



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

JULIANA DE FÁTIMA PEDROSO

**EFEITO DA TERAPIA PROBIÓTICA (*Lactobacillus Reuteri*)
COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE
ASSOCIADA AO DIABETES MELLITUS: estudo clínico,
controlado e randomizado**

2021

JULIANA DE FÁTIMA PEDROSO

**EFEITO DA TERAPIA PROBIÓTICA (*Lactobacillus Reuteri*)
COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE
ASSOCIADA AO DIABETES MELLITUS: estudo clínico, controlado e
randomizado**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Maria Ap. Neves Jardim

Coorientadora: Dra. Mariéllen Longo

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Pedroso, Juliana de Fátima

Efeito da terapia probiótica (*Lactobacillus reuteri*) coadjuvante no tratamento da periodontite associada ao Diabetes Mellitus: estudo clínico, controlado e randomizado / Juliana de Fátima Pedroso. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.

52 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientador: Maria Aparecida Neves Jardimi

Coorientador: Mariellen Longo

1. Debridamento periodontal. 2. Probióticos. 3. Periodontite. 4. Diabetes Mellitus tipo 2. 5. Citocinas. I. Jardimi, Maria Aparecida Neves, orient. II. Longo, Mariellen, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Assoc. Maria Ap. Neves Jardim (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Dr. Guilherme Rodrigues Teodoro

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Dra. Jorgiana Sangalli

Divisão de Integração Ensino-Serviço

Prefeitura Municipal de Campo Grande - PMCG

Prof^a. Assist. Andrea Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. José Benedito Oliveira Amorim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituição de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 26 de abril de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos 40 pacientes que, voluntariamente, se dispuseram a participar do estudo.

Agradeço a colaboração da Dra. Mariéllen Longo no planejamento e desenvolvimento deste estudo.

Agradeço a participação do Dr. Guilherme Rodrigues Teodoro na etapa de coleta das amostras dos pacientes.

Agradeço à Profa. Nágila Raquel Teixeira Damasceno e ao Prof. Antônio Martins Figueiredo Neto pela colaboração na parte técnica e pela busca de recursos financeiros para execução deste projeto.

Agradeço a toda equipe técnica do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia do ICT-Unesp.

Agradeço ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fluidos Complexos -INCT-FCx, pelo apoio financeiro.

Agradeço a Profa. Maria Ap. Neves Jardim pela orientação durante a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 População alvo	14
3.1.1 Tamanho da amostra	14
3.1.2 Critérios de inclusão.....	15
3.1.3 Critérios de não inclusão	15
3.1.4 Critérios de saída.....	16
3.2 Delineamento do estudo	16
3.3 Terapias iniciais.....	16
3.4 Randomização e cegamento.....	17
3.5 Tratamento periodontal.....	18
3.6 Medidas clínicas.....	19
3.7 Avaliação dos efeitos adversos	20
3.8 Coleta do fluido crevicular gengival.....	20
3.9 Análise centrada no paciente.....	21
3.10 Dosagem de citocinas	21
3.11 Análise estatística	22
4 RESULTADOS.....	23
4.1 Dados demográficos	23
4.2 Parâmetros clínicos periodontais.....	24
4.3 Estratificação dos sítios moderados e profundos	26
4.4 Índice PISA	27

4.5 Avaliação de efeitos adversos	28
4.6 Dados do OHIP	30
4.7 Dosagem de citocinas	33
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
APÊNCIDES.....	50
ANEXOS	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
FCG	Fluido crevicular gengival
HbA1c	Hemoglobina glicada
IG	Índice de sangramento gengival
IP	Índice de placa
NIC	Nível de inserção clínica
OHIP	Oral Health Impact Profile
P	Periodontite
PISA	Área de superfície periodontal inflamada
P.S.	Profundidade de sondagem
RAR+Placebo	Raspagem e alisamento radicular associado a placebo
RAR+Probi	Raspagem e alisamento radicular associado a probiótico
RG	Recessão gengival

Pedroso JF. Efeito da terapia probiótica (*Lactobacillus reuteri*) coadjuvante no tratamento da periodontite associada ao Diabetes Mellitus: estudo clínico, controlado e randomizado [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

A associação de probióticos ao debridamento mecânico pode ser uma proposta de tratamento das doenças periodontais, em especial para pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Avaliou-se os efeitos da administração do probiótico *Lactobacillus reuteri* como terapia coadjuvante no tratamento da Periodontite (P) associada ao DM2. Um total de 40 participantes diabéticos e diagnosticados com P foram randomizados em Grupo RAR+Placebo (n=20): receberam debridamento mecânico associado ao probiótico e Grupo RAR+Probi (n=20): tratados com debridamento mecânico associado a um placebo. Foram realizadas avaliações de profundidade de sondagem (P.S.), recessão gengival (RG), nível de inserção clínica (NIC), índice de placa (IP), índice de sangramento gengival (IG) e índice PISA no baseline, 30, 90 e 180 dias. Foi realizada dosagem da concentração de citocinas (INF- γ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α) do fluido crevicular gengival (FCG), no baseline e 180 dias após o tratamento. Informações sobre efeitos adversos do uso de medicamentos e sobre qualidade de vida foram coletadas. Os dados foram obtidos em média e desvio padrão, e analisados pelos testes Fridman/Tukey e MannWhitney. Considerado a metodologia do presente estudo, os resultados obtidos apontam que o debridamento periodontal promoveu melhora significativa ($p<0.05$) nos parâmetros clínicos periodontais em ambos os grupos, mas o uso do probiótico não foi eficiente para resultados adicionais quando comparado com o placebo. A terapia periodontal interferiu nos níveis de citocinas do FCG, porém não se pode afirmar que o uso de probiótico apresenta o mesmo efeito.

Palavras-chave: Debridamento periodontal. Probióticos. Periodontite. Diabetes Mellitus tipo 2. Citocinas.

Pedroso JF. Effect of adjuvant probiotic therapy (*Lactobacillus reuteri*) in the treatment of periodontitis associated with Diabetes Mellitus: clinical, controlled and randomized study [thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

The association of probiotics with mechanical debridement may be a proposal for the treatment of periodontal diseases, especially for patients with type 2 Diabetes Mellitus (DM2). The effects of the administration of the probiotic *Lactobacillus reuteri* as an adjunctive therapy in the treatment of Periodontitis (P) associated with DM2 were evaluated. A total of 40 diabetic participants and diagnosed with P were randomized into Group RAR + Placebo (n = 20): received mechanical debridement associated with the probiotic and Group RAR + Probi (n = 20): treated with mechanical debridement associated with a placebo. Probing depth (P.S.), gingival recession (RG), clinical insertion level (NIC), plaque index (IP), gingival bleeding index (IG) and PISA index were performed at baseline, 30, 90 and 180 days. Measurement of the concentration of cytokines (INF- γ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α) of the gingival crevicular fluid (FCG), at baseline and 180 days after treatment. Information on adverse effects of medication use and on quality of life was collected. The data were obtained in mean and standard deviation, and analyzed by the Fridman / Tukey and MannWhiteny tests. Considering the methodology of the present study, the results obtained point out that periodontal debridement promoted a significant improvement ($p < 0.05$) in periodontal clinical parameters in both groups, but the use of probiotic was not efficient for additional results when compared with placebo. Periodontal therapy interfered with FCG cytokine levels, but it cannot be said that the use of probiotics has the same effect. Cytokines

Keywords: Periodontal debridement. Probiotics. Periodontitis. Type 2 Diabetes Mellitus. Cytokines.

