pm$ 172.7
<i>S. oralis</i>	11.0 $\pm$ 18.6	24.9 $\pm$ 54.7	11.4 $\pm$ 11.8	18.8 $\pm$ 56.9
<i>S. gordonii</i>	11.6 $\pm$ 18.7	35.7 $\pm$ 75.3	41.4 $\pm$ 74.8	47.2 $\pm$ 124.8
<i>S. intermedius</i>	7.7 $\pm$ 11.4	1.6 $\pm$ 4.1	104.0 $\pm$ 267.6	56.0 $\pm$ 129.1
<i>S. anginosus</i>	18.0 $\pm$ 27.3 <sup>‡</sup>	25.3 $\pm$ 59.4	0.6 $\pm$ 1.3	4.8 $\pm$ 13.8
<i>A. odontolyticus</i>	4.6 $\pm$ 7.7	3.8 $\pm$ 11.9	28.6 $\pm$ 60.5	12.8 $\pm$ 18.5
<i>V. parvula</i>	1.0 $\pm$ 3.0	0.1 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.2
<i>A. naeslundii</i>	14.5 $\pm$ 54.4	0.0 $\pm$ 0.1	32.2 $\pm$ 108.0	1.7 $\pm$ 4.2
<i>A. israelii</i>	5.9 $\pm$ 9.5	5.3 $\pm$ 12.2	15.7 $\pm$ 20.4	4.2 $\pm$ 11.9
<i>A. gerencseriae</i>	43.5 $\pm$ 78.9	0.2 $\pm$ 0.3	81.6 $\pm$ 173.8	19.1 $\pm$ 53.9
<i>A. viscosus</i>	0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.6	55.9 $\pm$ 173.9	0.8 $\pm$ 1.6
<i>P. melaninogenica</i>	11.8 $\pm$ 18.2	4.5 $\pm$ 11.9	39.0 $\pm$ 62.6	6.3 $\pm$ 11.1
<i>E. saburreum</i>	0.1 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 10.9	0.3 $\pm$ 0.3
<i>L. buccalis</i>	0.0 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2
<i>N. mucosa</i>	176.6 $\pm$ 251.1	12.2 $\pm$ 19.1 <sup>†</sup>	67.0 $\pm$ 43.9	127.9 $\pm$ 175.2
<i>G. morbillorum</i>	0.5 $\pm$ 0.4	23.5 $\pm$ 56.6	4.3 $\pm$ 9.6	169.8 $\pm$ 267.9
<i>A. actinomycetemcomitans b</i>	2.6 $\pm$ 6.6	0.1 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 1.1	1.6 $\pm$ 6.0

<i>S. noxia</i>	1.7 ± 5.9	29.0 ± 76.4	1.5 ± 5.4	32.9 ± 111.6
<i>P. acnes</i>	4.3 ± 8.7	1.7 ± 4.1	116.4 ± 245.9	3.4 ± 8.2

\* The species were ordered according to the microbial complexes described by Socransky *et al.*<sup>31</sup> (1998). †  $p < 0.001$  refer to significant difference between baseline and post therapy visits within a group (Wilcoxon test); ‡  $p < 0.001$  refers to significant difference between groups in each time point (Mann-Whitney test), after adjustment for multiple comparisons.

**Table 6.** Mean frequency ( $\pm$  SD) of the subgingival species examined in biofilm samples from deep sites of Diabetes mellitus type 2 (DM2) and systemically healthy (controls) subjects with chronic periodontitis at baseline and 3 months after therapy.