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença crônico-metabólica na qual o pâncreas não produz insulina o suficiente ou o organismo se torna incapaz de utilizá-la de forma efetiva (Brugués et al., 2016) e atinge cerca de 5% da população mundial (Cervino et al., 2019). A resposta imune e a presença exacerbada de citocinas estão correlacionadas com o início e desenvolvimento da DM2, o que a caracteriza como uma doença inflamatória (Donath et al., 2011; Duncan et al., 2003; Hotamisligil et al., 2006; Kolb et al., 2005; Morettini et al., 2015; Pradhan et al., 2001; Schmidt et al., 1999). Além disso, o DM2 pode levar ao desequilíbrio metabólico, hiperglicemia e inflamação crônica com potencial influência sobre a integridade de tecidos e sua reparação (Taylor et al., 2013).

A Periodontite (P) é caracterizada por um processo inflamatório crônico destrutivo, que atinge os tecidos de suporte do dente, e ocorre devido à ação de bactérias e seus subprodutos. Sua manifestação provém da interação entre o agente causador e a resposta imune e inflamatória do hospedeiro (Dentino et al., 2013; Dhingra, 2012). O DM2 e a P são doenças biologicamente associadas (Khanuja et al., 2016), pois apresentam a mesma etiopatogênese inflamatória (Acharya et al., 2015) e demonstram uma relação bidirecional, pois DM2 afeta a severidade da P, e esta pode contribuir para a carga inflamatória total do indivíduo, influenciando o curso natural do DM2 (Bascones-Martinez et al., 2011). A periodontite afeta aproximadamente 10% da população mundial, mas essa prevalência pode aumentar para 15% quando se considera pacientes com DM2 (Frencken et al., 2017; Preshaw et al., 2012). Pacientes com DM2 e portadores de P apresentam maior risco de desenvolver complicações decorrentes do diabetes, em comparação com pacientes sem periodontite

(Nguyen et al., 2020).

A periodontite dificulta o controle glicêmico em indivíduos com diabetes, em relação àqueles sem periodontite, e consequentemente, o pobre controle da glicemia está associado ao aumento do nível e frequência de patógenos periodontais (Miranda et al., 2017; Taylor et al., 1996). A composição do biofilme subgengival de pacientes diabéticos portadores de periodontite é diferente do biofilme de pacientes que apresentam apenas a doença periodontal, pois aquele apresenta altas quantidades de *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. Gingivalis*, *P. Intermedia*, *F. nucleatum*, *E. nodatum* e *P. micra* quando comparado aos indivíduos sem diabetes (Aemaimanan et al., 2013; Li et al., 2012; Miranda et al., 2017). O biofilme subgengival de diabéticos apresenta maiores quantidade de bactérias do complexo vermelho, tanto em sítios saudáveis quanto em sítios atingidos pela periodontite, mostrando que, o elevado número de bactérias periodontopatógenas em pacientes diabéticos não está relacionado apenas com a severidade da doença periodontal, mas também com o aumento da resistência à insulina e o baixo controle glicêmico (Aemaimanan et al., 2013).

A terapia periodontal não-cirúrgica é considerada o padrão-ouro para o tratamento da P (Goodson et al., 2012), e envolve o debridamento radicular associado a instruções de higiene oral ao paciente (Claffey et al., 2000). A literatura demonstra que a terapia mecânica promove melhora no tecido periodontal, inclusive em pacientes diabéticos. (Westfelt et al., 1996; Kiran et al., 2005; Singh et al., 2008; Koromantzos et al., 2011). No entanto, esta abordagem convencional de tratamento pode ser insuficiente para se obter uma microbiota compatível com periodonto saudável em pacientes portadores de DM2 (Grellmann et al., 2016), podendo aumentar as chances de falha terapêutica, especialmente nas bolsas periodontais profundas, regiões de furca e bolsas complexas (Bower, 1979; Brayer et al., 1989).

Na busca de se obter uma microbiota compatível no periodonto, terapias coadjuvantes são associadas ao debridamento mecânico, auxiliando na descontaminação da superfície radicular. Antibióticos, antissépticos, terapia fotodinâmica e administração de vitamina C são exemplos de abordagens alternativas (Aykol et al., 2011; Berezow, Darveau, 2011; Bogdan et al., 2020; Garcia et al., 2013; Garcia et al., 2014; Guarnelli et al., 2010).

Um dos fatores de risco associados à etiologia das doenças periodontais é a redução ou ausência de microrganismos benéficos nos tecidos periodontais, como os probióticos (Socransky, Haffajee, 1992; Slot, Rams 1991; Wolff et al., 1994). A Organização de Alimentos e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (WHO) definem os probióticos como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (Brown, Valiere, 2004).

Os sítios atingidos pela periodontite, além de abrigarem bactérias periodontopatógenas, também podem ser colonizados por espécies de lactobacilos probióticos, os quais podem inibir a ação daquelas (Köll-Klais et al., 2005). Assim, os probióticos atuam como moduladores na composição do biofilme recém-formado, favorecendo a fixação da flora comensal e impedindo a colonização de patógenos verdadeiros, os quais são associados a processos inflamatórios nos tecidos periodontais (Teughels et al., 2011). Desta forma, a utilização de probióticos associada ao debridamento radicular tem sido proposta para tratamento da periodontite (Teughels et al., 2011), pois os probióticos são capazes de diminuir a contagem total de UFC (unidades formadoras de colônias) de patógenos periodontais (Seminario-Amez et al., 2017).

Sugere-se que os mecanismos de atuação dos probióticos no periodonto, em específico, nas células do epitélio oral, estão associados à modulação da resposta inflamatória do hospedeiro (Stamatova, Meurman, 2009), através da inibição de interleucinas (Cosseau et al., 2008; Sliepen et al., 2009; Zhang et al.,

2008) e redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Twetman et al., 2009). O emprego de probióticos pode atuar no controle dos sinais clínicos da inflamação para o tratamento da gengivite (Slawik et al., 2011; Staab et al., 2009), periodontite (Shimauchi et al., 2008; Szkaradkiewicz et al., 2014; Tekce et al., 2015; Tsubura et al., 2009; Vicario et al., 2013; Vivekananda et al., 2010) e periodontite agressiva (Shahet al., 2013). A atuação dos probióticos promove redução dos parâmetros clínicos periodontais (Hallström et al., 2013; Harini, Anegundi, 2010; Iniesta et al., 2012; Krasse et al., 2005; Matsuoka et al., 2006; Mayanagi et al., 2009; Riccia et al., 2007; Teughels et al., 2013; Twetman et al., 2009), com redução da profundidade de bolsa, redução do índice de sangramento a sondagem, e diminuição de bactérias anaeróbias (Harini, Anegundi, 2010; Krasse et al., 2005; Riccia et al., 2007; Teughels et al., 2013; Twetman et al., 2009).

Os principais microrganismos utilizados como probióticos são bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Bifidobacterium* (Bron et al., 2012). O *Lactobacillus reuteri*, presente na microbiota bucal inata em seres humanos, apresenta propriedades antibacterianas por converter glicerol em reuterina. Este composto orgânico denominado reuterina apresenta amplo espectro antimicrobiano (Iniesta et al., 2012), favorecendo a manutenção de uma microbiota saudável, pois impede o crescimento excessivo de outros microrganismos patogênicos (Jones, Versalovic, 2009).

A literatura não esclarece se os probióticos oferecem reais benefícios clínicos no tratamento da periodontite, sendo que a maioria dos estudos mostra uma melhora limitada e temporária nos parâmetros clínicos periodontais (Jayaram et al., 2016). Além do mais, não foram encontrados estudos com probióticos em pacientes diabéticos. Diante disso, o objetivo do presente projeto foi avaliar os efeitos do probiótico como terapia coadjuvante no tratamento da P em pacientes portadores de DM2, através de análise clínica.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de análise clínica, os efeitos da administração de probiótico (*Lactobacillus reuteri*) como terapia coadjuvante para o tratamento da Periodontite em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia do presente estudo segue as normas do novo CONSORT-STATEMENT de 2010 (Moher et al., 2010) e do SPIRIT-STATEMENT de 2013 para ensaios clínicos randomizados. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP sob número 2.708.923, e foi registrado na plataforma de Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC: RBR-8t4qqx).

3.1 População alvo

A população alvo do estudo foi constituída de 40 pacientes diagnosticados com Periodontite e portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, os quais foram recrutados no Instituto de Ciência e Tecnologia- UNESP, em São José dos Campos/SP.

3.1.1 Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado para a variável primária “mudança na profundidade de sondagem”, baseada em Vivekananda et al. (2010). Considerando um α de 5% e um erro tipo β de 20% (Power de 80%) para detectar uma diferença de pelo menos 1 mm na redução da profundidade de sondagem de bolsas maiores que 5mm entre os grupos para um desvio padrão de

0,79 e uma diferença entre o grupo de teste e controle de 0,3 mm, calculou-se que 16 pacientes eram necessários em cada grupo (www.sealedenvelope.com). Com uma atrição de 20% a amostra incluída foi de 20 pacientes por grupo.

3.1.2 Critérios de inclusão

- a) indivíduos acima de 35 anos portadores de DM2 tipo 2 diagnosticado há mais de cinco anos e HbA1c <9 (Borgnakke et al., 2014);
- b) ter sido diagnosticado com periodontite estágio III e IV grau B;
- c) apresentar no mínimo 16 dentes;
- d) concordar em participar do estudo e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para a participação na pesquisa, após a explicação dos riscos e benefícios (Resolução nº 196 de outubro de 1996 e o Código de Ética Profissional Odontológico–C.F.O.–179/93).

3.1.3 Critérios de não inclusão

- a) pacientes portadores de doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios gastrointestinais, doenças de pele, gravidez, lactação, tabagismo, artrite, lúpus;
- b) ter passado por tratamento periodontal nos últimos 12 meses;
- c) ter feito uso de suplementos antioxidantes, anti-inflamatórios, ou antibióticos no prazo de 3 meses anteriores;

- d) ter alterado a medicação para controle da glicemia nos últimos 3 meses;
- e) apresentar elementos dentários com inflamação pulpar ou periapical;
- f) apresentar quaisquer outras doenças de origem inflamatória.

3.1.4 Critérios de saída

- a) pacientes que, por qualquer motivo, fizerem uso de drogas antibióticas e/ou anti-inflamatórias durante o período do estudo;
- b) pacientes que voluntariamente decidirem abandonar a pesquisa.

3.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo do tipo clínico, controlado, randomizado, triplo cego e prospectivo, com acompanhamento de 6 meses.

3.3 Terapias iniciais

Todos os pacientes foram instruídos sobre a relação entre a Doença Periodontal e a da DM2 e passaram por uma terapia inicial. Esta consistiu na adequação do meio bucal e incluiu procedimentos como: extrações, tratamentos

endodônticos, remoção de tecido cariado com selamento de cavidades, e remoção de excessos de restaurações. Posteriormente receberam instrução de higiene oral, raspagem de cálculo supragengival, profilaxia e polimento coronário.

3.4 Randomização e cegamento

Uma pessoa externa ao projeto (secretária da disciplina de periodontia) gerou uma sequência utilizando o software – “first (and original) generator”, disponível no site www.randomization.com, para alocar aleatoriamente os pacientes em cada grupo. Essa sequência foi distribuída em envelopes pardo-opacos, os quais foram selados. Cada envelope continha o número do paciente e indicava a qual grupo pertencia, e conseqüentemente, se recebeu o probiótico ou placebo como terapia coadjuvante. As numerações foram reveladas somente no momento da terapia periodontal. Este procedimento de colocar o tratamento que cada paciente iria receber em um envelope opaco teve como objetivo ocultar a sequência de randomização das pessoas responsáveis pela alocação dos pacientes, pelo pesquisador responsável pelo tratamento e pelo pesquisador responsável pelas aferições dos parâmetros.

Além do ocultamento da randomização, os pacientes, o pesquisador responsável pelos procedimentos de tratamento (debridamento periodontal) e o pesquisador responsável pelas medidas não tinham conhecimento sobre qual tratamento cada grupo recebeu, caracterizando o cegamento do estudo. As medidas de randomização e ocultamento da randomização foram realizadas de acordo com as normas do CONSORT 2010 (Moher et al., 2010).

3.5 Tratamento periodontal

Todos os pacientes receberam debridamento periodontal ultrassônico de boca toda em estágio único (Wennström et al., 2005), após anestesia com mepivacaína e a sessão durou em média 1 hora. Foi utilizado equipamento ultrassônico (Prof Neo, Dabi Atlante-BR) com pontas específicas (Dabi Atlante TipPerio Sub- EVMWQHED3). Todos os sítios que apresentam doença periodontal foram instrumentados nesta sessão, sendo o debridamento realizado por um único operador treinado, cego para a alocação dos pacientes, e diferente do avaliador. Após esta terapia mecânica, os pacientes foram designados para um dos seguintes grupos:

a) Grupo RAR+Placebo (n=20): pacientes com P, portadores de DM2, tratados com debridamento periodontal associado a um placebo;

b) Grupo RAR+Probi (n=20): pacientes com P, portadores de DM2 que receberam debridamento periodontal associado ao probiótico *Lactobacillus reuteri*.

No grupo RAR+Probi, foi administrado o probiótico (pastilha) 2 vezes por dia, após a escovação, sendo uma pela manhã e outra à noite, durante um período de 21 dias consecutivos (Vivekananda et al., 2010; Ince et al., 2015; Tekce et al., 2015). O probiótico utilizado foi o *Lactobacillus reuteri*, o qual é composto pelas cepas DSM 17938 e ATCC PTA 5289, ambos com concentração de 1×10^8 UFC/pastilha (Prodentis: BioGaia, Lund, Suécia) (Tekce et al., 2015; Teughels et al., 2013; Twetman et al., 2009). As pastilhas apresentam sabor de hortelã, e sua administração começou imediatamente após a sessão de debridamento periodontal. No grupo RAR+Placebo, um placebo com

formato e sabor semelhantes ao probiótico, também foi administrado 2 vezes por dia, pela manhã e a noite, por um período de 21 dias consecutivos.

3.6 Medidas clínicas

As medidas clínicas foram realizadas no baseline, 30, 90 e 180 dias após o tratamento, utilizando uma sonda periodontal Carolina do Norte (UNC- Hu-Frieday). Os seguintes parâmetros foram avaliados: Índice de Placa (IP); Índice Gengival (IG); Profundidade de Sondagem (P.S.), obtida através da medida do fundo da bolsa até a margem gengival; Nível Clínico de Inserção (NIC), obtida através da medida do fundo da bolsa até a junção cimento- esmalte; Recessão Gengival (RG), medida obtida da junção cimento-esmalte até a margem gengival; e Área de superfície Periodontal Inflamada (PISA).

Todas as medidas clínicas foram realizadas por um único pesquisador previamente calibrado para as medidas e que estava cego em relação ao tratamento recebido pelos pacientes. A calibração do examinador foi feita da seguinte forma: o examinador mediu a P.S. e o NIC de 10 pacientes duas vezes em um intervalo de 48 horas. Em seguida, as medidas foram submetidas ao teste de correlação intraclasse e o examinador foi julgado calibrado após encontrar uma concordância de 90% nas medidas. Esse procedimento se repetiu até que o examinador atingisse esse índice.