Bacterial Species *	Control		DM2	
	Baseline	Post therapy	Baseline	Post therapy
<i>P. gingivalis</i>	75 $\pm$ 34	23 $\pm$ 24 <sup>†</sup>	80 $\pm$ 23	28 $\pm$ 25 <sup>†</sup>
<i>T. forsythia</i>	94 $\pm$ 13	31 $\pm$ 30 <sup>†</sup>	88 $\pm$ 20	41 $\pm$ 37 <sup>†</sup>
<i>T. denticola</i>	85 $\pm$ 24	56 $\pm$ 37	80 $\pm$ 29	41 $\pm$ 31
<i>F. nu. subsp. polymorphum</i>	68 $\pm$ 28	29 $\pm$ 33	74 $\pm$ 37	41 $\pm$ 36
<i>F. nuc. subsp. vincentii</i>	39 $\pm$ 37	29 $\pm$ 30	29 $\pm$ 31	19 $\pm$ 21
<i>F. nuc. subsp. nucleatum</i>	73 $\pm$ 26	26 $\pm$ 32	59 $\pm$ 37	38 $\pm$ 38
<i>F. periodonticum</i>	49 $\pm$ 36	26 $\pm$ 30	59 $\pm$ 38	54 $\pm$ 40
<i>P. intermedia</i>	55 $\pm$ 34	26 $\pm$ 32	64 $\pm$ 41	30 $\pm$ 28
<i>P. nigrescens</i>	30 $\pm$ 27	8 $\pm$ 18	25 $\pm$ 26	15 $\pm$ 24
<i>P. micra</i>	29 $\pm$ 34	11 $\pm$ 19	1 $\pm$ 5	8 $\pm$ 18
<i>C. showae</i>	10 $\pm$ 15	21 $\pm$ 28	11 $\pm$ 20	18 $\pm$ 26
<i>C. rectus</i>	41 $\pm$ 31	20 $\pm$ 22	56 $\pm$ 32	44 $\pm$ 36
<i>E. nodatum</i>	30 $\pm$ 32	8 $\pm$ 16	36 $\pm$ 34	14 $\pm$ 22
<i>S. constellatus</i>	16 $\pm$ 29	25 $\pm$ 35	23 $\pm$ 33	18 $\pm$ 25
<i>C. sputigena</i>	24 $\pm$ 20	11 $\pm$ 17	29 $\pm$ 36	31 $\pm$ 26
<i>C. ochracea</i>	46 $\pm$ 27	34 $\pm$ 29	48 $\pm$ 41	39 $\pm$ 37
<i>C. gingivalis</i>	20 $\pm$ 24	30 $\pm$ 28	50 $\pm$ 33	46 $\pm$ 36
<i>E. corrodens</i>	40 $\pm$ 34	16 $\pm$ 21	39 $\pm$ 41	29 $\pm$ 33
<i>A. actinomycetemcomitans a</i>	58 $\pm$ 32	24 $\pm$ 27	46 $\pm$ 39	43 $\pm$ 39
<i>S. mitis</i>	8 $\pm$ 14	15 $\pm$ 20	11 $\pm$ 20	23 $\pm$ 31
<i>S. sanguinis</i>	58 $\pm$ 40	56 $\pm$ 29	44 $\pm$ 39	56 $\pm$ 33
<i>S. oralis</i>	43 $\pm$ 31	44 $\pm$ 28	33 $\pm$ 28	35 $\pm$ 29
<i>S. gordonii</i>	55 $\pm$ 27	48 $\pm$ 33	48 $\pm$ 33	48 $\pm$ 42
<i>S. intermedius</i>	26 $\pm$ 32	26 $\pm$ 30	31 $\pm$ 35	26 $\pm$ 27
<i>S. anginosus</i>	45 $\pm$ 37	41 $\pm$ 41	15 $\pm$ 23	14 $\pm$ 23
<i>A. odontolyticus</i>	16 $\pm$ 25	5 $\pm$ 13	34 $\pm$ 35	29 $\pm$ 34
<i>V. parvula</i>	16 $\pm$ 21	14 $\pm$ 27	4 $\pm$ 9	16 $\pm$ 21
<i>A. naeslundii</i>	13 $\pm$ 20	4 $\pm$ 9	24 $\pm$ 31	36 $\pm$ 35
<i>A. israelii</i>	24 $\pm$ 26	11 $\pm$ 17	35 $\pm$ 31	29 $\pm$ 35
<i>A. gerencseriae</i>	39 $\pm$ 37	16 $\pm$ 25	48 $\pm$ 39	30 $\pm$ 30
<i>A. viscosus</i>	20 $\pm$ 22	11 $\pm$ 19	36 $\pm$ 35	38 $\pm$ 32
<i>P. melaninogenica</i>	48 $\pm$ 28	31 $\pm$ 28	39 $\pm$ 39	25 $\pm$ 27
<i>E. saburreum</i>	13 $\pm$ 17	21 $\pm$ 24	19 $\pm$ 33	29 $\pm$ 30
<i>L. buccalis</i>	3 $\pm$ 8	5 $\pm$ 10	10 $\pm$ 20	11 $\pm$ 19
<i>N. mucosa</i>	76 $\pm$ 31	35 $\pm$ 37	73 $\pm$ 38	56 $\pm$ 33

<i>G. morbillorum</i>	46 ± 38	33 ± 35	25 ± 31	63 ± 36
<i>A. actinomycetemcomitans b</i>	13 ± 20	13 ± 20	24 ± 29	23 ± 31
<i>S. noxia</i>	21 ± 28	21 ± 24	23 ± 31	30 ± 35
<i>P. acnes</i>	15 ± 22	11 ± 15	35 ± 41	10 ± 15

\* The species were ordered according to the microbial complexes described by Socransky *et al.*<sup>31</sup> (1998). †  $p < 0.001$  refer to significant difference between baseline and post therapy visits within a group (Wilcoxon test); ‡  $p < 0.001$  refers to significant difference between groups in each time point (Mann-Whitney test), after adjustment for multiple comparisons.

## **6 Considerações Finais**

O presente estudo demonstrou que o tratamento periodontal não-cirúrgico realizado em portadores de DM2 com inadequado controle metabólico foi efetivo quanto à melhora da condição clínica, a redução da atividade enzimática na saliva e no fluido sulcular gengival e a redução dos níveis e prevalência dos principais patógenos periodontais.

A doença periodontal é uma condição inflamatória crônica e sua progressão e extensão são moduladas pela virulência bacteriana e resposta do hospedeiro<sup>67</sup>. Existem múltiplos fatores que podem atuar modificando a resposta do hospedeiro ao agente agressor, conseqüentemente alterando a expressão e a progressão das doenças gengivais e periodontais, alterando a composição da microbiota ou retardando os processos de cura. A identificação de fatores de risco permite um melhor entendimento do que torna um indivíduo mais susceptível à doença periodontal. Dentre os determinantes sistêmicos amplamente estudados tem-se o Diabetes mellitus, reconhecidamente como um fator de risco à doença periodontal<sup>6,8,12,26,28,31,34,45,46,76,85,99</sup>.

A associação entre a doença periodontal e DM tem sido estudada há algumas décadas resultando em conclusões conflitantes. Porém, atualmente, novas evidências científicas, sustentadas por métodos epidemiológicos avançados, métodos modernos de avaliação do

controle metabólico e utilização de indicadores de risco, têm revelado o DM como um fator de risco para a doença periodontal<sup>8,12,26,28,34,45,76,85,99</sup>.

As dificuldades para obtenção de evidências conclusivas deve-se à grande diversidade metodológica dos estudos, a alterações nas classificações das duas doenças, aos diferentes parâmetros e amostras avaliados e ao fato da doença periodontal e do DM apresentarem em comum, a etiologia multifatorial, a cronicidade e a alta prevalência na população. Além disso, as amostras populacionais geralmente são pequenas e convenientes, com controle inadequado dos fatores de confusão, limitando o entendimento da natureza do problema.

Em relação à influência do controle metabólico, alguns estudos suportam a existência de uma associação entre pobre controle glicêmico e aumento da susceptibilidade à doença periodontal<sup>6,41,50,68,84,99,106</sup>, conflitando com outros estudos que não observaram tal correlação<sup>3,8,72,74,98,105</sup>. Entretanto, ressalta-se a presença de fatores de confusão nestes estudos como tipo de DM, controle glicêmico e inclusão de tabagistas, que podem ter influenciado esses resultados.

Desta forma, no presente estudo, foram utilizados critérios restritos de inclusão da amostra objetivando eliminar possíveis fatores de confusão que poderiam interferir nos resultados obtidos. Assim, foram selecionados somente indivíduos DM2, não tabagistas e com inadequado

controle metabólico, além da inclusão de um grupo controle composto por pacientes sistemicamente saudáveis.

A terapia periodontal não-cirúrgica tem sido considerada como “padrão ouro” com o qual outros métodos de tratamento são comparados<sup>20,24,108</sup>. Seu objetivo consiste na remoção dos depósitos bacterianos supra e subgengivais por meio de raspagem e alisamento radicular associado ao controle mecânico da placa bacteriana. No presente estudo, esta modalidade de tratamento foi empregada devido à relativa simplicidade de execução e aos bons resultados clínicos obtidos, inclusive na ausência de antibioticoterapia. O objetivo foi o de avaliar os resultados em uma população portadora de DM com inadequado controle metabólico, procurando-se evidenciar o efeito isoladamente do tratamento mecânico nesse tipo de paciente, uma vez que nem todos os indivíduos com DM têm condições de serem submetidos a procedimentos cirúrgicos ou ao emprego concomitante de antibioticoterapia sistêmica ou local.

Outro fator que diferenciou este protocolo dos anteriormente descritos na literatura foi o acompanhamento após o término da terapia. Neste estudo, todos os pacientes receberam acompanhamento profissional, realizado rigorosamente a cada quinze dias com o objetivo de proporcionar um controle satisfatório da placa bacteriana supragengival e obter maior cooperação e motivação dos pacientes em relação à manutenção da saúde bucal, com melhor resposta ao tratamento.

A reavaliação clínica foi realizada aos três meses após o término do tratamento permitindo uma adequada avaliação da cicatrização do tecidos. Segundo Cobb<sup>17</sup> (2002) as maiores alterações na profundidade de sondagem e no nível clínico de inserção ocorrem entre o primeiro e o terceiro mês, embora a completa cicatrização possa continuar por até doze meses do final da terapia. Esta reavaliação é necessária para se determinar o resultado clínico do tratamento e decidir sobre a necessidade de terapias adicionais.

Nossos achados confirmam que a cooperação (*compliance*) parece ser diferente entre os grupos. Aos três meses após o término do tratamento, apesar de registrarmos uma redução significativa dos percentuais de IPV, ISM, SS e PS no grupo DM2, tais parâmetros foram significativamente maiores neste grupo comparando-se aos pacientes sistemicamente saudáveis. Este resultado é suportado por outros autores que descreveram maiores níveis de placa entre indivíduos com DM pobremente controlado<sup>42</sup> e melhor cooperação entre aqueles com melhor controle glicêmico<sup>97</sup>. É concebível que a motivação do paciente e a atitude perante o tratamento do DM são fatores cruciais, e ao menos parcialmente determinam se será alcançado o ideal de controle glicêmico com conseqüente prevenção de complicações sistêmicas<sup>23</sup>. Da mesma maneira, a saúde periodontal é também amplamente dependente dos hábitos de higiene bucal e, nesses pacientes, parece estar intimamente relacionada à atitude em relação à adesão ao tratamento do DM.



Em relação ao controle metabólico, o tratamento periodontal resultou em uma redução não significativa das concentrações de HbA1c dos portadores de DM. Tal resultado está em concordância com alguns autores<sup>2,15,38,73,87,111</sup>. Já outras investigações<sup>27,29,37,44,63,64,96</sup> relataram significativa melhora do controle metabólico aos três meses pós-tratamento. Porém, deve-se ressaltar nestes estudos, a utilização associada de antibioticoterapia local ou sistêmica, a avaliação de indivíduos com controle metabólico aceitável ou com grande variabilidade do mesmo e a ausência de informação em relação a alterações das medicações sistêmicas empregadas para o controle do DM. O tempo de avaliação também é um fator que pode ser considerado limitante. Assim é possível que períodos mais longos de acompanhamento sejam necessários para a avaliação de alterações no controle glicêmico após tratamento periodontal não-cirúrgico.