A Área de Superfície Periodontal Inflamada (PISA) foi calculada a partir de dados coletados na sondagem da bolsa periodontal. Para o cálculo do PISA, foram realizadas as seguintes etapas:

- a) após preencher os valores do Nível de inserção clínica (NIC) em uma planilha de Excel desenvolvida e disponibilizada pelos

autores do método de PISA (Nesse et al., 2008), o programa calcula a média de NIC para cada dente;

- b) a média do NIC para cada dente é inserido em uma fórmula;
- c) após preencher os valores de Recessão gengival (RG), o programa calcula a média de RG para cada dente;
- d) a média de RG para cada dente é inserida em uma fórmula;
- e) a área obtida pela RG (área de recessão) é subtraída da área obtida pelo NIC (área total), resultando na Área de Superfície Periodontal Epitelial (PESA);
- f) o valor de PESA para cada dente é multiplicado pelo número de sítios com resposta positiva para o Sangramento à Sondagem (SS), obtendo-se o valor de PISA;
- g) a soma de todos os valores de PISA para cada dente é calculada, resultando no valor de PISA total.

3.7 Avaliação de efeitos adversos

Durante a administração da terapia coadjuvante, probiótico ou placebo, todos os participantes preencheram um formulário em relação a efeitos adversos do uso de medicamentos. No primeiro dia de administração do coadjuvante, os participantes receberam um formulário de papel, contendo perguntas a respeito de possíveis efeitos adversos do uso das pastilhas. O formulário foi preenchido durante os 21 dias da terapia coadjuvante.

3.8 Coleta do fluido crevicular gengival

A placa supragengival visual foi cuidadosamente removida com uma sonda periodontal e rolete de algodão estéril. Nos sítios previamente secos com jato de ar, o fluido crevicular gengival (FCG) foi coletado através de cones de papel estéril (Ponta de Papel Absorvente – MK Life, Porto Alegre, Brasil). Foram coletadas amostras de fluido crevicular gengival de bolsas que apresentavam P.S. ≥ 7 mm no baseline. As mesmas bolsas, independente da medida de P.S., foram avaliadas em 30, 90 e 180 dias após o tratamento.

Os cones foram inseridos suavemente no sulco gengival e permaneceram durante 20 segundos (Yucel-Lindberg et al., 1999). Os cones foram transferidos para eppendorf contendo 120 ml de PBS (solução salina tamponada com fosfato) associado com 0,05% de Tween 20, e após, foram armazenados no freezer a -80°C .

3.9 Análise centrada no paciente

Avaliação do impacto da saúde oral na qualidade de vida do paciente, isto é, a percepção do paciente a respeito do impacto das condições orais no seu bem-estar, foi realizada através de um questionário com 14 perguntas: Oral Health Impact Profile (OHIP-14). Os pacientes responderam a esse questionário antes do tratamento e após 6 meses de acompanhamento.

3.10 Dosagem de citocinas

Os níveis de INF- γ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α foram determinadas utilizando Kits Multiplex específicos (HCYTOMAG-60K-06- Human Cytokine/ Chemokine Panel I, 6 plex), de acordo com as instruções do fabricante. A análise foi realizada em equipamento MAGPIX XPONENT 4.2 TEC/NCM: 90275040 MAGPIX System with x PONENT 4.2.

3.11 Análise estatística

Os dados foram disponibilizados em média e desvio padrão. Para IG e IP, foram expressos em porcentagem. A avaliação de normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste de Fridman/Tukey foi utilizado para diferenças intragrupo, enquanto o teste MannWhiteny, para intergrupo. Para a avaliação centrada no paciente, questionário OHIP, foram realizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e o teste de Wilcoxon para encontrar também diferenças intra e inter grupo ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos

Dos 40 pacientes que iniciaram o tratamento, apenas 1 paciente do grupo teste não retornou para o controle clínico, sendo excluído do estudo, como mostra no processo de randomização da figura 1. Os dados demográficos coletados foram expressos em porcentagem, apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Dados demográficos dos pacientes incluídos na pesquisa (n=40)

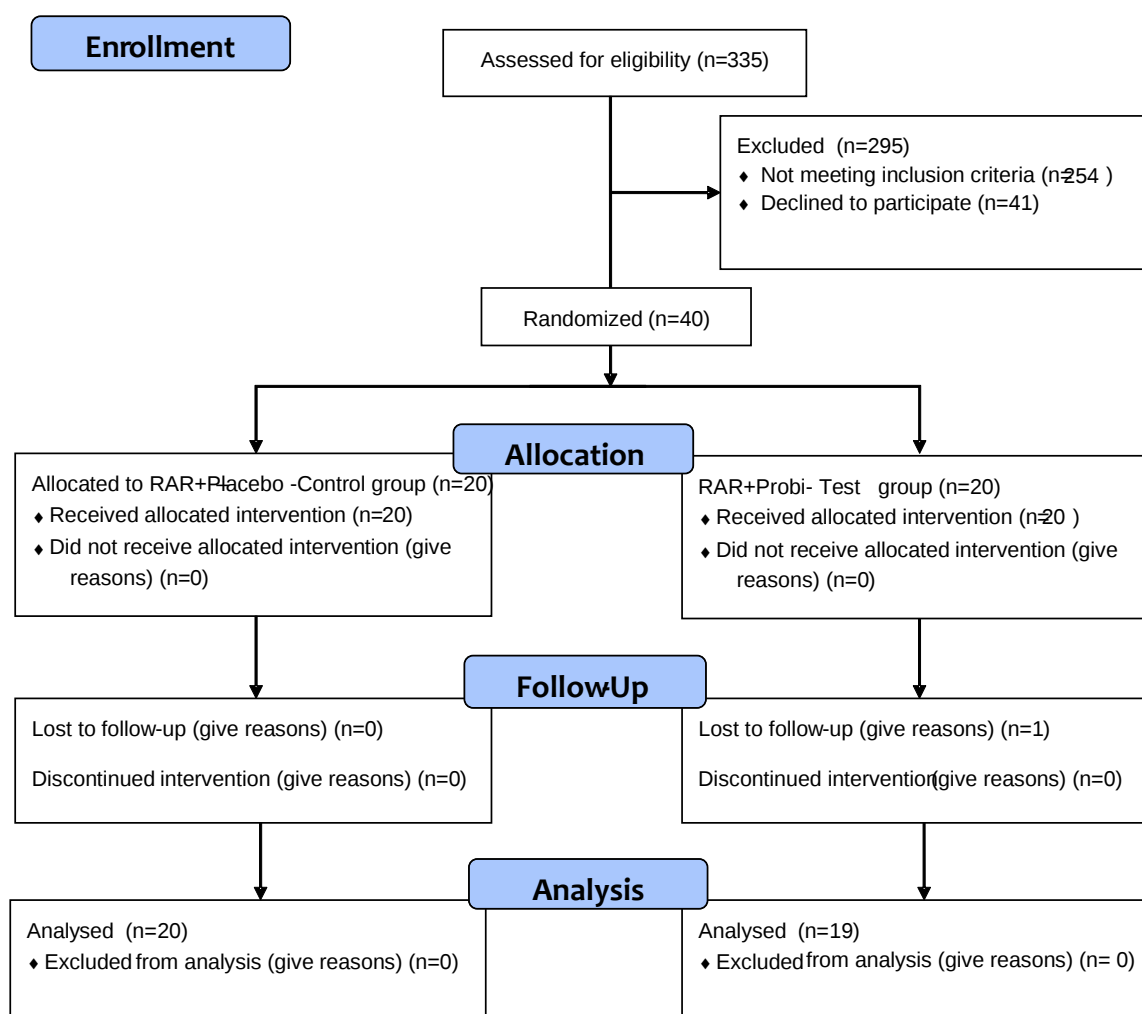
Parâmetro	RAR+Placebo(n=20)	RAR+Probi(n=19)	p-value
Idade (anos)	54.3±10.2	63.8±9.4	0.004* a
nº de dentes	22.3±4.5	22.0±4.8	0.83 a
Gênero (M/F)	6/14	8/11	0.514 b

Legenda: (M) masculino; (F) feminino; (a) Teste t; (b) Teste Qui-quadrado; *estatisticamente significativa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1- Processo de randomização de acordo com as normas do CONSORT 2010

CONSORT 2010 Flow Diagram



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Parâmetros clínicos periodontais

Foram obtidos, em porcentagem, o Índice Gengival (IG) e o Índice de Placa (IP) e, por média e desvio padrão, a Profundidade de Sondagem (P.S.), Recessão Gengival (RG) e o Nível de Inserção Clínico (NIC). As medidas foram realizadas no baseline, 30, 90 e 180 dias após o tratamento. Tanto no grupo

RAR+Placebo como no grupo RAR+Probi, as porcentagens de IG e de IP reduziram ao longo do tempo, porém sem diferenças significativas entre os grupos estudados. Em relação a P.S., o grupo RAR+Placebo mostrou redução a partir de 90 dias, enquanto o grupo RAR+Probi, mostrou redução somente a partir de 180 dias de acompanhamento. Os índices de RG mantiveram-se estáveis ao longo do tempo em ambos os grupos, porém no grupo RAR+Probi mostrou maiores índices de RG quando comparado com o grupo RAR+Placebo. NIC exibiu reduções significativas ao longo do tempo, em ambos os grupos. Os dados clínicos estão expostos na tabela 2.

Tabela 2- Parâmetros clínicos periodontais expressos em porcentagem para o Índice Gengival (IG) e Índice de Placa (IP) e em média e desvio padrão para Profundidade de Sondagem (P.S.) e Nível de Inserção Clínica (NIC)

Parâmetros	Tempo	RAR+Placebo	RAR+Probi	p-value (intergrupo)
IG (%)	Baseline	88 ±19Aa	93±17Aa	0,11
	30 dias	41±23Ba	42±26Ba	0,98
	90 dias	29±21Ba	35±27Ba	0,40
	180 dias	24±26Ba	29±27Ba	0,31
IP (%)	Baseline	69±14Aa	67±19Aa	0,34
	30 dias	50±24Aa	55±24Aa	0,53
	90 dias	54±22Aa	52±19Aa	0,47
	180 dias	35±29Ba	45±28Aa	0,27
P.S. (mm)	Baseline	3,31±0,31Aa	3,6±0,54Aa	0,23
	30 dias	3,00±0,43Aa	3,15±0,57Aa	0,29
	90 dias	2,75±0,43Ba	3,12±0,47Aa	0,05
	180 dias	2,69±0,41Ba	2,87±0,51Ba	0,27
RG (mm)	Baseline	0,26±0,20Aa	0,41±0,20Ab	0,016*
	30 dias	0,29±0,22Aa	0,42±0,20Ab	0,05
	90 dias	0,27±0,21Aa	0,46±0,23Ab	0,005*
	180 dias	0,27±0,21Aa	0,44±0,22Ab	0,013*
NIC (mm)	Baseline	3,57±0,40Aa	4,00±0,61Ab	0,02*
	30 dias	3,28±0,55Aa	3,57±0,63Ba	0,12
	90 dias	3,02±0,54Ba	3,58±0,61Bb	0,002*
	180 dias	2,96±0,47Ba	3,32±0,57Bb	0,024*

Legenda: Letras maiúsculas na vertical e letras minúsculas na horizontal indicam as diferenças estatisticamente significantes. (A) diferenças Intragrupos, teste de Fridman; (a) diferenças Intergrupos,

teste de Mann-Whitney; (*) diferença estatisticamente significativa. $P < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Estratificação dos sítios moderados e profundos

Os dados de P.S. (Profundidade de Sondagem) e NIC (Nível Clínico de Inserção) foram subdivididos de acordo com a profundidade, em moderada (5 e 6mm) e profunda (≥ 7 mm). A quantidade de sítios que apresentavam profundidade moderada e profunda em relação a OS e NIC também foi analisada. Em ambos os grupos, para P.S. e NIC entre 5 e 6 mm, os resultados apontam que houve redução desses parâmetros após 30 dias de tratamento, estabilizando-se até os 180 dias. Já em relação aos sítios com P.S. e NIC >7 mm, o grupo RAR+Probi apresentou valores significativamente maiores em relação ao grupo RAR+Placebo. No baseline, o grupo RAR+Probi apresentava maior quantidade de bolsas >7 mm, em relação ao grupo placebo, com significância estatística. Os dados coletados foram expressos em média e desvio padrão, e encontram-se na tabela 3.

Tabela 3- Estratificação de P.S. e NIC em relação a sítios moderados (5 e 6mm) e sítios profundos (≥ 7 mm), expressos em média e desvio padrão

(continua)

Parâmetros	Tempo	RAR+Placebo	RAR+Probi	p-value (intergrupo)
P.S. (5 e 6mm)	Baseline	5.4 $\pm$ 0.24 Aa	5.34 $\pm$ 0.18 Aa	0.40
	30 dias	4.32 $\pm$ 0.61Ba	4.43 $\pm$ 0.66Ba	0.57
	90 dias	3.9 $\pm$ 0.68Ba	4.14 $\pm$ 0.58Ba	0.16
	180 dias	3.75 $\pm$ 0.63Ba	3.81 $\pm$ 0.59Ba	0.74

Tabela 3- Estratificação de P.S. e NIC em relação a sítios moderados (5 e 6mm) e sítios profundos (≥ 7 mm), expressos em média e desvio padrão

(conclusão)

Parâmetros	Tempo	RAR+Placebo	RAR+Probi	p-value (intergrupo)
NIC (5 e 6mm)	Baseline	5.38±0.19Aa	5.34±0,18 Aa	0.43
	30 dias	4.51±0.56Ba	4.43±0.66Ba	0.72
	90 dias	4.21±0.65Ba	4.14±0.58Ba	0.66
	180 dias	4.08±0.65Ba	3.81±0.59Ba	0.08
# P.S. (5 e 6mm)	Baseline	10.00±5.33Aa	13.55±10.3Aa	0.33
	30 dias	3.35±3.00Ba	6.05±5.64Ba	0.16
	90 dias	2.5±2.54Ba	6.15±6.52Ba	0.06
	180 dias	2.55±2.21Baa	5.30±6.41Ba	0.38
P.S. (≥ 7 mm)	Baseline	8.53±1.33Aa	7.95±0.44Aa	0.32
	30 dias	5.32±1.73Ba	6.50±1.51Ba	0.10
	90 dias	4.99±1.46Ba	6.23±1.0Bb	0.02*
	180 dias	4.83±1.38Ba	5.05±1.65Ba	0.79
NIC (≥ 7 mm)	Baseline	6.56±3.53Aa	7.51±1.99Aa	0.73
	30 dias	4.65±3.09Aa	6.69±2.01Ab	0.03*
	90 dias	4.49±2.77Aa	6.47±1.94Ab	0.02*
	180 dias	4.35±2.62Aa	5.89±1.84Ab	0.04*
# P.S. ≥ 7 mm)	Baseline	4.08±2.06Aa	8.38±6.78Ab	0.03*
	30 dias	1.31±1.03Ba	4.31±4.70Aa	0.18
	90 dias	0.92±0.86Ba	3.85±3.89Aa	0.05
	180 dias	0.85±0.90Baa	3.00±3.42B	0.22

Legenda: Letras maiúsculas na vertical e letras minúsculas na horizontal indicam as diferenças estatisticamente significantes. (A) diferenças Intragrupos, teste de Fridman; (a) diferenças Intergrupos, teste de Mann-Whitney; (*) diferença estatisticamente significativa. $P < 0,05$. #: quantidade de sítios.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Índice PISA

Em relação aos valores de PISA, na tabela 4 estão demonstrados os valores em mm², considerando o tratamento realizado e o tempo. Os valores foram obtidos no baseline, 30, 90 e 180 dias após o tratamento. Os resultados

mostram que não houve diferença estatisticamente significativa em relação às terapias realizadas, exceto aos 90 dias. No entanto, houve diferença no tempo de tratamento, sendo possível observar uma redução dos valores, em todos os grupos, com o decorrer do estudo.