Parâmetros clínicos como índice de placa, profundidade sondagem, sangramento à sondagem e avaliação radiográfica podem oferecer informações sobre a severidade da periodontite e a eficácia da terapia. Entretanto, apresentam valor diagnóstico limitado para prever a futura progressão da doença. Desta forma, exames microbiológicos<sup>109</sup>, análise da resposta do hospedeiro<sup>53,75</sup> e análises genéticas<sup>43</sup> têm sido propostos como métodos para identificação e monitoramento de pacientes de risco à periodontite.

Sabe-se que bactérias específicas são essenciais para o início e progressão da doença periodontal e que a destruição dos tecidos pode resultar de um desequilíbrio nos mecanismos protetores e destrutivos do hospedeiro, iniciados pelo processo infeccioso. Sítios com atividade da doença periodontal apresentam resposta imunoinflamatória, observando-se clinicamente diversas alterações, dentre elas um aumento do fluido sulcular gengival. Como resultado, o fluido passa a exibir microrganismos, células epiteliais, plasma sanguíneo, células inflamatórias e outros componentes da resposta inflamatória e imunológica<sup>7</sup>. Desta forma, inúmeras pesquisas têm buscado componentes da saliva e do fluido sulcular gengival que poderiam servir como marcadores potenciais de diagnóstico ou prognóstico, para a progressão da periodontite<sup>3,5,7,64,110</sup>. Uma grande vantagem na utilização da saliva e do fluido sulcular gengival reside no fato destes serem obtidos por método não-invasivo.

Inúmeras investigações, em portadores de DM (tipos 1 e 2), têm sido realizadas com o objetivo de se pesquisar em nível molecular e celular, os mecanismos que poderiam estar envolvidos na etiologia e patogênese da doença periodontal nestes indivíduos. Entretanto, mecanismos de defesa não-específicos, como o sistema das peroxidases têm sido pouco explorados ou investigados, embora estas enzimas tenham sido utilizadas como marcadores de doença periodontal em estudos em indivíduos sistemicamente saudáveis<sup>5,40,89,110</sup>.

O presente estudo demonstrou que não houve diferença significativa na atividade PTS entre os grupos DM2 e controle no *baseline* e aos três meses pós-tratamento. Tal resultado pode ser decorrente da grande variabilidade observada nos dados. A saliva representa um meio complexo para diagnóstico, uma vez que sua composição é afetada por vários fatores como: fluido sulcular gengival, dieta, utilização de agentes farmacológicos, condição sistêmica e/ou bucal<sup>75</sup>, o que poderia justificar a grande variabilidade observada.

Especificamente em relação à MPO, o fato desta enzima ser originária dos grânulos primários dos neutrófilos permite uma avaliação indireta de algumas funções destas células as quais possuem um importante papel na manutenção da saúde do periodonto frente ao desafio bacteriano. A literatura tem relatado a presença de alterações nestas células em portadores de DM<sup>21,30,58,59,80</sup> principalmente em situações de descontrole metabólico<sup>112,114</sup>.

A atividade da MPO no fluido gengival apresentou-se significativamente menor no grupo DM2 em relação ao controle no *baseline* e aos três meses. Até o presente momento, este estudo é o primeiro a investigar em indivíduos portadores de DM, a atividade da MPO no fluido gengival e o efeito do tratamento periodontal sobre a atividade da PTS e MPO do fluido gengival. Estes resultados se aproximam dos obtidos em amostras de soro de portadores de DM<sup>278,79,107,114</sup>. Finalmente, pode-se levantar a hipótese que a menor atividade da MPO

observada no fluido gengival de indivíduos portadores de DM metabolicamente descompensados pode ser decorrência de um prejuízo no mecanismo primário de defesa destes indivíduos em resposta ao agente agressor.

O tratamento periodontal reduziu significativamente, em ambos os grupos, a atividade peroxidásica total na saliva e a atividade da MPO no fluido sulcular gengival concordando com os resultados observados em indivíduos sistemicamente saudáveis<sup>9,39,88,113</sup>.

Em relação aos parâmetros microbiológicos, poucos estudos demonstraram diferenças entre pacientes portadores e não portadores de DM com periodontite quanto à colonização bacteriana subgengival<sup>16,47,104</sup>, enquanto vários outros não observaram diferenças significantes<sup>12,34,82,119,120</sup>. Entretanto, o método empregado para avaliação microbiológica pode ser um dos fatores responsáveis pelos diferentes resultados encontrados. Sendo assim, métodos mais sofisticados e sensíveis são constantemente testados.

Neste estudo, para avaliação de 36 espécies bacterianas na composição da microbiota subgengival, assim como suas alterações antes e pós-tratamento periodontal não-cirúrgico, optou-se pelo método do “checkerboard DNA-DNA hybridization”<sup>93</sup>. Este método é considerado rápido, sensível e relativamente de baixo custo<sup>94</sup> e tem sido utilizado para examinar a composição da placa dental em casos de saúde e doença

periodontal<sup>33</sup>, assim como as alterações que ocorrem na composição da microbiota subgengival como resultado da terapia periodontal<sup>19,48</sup>.

Os dados microbiológicos do presente estudo permitiram verificar que as espécies presentes no biofilme subgengival dos portadores DM2 também estavam presentes em amostras dos indivíduos sistemicamente saudáveis. No *baseline*, foram detectados, em ambos os grupos, elevados níveis e prevalências das bactérias pesquisadas no ambiente subgengival, principalmente aquelas pertencentes aos complexos vermelho e laranja, concordando com os achados de Colombo et al.<sup>18</sup> (2002) e Ximénez-Fyvie et al.<sup>115</sup> (2000) em indivíduos sistemicamente saudáveis.

Diferenças significantes nos níveis médios das espécies avaliadas na microbiota subgengival foram detectadas na comparação entre os grupos controle e DM2, ao avaliar os níveis referentes ao total dos sítios (rasos e profundos em conjunto) e nos níveis de sítios profundos. No *baseline*, os dados referentes ao total de sítios revelaram maior nível de *P. micra* no grupo controle e de *A. viscosus* e *C. rectus* no grupo DM2. Já ao avaliar somente sítios profundos, níveis significativamente maiores de *Campylobacter rectus* no grupo DM2, e de *Streptococcus anginosus* no grupo controle, foram verificados.

Níveis maiores do patógeno *C.rectus* (complexo laranja) verificados no *baseline*, para o grupo DM2, podem estar relacionados à maior inflamação periodontal, representada pelo maior percentual de

sítios com sangramento à sondagem, observado nestes indivíduos. As espécies deste complexo, juntamente com aquelas pertencentes ao complexo vermelho, têm sido registradas em níveis significativamente elevados em sítios que apresentam sangramento à sondagem<sup>90,92</sup>.

Aos três meses pós-terapia periodontal, não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos em relação aos níveis médios tanto no total de sítios quanto em sítios rasos ou profundos.

Já a comparação entre os grupos em relação à média de prevalência, quando avaliados o total de sítios ou quando avaliados sítios rasos e profundos separadamente, não demonstrou diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos períodos avaliados.

A eliminação de espécies suspeitas, em sítios profundos, somente com terapia não-cirúrgica não é facilmente alcançada. Desta forma, a redução significativa destes patógenos pode ser suficiente para que esta terapia seja considerada eficaz, como no presente estudo. Este resultado pode ter sido alcançado devido ao efetivo programa de acompanhamento profissional realizado, uma vez que segundo alguns estudos (Cugini et al.<sup>20</sup> 2000, Ximenez-Fyvie et al.<sup>116</sup> 2000), visitas periódicas de manutenção que incluam controle de placa profissional e reinstrução dos procedimentos de higiene bucal, após terapia periodontal são necessários para obtenção de um bom resultado.

Especificamente em relação às espécies *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, o tratamento periodontal resultou em

diminuição significativa dos níveis e da prevalência destes patógenos em sítios profundos, de ambos os grupos. A redução nas espécies deste complexo está de acordo com outros estudos que avaliaram o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre a microbiota de pacientes sistemicamente saudáveis portadores de doença periodontal<sup>19,20,32</sup> e com o estudo de Grossi et al.<sup>29</sup> (1997) que observaram redução de *Porphyromonas gingivalis* após terapia periodontal em indivíduos DM2. Entretanto, nossos achados diferem daqueles observados por Smith et al.<sup>87</sup> (1996) que relataram que somente o tratamento mecânico isolado não foi eficaz na redução de *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* em portadores de *diabetes insulino-dependentes*. Tal ocorrência pode estar relacionada à diferença no método de avaliação microbiológica utilizado e ao rigoroso programa de acompanhamento profissional instituído após a finalização dos procedimentos de raspagem e alisamento radicular.

A comparação de resultados de diferentes estudos é difícil de ser realizada devido ao fato que a maioria das investigações relatam poucas informações, principalmente em relação ao tipo do DM e ao grau de controle metabólico. Há, também, uma grande variedade de métodos utilizados para a obtenção das amostras, processamento, avaliação e análise dos dados, além da heterogeneidade quanto ao número e/ou tipo de amostras obtidas e espécies avaliadas. Desta forma, devido a estas e outras dificuldades, os resultados obtidos nos estudos podem contribuir

somente de forma marginal para a compreensão da composição da microbiota subgengival.

Finalmente, apesar da limitação quanto ao tamanho da amostra, obtivemos dados específicos e confiáveis a respeito do objeto de nosso estudo. Os resultados revelaram que o tratamento periodontal não-cirúrgico em portadores de DM com inadequado controle metabólico pode reduzir os microrganismos relacionados à doença periodontal com conseqüente melhora dos parâmetros clínicos e enzimáticos utilizados para seu diagnóstico. Entretanto, o acompanhamento destes indivíduos deve ser considerado essencial na consolidação dos resultados alcançados.



## **7 Conclusão**

Dentro das limitações do presente estudo, concluímos que:

1- Os indivíduos portadores de diabetes com inadequado controle metabólico apresentaram pior controle de placa e maior sangramento à sondagem quando comparados ao grupo sistemicamente sadio (controle).

2- Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto aos principais patógenos periodontais.

3- A atividade peroxidásica total salivar foi similar entre os grupos. Foi constatada menor atividade da mieloperoxidase no fluido sulcular gengival dos indivíduos portadores de diabetes.