Tabela 4 – Valores do PISA (mm²) – Tratamento x Tempo

Grupos	RAR+Placebo (n=20)	RAR+Probi (n=19)	p-value (intergrupo)
Baseline	907,11± 279,28Aa	992,71±360,28Aa	0,49
30 dias	433,03 ±271,66Aba	455,15±320,15Ba	0,95
90 dias	245,25 ±243,65Bca	391,56 ±341,31Bb	0,04*
180 dias	181,93±232,07Ca	262,82±337,35Ba	0,38

Legenda: Teste de Fridman/Tukey, letras minúsculas na horizontal (a) diferenças estatísticas significantes intergrupos e teste Mann Whitney, letras maiúsculas na vertical (A) diferenças estatísticas significantes intragrupos. P<0,05.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Avaliação de efeitos adversos

Durante a administração da terapia coadjuvante, probiótico ou placebo, todos os participantes preencheram um formulário em relação a efeitos adversos do uso de medicamentos. O questionário continha os seguintes itens: A: Teve dor de cabeça? B: Teve dor de estômago? C: Teve náusea ou vomitou? D: Sentiu gosto metálico na boca? E: Teve diarreia ou dor abdominal? F: Sentiu-se sonolento? G: Teve coceira na pele? H: Notou feridas na pele? Os participantes deveriam apontar no questionário a ocorrência de quaisquer um desses sintomas durante o uso das pastilhas. No grupo RAR+Placebo 30% dos participantes relataram ter sofrido dor de cabeça no início do uso do placebo, enquanto 20% sofreram dor de cabeça nas 3 semanas consecutivas. Destaca-se

também que de 10 a 20% dos pacientes que utilizaram o placebo afirmaram ter sofrido episódios de diarreia e/ou dor abdominal durante o período do tratamento. Enquanto que, no grupo que recebeu pastilhas de probióticos, 10% relataram ter sofrido dor de estômago durante as 3 semanas do estudo, e de 15 a 20% sentiram sonolência. Os dados estão expressos em porcentagem e expostos nos quadros 1 e 2.

Quadro 1- Efeitos adversos para administração de medicamentos, expressos em porcentagem – Grupo RAR+Placebo

Grupo RAR+Placebo				
	Baseline	7 dias após	14 dias após	21 dias após
A	30	20	20	20
B	0	0	0	5
C	10	5	5	5
D	5	5	10	10
E	15	10	15	20
F	15	15	5	5
G	10	5	5	10
H	5	5	5	5

Legenda: A: Teve dor de cabeça? B: Teve dor de estômago? C: Teve náusea ou vomitou? D: Sentiu gosto metálico na boca? E: Teve diarreia ou dor abdominal? F: Sentiu-se sonolento? G: Teve coceira na pele? H: Notou feridas na pele?

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 2- Efeitos adversos para administração de medicamentos, expressos em porcentagem – Grupo RAR+Probi

(continua)

Grupo RAR+Probi				
	Baseline	7 dias após	14 dias após	21 dias após
A	5	5	10	5
B	10	10	10	10
C	10	5	5	10

Quadro 2- Efeitos adversos para administração de medicamentos, expressos em porcentagem – Grupo RAR+Probi

(conclusão)

Grupo RAR+Probi				
	Baseline	7 dias após	14 dias após	21 dias após
D	10	5	5	5
E	5	5	5	10
F	20	15	20	15
G	10	5	10	5
H	5	5	5	5

Legenda: A: Teve dor de cabeça? B: Teve dor de estômago? C: Teve náusea ou vomitou? D: Sentiu gosto metálico na boca? E: Teve diarreia ou dor abdominal? F: Sentiu-se sonolento? G: Teve coceira na pele? H: Notou feridas na pele?

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Dados do OHIP

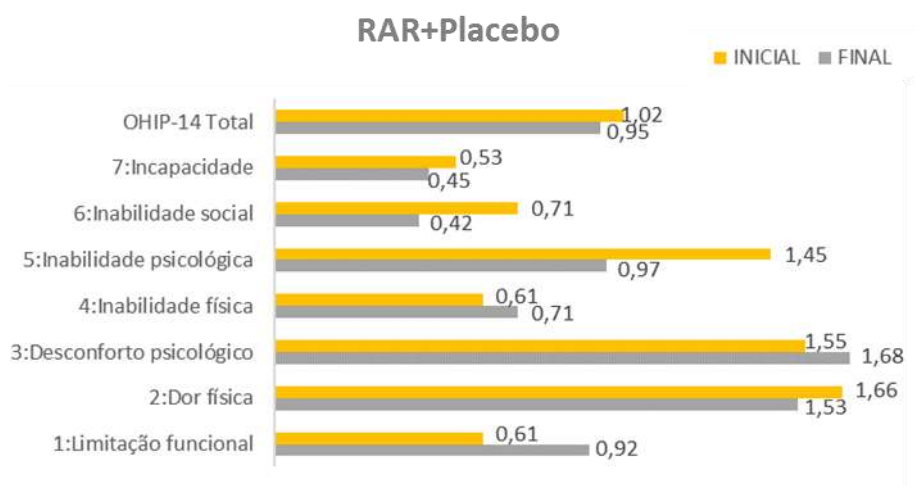
No início do estudo e após 6 meses, os participantes preencheram um questionário sobre a percepção do paciente em relação a sua condição bucal. No entanto, 1 paciente do grupo RAR+Placebo e 1 do grupo RAR+Probi não responderam o formulário OHIP aos 6 meses.

As respostas para cada uma das 14 questões, que variavam da discordância total até a concordância plena, foram codificadas pela escala Likert, com valores de 0 até 4, significando: 0 discordância total e 4concordância total. (Nunca = 0; Quase nunca = 1; Às vezes = 2; Quase sempre = 3 e Sempre = 4).

Os 14 itens foram configurados em 7 dimensões: limitação funcional, dor física, desconforto psicológico, inabilidade física, inabilidade psicológica, inabilidade social e incapacidade, e estão representados nas figuras abaixo, segundo Guerra et al. 2014.

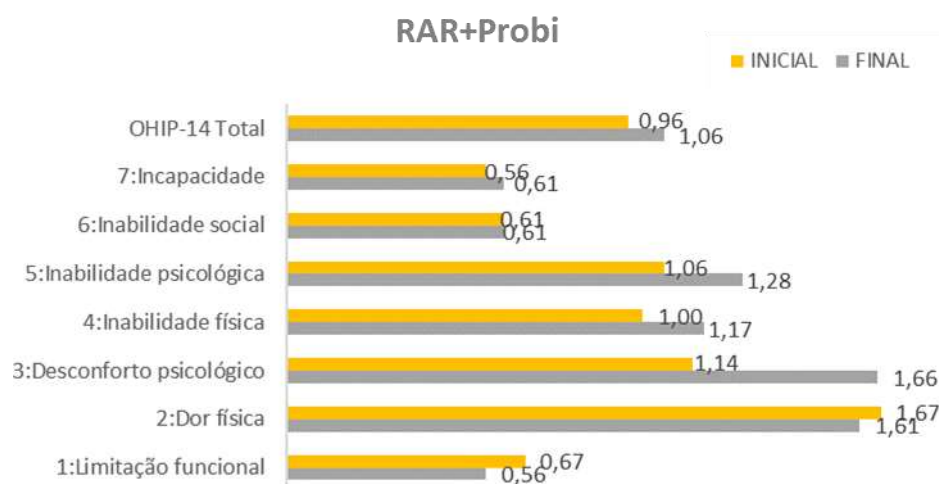
Não foi observada diferença estatisticamente significativa na avaliação intragrupo em RAR+Placebo ($p=0,36$) (figura 2) nem no grupo RAR+Probi ($p=0,16$) (figura 3). Quanto a avaliação intergrupo, não se observou diferença estatisticamente significativa entre eles, nem antes ($p=0,98$) (Figura 4) e nem depois ($p=0,27$) (Figura 5) no OHIP total.

Figura 2 – Gráfico representativo dos dados do OHIP-14 total e das sete dimensões na comparação intra grupo RAR+Placebo, inicial e final



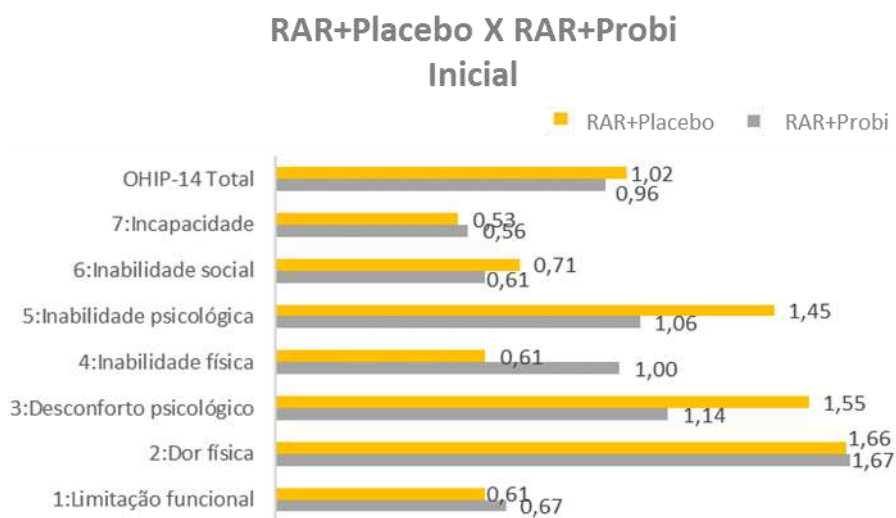
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Gráfico representativo dos dados do OHIP-14 total e das sete dimensões na comparação intra grupo RAR+Probi, inicial e final



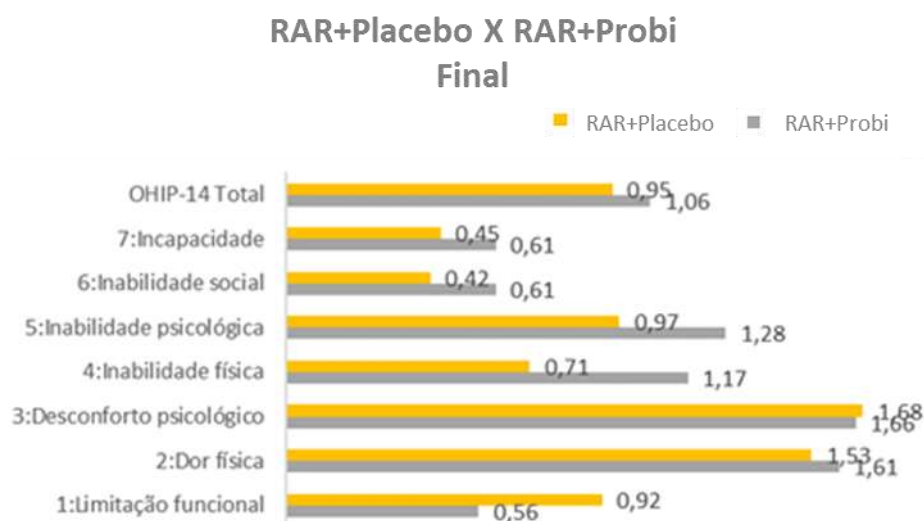
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4- Gráfico representativo dos dados do OHIP-14 total e das sete dimensões na comparação intrer grupo RAR+Placebo X RAR+Probi) inicial



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5- Gráfico representativo dos dados do OHIP-14 total e das sete dimensões na comparação intrer grupo (RAR+Placebo X RAR+Probi) final



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Dosagem de citocinas

Durante as consultas clínicas de baseline, 30, 90 e 180 dias, foram coletadas amostras do fluido crevicular gengival para análise das seguintes citocinas INF- γ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α .

IL-13, IL-6 e TNF- α não exibiram alterações durante os tempos avaliados, tanto nas análises intragrupo, como intergrupo. As dosagens de IL-10 e IL-12 mostraram valores significativamente menores aos 90 dias no grupo RAR+Placebo em comparação com o grupo RAR+Probi. Na avaliação do período de 30 dias, a dosagem de IL-1 β foi estatisticamente maior no grupo RAR+Placebo (361.72 ± 872.21) em comparação com o grupo RAR+Probi (49.61 ± 155.78). Já no tempo 90 dias, houve uma inversão desses valores, sendo IL-1 β no grupo RAR+Probi (108.18 ± 731.43) e no grupo RAR+Probi (554.67 ± 165.89), $p < 0,05$. Os níveis de IL-8 também se mostraram menores no grupo RAR+Placebo (192.90 ± 230.03) em comparação com RAR+Probi (235.89 ± 431.34) para o tempo baseline. Os dados estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5- Dosagem da concentração de citocinas, expressos em média e desvio padrão – Grupo RAR+Placebo e Grupo RAR+Probi