4- O tratamento periodontal foi efetivo na melhora dos parâmetros clínicos, na redução dos principais patógenos periodontais e na redução da atividade enzimática na saliva e no fluido sulcular gengival para ambos os grupos.

5- O tratamento periodontal resultou em melhora não significativa do controle glicêmico.

## **8 Referências<sup>5</sup>**

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25: 229-35.
2. Aldridge JP, Lester V, Watts TL, Collins A, Viberti G, Wilson RF. Single-blind studies of the effects of improved periodontal health on metabolic control in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 271-5.
3. Alpagot T, Silverman S, Lundergan W, Bell C, Chambers DW. Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. *J Periodontal Res.* 2001; 36:169-74.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2005; 28: S37-S42.
5. Aras H, Çağlayan F, Güncü GN, Berberoğlu A, Kiliç K. Effect of systemically administered naproxen sodium on clinical parameters and myeloperoxidase and elastase-like activity levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 2007; 78: 868-73.
6. Aren G, Sepet E, Ozdemir D, Dinccag N, Guvener B, Firatli E. Periodontal health, salivary status, and metabolic control in children with type 1 diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2003; 74: 1789-95.

---

<sup>5</sup> De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

7. Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2004; 34: 109-19.
8. Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol*. 1996; 67: 1185-92.
9. Buchmann R, Hasilik A, Van Dyke TE, Lange DE. Amplified crevicular leukocyte activity in aggressive periodontal disease. *J Dent Res*. 2002; 81:716-21.
10. Buchmann R, Hasilik A, Nunn ME, Van Dyke TE, Lange DE. PMN responses in chronic periodontal disease: evaluation by gingival crevicular fluid enzymes and elastase-alpha-1-proteinase inhibitor complex. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 563-72.
11. Bulman JS, Osborn JF. Measuring diagnostic consistency. *Br Dent J*. 1989; 166: 377-81.
12. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol*. 2005; 76: 418-25.
13. Cao CF, Smith QT. Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J Clin Periodontol*. 1989; 16: 17-20.
14. Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2003; 31: 167-80.

15. 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; 25: 112-24.
16. Ciantar M, Gilthorpe MS, Hurel SJ, Newman HN, Wilson M, Spratt DA. Capnocytophaga spp. in periodontitis patients manifesting diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2005; 76: 194-203.
17. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 6-16.
18. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém WJ, Mendes MC et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2002; 73: 360-9.
19. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Rosalém W, Mendes MC, Souto RM et al. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol.* 2005; 76: 778-84.
20. 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; 27: 30-6.

21. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allanic H, Genetet B. Impaired leukocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med.* 1997; 14: 29-34.
22. Dodds MW, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000; 28: 373-81.
23. Drash AL, Becker DJ. Behavioral issues in patients with diabetes mellitus, with special emphasis on the child and adolescent. In: Rifkin H, Porte D Jr, editors. *Diabetes Mellitus theory and practice* 4<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier; 1990.
24. Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2001;25:77-88.
25. Effect of intensive therapy on residual beta-cell function in patients with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. A randomized, controlled trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Ann Intern Med.* 1998;128: 517-23.
26. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991; 62:123-31.
27. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006; 77: 591-8.

28. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 51-61.
29. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG et al. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol.* 1997; 68: 713-9.
30. Gustke CJ, Stein SH, Hart TC, Hoffman WH, Hanes PJ, Russell C M et al. HLA-DR alleles are associated with IDDM, but not with impaired neutrophil chemotaxis in IDDM. *J Dent Res.* 1998; 77: 1497-1503.
31. Guven Y, Satman I, Dinccag N, Alptekin S. Salivary peroxidase activity in whole saliva of patients with insulin-dependent (type-1) diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 879-81.
32. 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; 24: 324-34.
33. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL Jr et al. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 346-53.
34. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 175-81.

- 35.** Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998; 352: 837-53.
- 36.** International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, *Ann Periodontol*. 1999; 4:1-112.
- 37.** Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H et al. The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2001; 72: 774-78.
- 38.** Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res*. 2005; 84: 1154-9.
- 39.** Jentsch H, Sievert Y, Gocke R. Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment. *J Clin Periodontol*. 2004; 31: 511-4.
- 40.** Karhuvaara L, Tenovuo J, Sievers G. Crevicular fluid myeloperoxidase - an indicator of acute gingival inflammation. *Proc Finn Dent Soc*. 1990; 86: 3-8.
- 41.** Karjalainen KM, Knuutila ML. The onset of diabetes and poor metabolic control increases gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1996; 23: 1060-7.

42. Karjalainen KM, Knuutila ML, von Dickhoff KJ. Association of the severity of periodontal disease with organ complications in type 1 diabetic patients. *J Periodontol.* 1994; 65: 1067-72.
43. Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2007;43:278-93.
44. Kiran M, Arpak N, Unsal E, Erdoğan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 266-72.
45. Lalla E, Cheng B, Lal S, Kaplan S, Softness B, Greenberg E et al. Diabetes mellitus promotes periodontal destruction in children. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 294-8.
46. Lalla E, Cheng B, Lal S, Kaplan S, Softness B, Greenberg E et al. Diabetes-related parameters and periodontal conditions in children. *J. Periodontal Res.* 2007; 42: 345-9.
47. Lalla E, Kaplan S, Chang SM, Roth GA, Celenti R, Hinckley K et al. Periodontal infection profiles in type 1 diabetes. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 855-62.
48. Lalla E, Kaplan S, Yang J, Roth GA, Papapanou PN, Greenberg S. Effects of periodontal therapy on serum C-reactive protein, sE-selectin, and tumor necrosis factor-alpha secretion by peripheral blood-derived macrophages in diabetes. A pilot study. *J. Periodontal Res.* 2007; 42: 274-82.



49. Lamster IB. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Ann Periodontol.* 1997; 2: 123-37.
50. Lim L P, Tay FB, Sum CF, Thai AC. Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 118-23.
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; 32: 915-20.
52. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993; 16: 329-34.
53. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol 2000.* 2005; 39: 53-72.
54. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care.* 1992; 15: 1509-16.
55. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc.* 1989; 119: 298-304.
56. Mandell RL, Dirienzo J, Kent R, Joshipura K, Haber J. Microbiology of healthy and diseased periodontal sites in poorly controlled insulin dependent diabetics. *J Periodontol.* 1992; 63: 274-9.

- 57.** Manouchehr-Pour M, Bissada NF. Periodontal disease in juvenile and adult diabetic patients: a review of the literature. *J Am Dent Assoc.* 1983; 107: 766-70.
- 58.** Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease. *J Periodontol.* 1981; 52: 405-10.
- 59.** Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992; 15: 256-60.
- 60.** Mashimo PA, Yamamoto Y, Slots J, Park BH, Genco RJ. The periodontal microflora of juvenile diabetics. Culture, immunofluorescence, and serum antibody studies. *J Periodontol.* 1983; 54: 420-30.
- 61.** Mealey BL, Oates TW. American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006; 77:1289-303.
- 62.** Mealey BL, Rethman MP. Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. *Dent Today.* 2003; 22: 107-13.
- 63.** Miller LS, Manwell MA, Newbold D, Reding ME, Rasheed A, Blodgett J et al. The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. *J Periodontol.* 1992; 63: 843-8.
- 64.** 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; 34: 835-43.

**65.** Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC et al. Cloning and expression of RAGE: a cell surface receptor for advanced glycation end products of proteins. *J Biol Chem.* 1992; 267: 14998-15004.

**66.** Nishioka T, Maki K, Kimura M, Takahama U. Determination of salivary peroxidase activity in human mixed whole saliva. *Arch Oral Biol.* 2003; 48: 397-400.

**67.** Noack B, Jachmann I, Roscher S, Sieber L, Kopprasch S, Lück C, Hanefeld M et al. Metabolic diseases and their possible link to risk indicators of periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71: 898-903.

**68.** Novaes Junior AB, Gutierrez FG, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I - Probing pocket depth and clinical attachment. *Braz Dent J.* 1996; 7: 65-73.

**69.** Novaes Junior AB, Gonzalez Gutierrez F, Grisi MF, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part II--Microbiological analysis using the BANA test. *Braz Dent J.* 1997; 8: 27-33.

**70.** O'Brien PJ. Peroxidases. *Chem Biol Interact.* 2000; 1: 113-39.

**71.** Over C, Yamalik N, Yavuzylmaz E, Ersoy F, Eratalay K. Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and

whole saliva of patients with periodontal disease. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1993; 35: 235-40.

**72.** de Pommereau V, Dargent-Paré C, Robert JJ, Brion M. Periodontal status in insulin-dependent diabetic adolescents. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 628-32.

**73.** Promsudthi A, Pimapansri S, Deerochanawong C, Kanchanasita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. *Oral Dis.* 2005; 11: 293-8.

**74.** Rosenthal IM, Abrams H, Kopczyk A. The relationship of inflammatory periodontal disease to diabetic status in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Periodontol.* 1988; 15: 425-9.

**75.** Sahingur SE, Cohen RE. Analysis of host responses and risk for disease progression. *Periodontol 2000.* 2004; 34: 57-83.

**76.** Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol.* 1997; 68: 127-35.

**77.** Sastrowijoto SH, van der Velden U, van Steenberghe TJ, Hillemans P, Hart AA, de Graaff J et al. Improved metabolic control, clinical periodontal status and subgingival microbiology in insulin-dependent diabetes mellitus. A prospective study. *J Clin Periodontol.* 1990; 17: 233-42.

- 78.** Sato N, Kashima K, Tanaka Y, Shimizu H, Mori M. Effect of granulocyte-colony stimulating factor on generation of oxygen-derived free radicals and myeloperoxidase activity in neutrophils from poorly controlled NIDDM patients. *Diabetes*. 1997; 46: 133-7.
- 79.** Sato N, Shimizu H, Suwa K, Shimomura Y, Kobayashi I, Mori M. MPO activity and generation of active O<sub>2</sub> species in leukocytes from poorly controlled diabetic patients. *Diabetes Care*. 1992; 15: 1050-2.
- 80.** Sawant JM. Biochemical changes in polymorphonuclear leucocytes in diabetic patients. *J Postgrad Med*. 1993; 39: 183-6.
- 81.** Sbordone L, Ramaglia L, Barone A, Ciaglia RN, Iacono VJ. Periodontal status and subgingival microbiota of insulin-dependent juvenile diabetics: a 3-year longitudinal study. *J Periodontol*. 1998; 69: 120-8.
- 82.** Sbordone L, Ramaglia L, Barone A, Ciaglia RN, Tenore A, Iacono VJ. Periodontal status and selected cultivable anaerobic microflora of insulin-dependent juvenile diabetics. *J Periodontol*. 1995; 66: 452-61.
- 83.** Seppaa B, Ainamo J. Dark field microscopy of the subgingival microflora in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol*. 1996; 23: 63-7.
- 84.** Seppala B, Ainamo J. A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1994; 21:161-5.
- 85.** Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc*. 1990; 121: 532-6.

86. Smith AJ, Smith G, Basu MK, Walsh TF. Changes in salivary peroxidase activity observed during experimentally-induced gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1984; 11: 373-378.
87. Smith GT, Greenbaum CJ, Johnson BD, Persson GR. Short-term responses to periodontal therapy in insulin-dependent diabetic patients. *J Periodontol.* 1996;67:794-802. Erratum in: *J Periodontol.* 1996; 67:1368.
88. Smith QT, Hinrichs JE, Melnyk RS. Gingival crevicular fluid myeloperoxidase at periodontitis sites. *J Periodont Res.* 1986; 21: 45-55.
89. Smith QT, Au GS, Freese PL, Osborn JB, Stoltenberg JL. Five parameters of gingival crevicular fluid from eight surfaces in periodontal health and disease. *J Periodont Res.* 1992; 27: 466-475.
90. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87.
91. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 766-75.
92. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 134-44.
93. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994; 17: 788-92.

- 94.** Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 352-62.
- 95.** Sonoki K, Nakashima S, Takata Y, Naito T, Fujisawa K, Ootsubo T et al. Decreased lipid peroxidation following periodontal therapy in type 2 diabetic patients. *J Periodontol.* 2006; 77: 1907-13.
- 96.** Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 306-10.
- 97.** Syrjala AM, Knecht MC, Knuuttila ML. Dental self-efficacy as a determinant to oral health behaviour, oral hygiene and HbA1c level among diabetic patients. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 616-21.
- 98.** Takeda M, Ojima M, Yoshioka H, Inaba H, Kogo M, Shizukuishi S et al. Relationship of serum advanced glycation end products with deterioration of periodontitis in type 2 diabetes patients. *J Periodontol.* 2006; 77: 15-20.
- 99.** Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 30-9.
- 100.** Tenovuo J, Pruitt KM. Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. *J Oral Pathol.* 1984; 13: 573-84.

- 101.** Tenovuo J, Lehtonen OP, Viikari J, Larjava H, Vilja P, Tuohimaa P. Immunoglobulins and innate antimicrobial factors in whole saliva of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Dent Res.*1986; 65: 62-6.
- 102.** Tervonen T, Karjalainen K. Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 505-10.
- 103.** Tervonen T, Oliver RC, Wolff LF, Bereuter J, Anderson L, Aeppli DM. Prevalence of periodontal pathogens with varying metabolic control of diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1994; 2: 375-9.
- 104.** Thorstensson H, Dahlen G, Hugoson A. Some suspected periodontopathogens and serum antibody response in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 449-58.
- 105.** Thorstensson H, Kuylenstierna J, Hugoson A. Medical status and complications in relation to periodontal disease experience in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 194-202.
- 106.** Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002; 30: 182-92.
- 107.** Uchimura K, Nagasaka A, Hayashi R, Makino M, Nagata M, Kakizawa H et al. Changes in superoxide dismutase activities and concentrations and myeloperoxidase activities in leukocytes from patients with diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat.* 1999; 13: 264-70.



- 108.** Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000*. 2004; 36: 98-120.
- 109.** Van Winkelhoff AJ, Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol 2000*. 2005; 39: 40-52.
- 110.** Wei PF, Ho KY, Ho YP, Wu YM, Yang YH, Tsai CC. The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *J Periodont Res*. 2004; 39: 287-93.
- 111.** 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; 23: 92-100.
- 112.** Wierusz-Wysocka B, Wykretowicz A, Byks H, Sadurska K, Wysocki H. Polymorphonuclear neutrophils adherence, superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production and HBA1 level in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 1993; 21: 109-14.
- 113.** Wolff LF, Smith QT, Snyder WK, Bedrick JA, Liljemark WF, Aeppli DA et al. Relationship between lactate dehydrogenase and myeloperoxidase levels in human gingival crevicular fluid and clinical and microbial measurements. *J Clin Periodontol*. 1988; 15: 110-5.

- 114.** Wykretowicz A, Wierusz-Wysocka B, Wysocki J, Szczepanik A, Wysocki H. Impairment of the oxygen-dependent microbicidal mechanisms of polymorphonuclear neutrophils in patients with type 2 diabetes is not associated with increased susceptibility to infection. *Diabetes Res Clin Pract.* 1993; 19: 195-201.
- 115.** Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 648-57.
- 116.** Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS. The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 637-47.
- 117.** Yamalik N, Caglayan F, Kilinc K, Kilinc A, Tumer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *J Periodontol.* 2000; 71: 460-7.
- 118.** Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994; 269: 9889-97.

**119.** Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. *J Periodontal Res.* 2001; 36: 18-24.

**120.** Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG, Shlossman M, Dunford R, Genco RJ. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1988; 59: 23-31.

## **9 Anexos**