Citocinas	Tempo	RAR+Placebo	RAR+Probi	p-value
INF- γ	Baseline	0.21 $\pm$ 0.47 Aa	0.39 $\pm$ 0.32 Aba	0.822
	30 dias	0.26 $\pm$ 0.56 Aa	0.26 $\pm$ 0.26 Aba	0.676
	90 dias	0.32 $\pm$ 0.65 Aa	0.39 $\pm$ 0.32 Aa	0.220
	180 dias	0.32 $\pm$ 0.65 Aa	0.39 $\pm$ 0.32 Ba	0.423
IL-10	Baseline	1.28 $\pm$ 0.64 Aa	0.87 $\pm$ 10.01 Aa	0.080
	30 dias	1.00 $\pm$ 0.64 Aa	1.00 $\pm$ 0.87 Aa	0.761
	90 dias	0.54 $\pm$ 1.13 Bb	0.64 $\pm$ 1.00 Aa	<0.001*
	180 dias	0.54 $\pm$ 1.13 Aa	0.64 $\pm$ 1.00 Aa	0.590
IL-12	Baseline	0.24 $\pm$ 1.32 Aa	0.38 $\pm$ 0.24 Aba	0.924
	30 dias	0.38 $\pm$ 0.65 Aa	0.38 $\pm$ 0.33 Aa	0.912
	90 dias	0.44 $\pm$ 0.65 Ab	0.90 $\pm$ 1.00 Ba	0.010*
	180 dias	0.44 $\pm$ 0.65 Aa	0.90 $\pm$ 1.00 Aba	0.770
IL-13	Baseline	0.34 $\pm$ 0.70 Aa	0.55 $\pm$ 0.51 Aa	0.264
	30 dias	0.51 $\pm$ 0.51 Aa	0.60 $\pm$ 0.81 Aa	0.325
	90 dias	0.51 $\pm$ 0.92 Aa	0.42 $\pm$ 0.92 Aa	0.354
	180 dias	0.51 $\pm$ 0.92 Aa	0.42 $\pm$ 0.92 Aa	0.618
IL-1 β	Baseline	68.80 $\pm$ 1.406.00 Aa	132.29 $\pm$ 731.43 Aa	0.060
	30 dias	361.72 $\pm$ 872.21 Ab	49.61 $\pm$ 155.78 Aba	0.041*
	90 dias	108.18 $\pm$ 731.43 Ab	554.67 $\pm$ 165.89 Ba	0.035*
	180 dias	108.18 $\pm$ 731.43 Aa	554.67 $\pm$ 165.89 Ba	0.752
IL-4	Baseline	1.48 $\pm$ 3.20 Aa	8.15 $\pm$ 3.20 Aa	0.356
	30 dias	3.20 $\pm$ 3.20 Aa	3.20 $\pm$ 8.15 Aba	0.776
	90 dias	1.48 $\pm$ 23.93 Aa	3.20 $\pm$ 3.20 Ba	0.119
	180 dias	1.48 $\pm$ 23.93 Aa	3.20 $\pm$ 3.20 Aba	0.132
IL-6	Baseline	1.18 $\pm$ 0.67 Aa	0.91 $\pm$ 8.39 Aa	0.071
	30 dias	1.09 $\pm$ 0.63 Aa	0.63 $\pm$ 3.50 Aa	0.392
	90 dias	1.00 $\pm$ 1.00 Aa	0.79 $\pm$ 1.83 Aa	0.096
	180 dias	1.00 $\pm$ 1.00 Aa	0.79 $\pm$ 1.83 Aa	0.537
IL-8	Baseline	192.90 $\pm$ 230.03 Ab	235.89 $\pm$ 431.34 Aa	0.003*
	30 dias	157.75 $\pm$ 568.80 Ba	178.89 $\pm$ 568.80 Aa	0.764
	90 dias	86.27 $\pm$ 224.32 Aa	132.29 $\pm$ 554.67 Ba	0.376
	180 dias	86.27 $\pm$ 224.32 Aba	132.29 $\pm$ 554.67 Aba	0.788
TNF- α	Baseline	10.01 $\pm$ 2.02 Aa	8.15 $\pm$ 18.61 Aa	0.194
	30 dias	6.12 $\pm$ 1.28 Aa	14.05 $\pm$ 4.37 Aa	0.311
	90 dias	3.02 $\pm$ 3.02 Aa	7.05 $\pm$ 16.83 Aa	0.558
	180 dias	3.02 $\pm$ 3.02 Aa	7.05 $\pm$ 16.83 Aa	0.547

Legenda: Teste de Fridman/Tukey, letras minúsculas na horizontal (a) diferenças estatísticas significantes intergrupos e teste Mann Whiteny, letras maiúsculas na vertical (A) diferenças estatísticas significantes intragrupos. P<0,05.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Um dos mecanismos de ação dos probióticos está associado à modulação da formação do biofilme, pois a bactéria probiótica possui maior capacidade de adesão aos tecidos bucais quando comparados com os periodontopatógenos, formando um “novo” biofilme (Seminario-Amez et al., 2017). Dessa forma, o presente estudo avaliou o efeito probiótico *L. reuteri* como terapia coadjuvante no tratamento periodontal, envolvendo pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2. Além da análise dos parâmetros clínicos periodontais, foram realizadas dosagens de citocinas presentes no fluido crevicular gengival.

Os dados demográficos do presente estudo indicam que no grupo RAR+Probi a média de idade dos participantes foi estatisticamente maior (63.8 ± 9.4) em relação ao grupo RAR+Placebo (54.3 ± 10.2), com $p=0.004$. Para ambos os grupos, a média de número de dentes foi semelhante, sendo (22.3 ± 4.5) para RAR+Placebo e (22.0 ± 4.8) para RAR+Probi. Os participantes do gênero masculino nos grupos RAR+Placebo e RAR+Probi foram de 30% e 40%, respectivamente.

Os resultados clínicos desta pesquisa mostram redução significativa ($p<0.05$) de IG após 30 dias em ambos os grupos, porém sem diferenças estatísticas intergrupo durante o período de acompanhamento. Isso se deve a terapia inicial de adequação bucal e ao próprio tratamento periodontal em si, melhorando os níveis inflamatórios dos sítios periodontais. Reduções significativas no IP só se observam aos 180 dias em ambos os grupos, mas também sem diferenças estatísticas entre RAR+Probi e RAR+Placebo. A revisão sistemática conduzida por Seminario-Amez et al. (2017) relata que o uso do probiótico pode melhorar os IG, mas não interfere no IP. Isso ocorre porque o efeito do probiótico parece estar mais associado a resposta imune do hospedeiro

do que com a ação dos patógenos periodontais. Ince et al. (2015), Tekce et al. (2015) e Vicario et al. (2013) e encontraram efeitos positivos do *L. reuteri* na redução do IP e IG. Em contrapartida, outros estudos que avaliaram o efeito do *L. reuteri* na gengivite, não encontraram diferenças no IP e no IG entre o grupo controle e o teste (Hallström et al., 2013; Iniesta et al., 2012; Szkaradkiewicz et al., 2014; Twetman et al., 2009). Kraft-Bodi et al. (2015) através de um estudo clínico avaliaram o efeito do *L. reuteri* no IP e no IG de pacientes que utilizaram pastilhas com o probiótico versus um grupo placebo. Os resultados mostraram que em relação a IP e IG não houve diferenças entre os grupos, porém o grupo probiótico mostrou redução na prevalência de *Candida* oral quando comparado com o controle.

Em relação a P.S., observa-se redução das medidas no grupo RAR+Probi a partir do tempo 180 dias, e no grupo RAR+Placebo, a partir do tempo 90 dias. Na comparação entre os dois grupos não houve diferença significativa nos índices de P.S. durante todo o tempo do estudo. Este resultado demonstra que o tratamento periodontal foi capaz de reduzir as medidas de profundidade de sondagem, mas não evidencia o efeito do uso do probiótico *L. reuteri* como coadjuvante na terapia periodontal. Contrariamente, estudos utilizando o *L. reuteri* em comparação com placebos encontraram melhora nos parâmetros de P.S. e NIC em portadores de periodontite (Ince et al., 2015; Szkaradkiewicz et al., 2014; Tekce et al., 2015; Teughels et al., 2013; Vicario et al., 2013; Vivekananda et al., 2010).

Para os dois grupos avaliados neste estudo, a terapia periodontal utilizada proporcionou melhora nos parâmetros clínicos tanto de bolsas moderadas (5 e 6mm) como de bolsas profundas (>7mm), conforme demonstrado na tabela 3. O grupo RAR+Placebo exibiu maiores índices de P.S.>7mm e maior quantidade de sítios com bolsas profundas iniciais, quando comparado com o grupo RAR+Probi, o que pode ser reflexo da falta de

homogeneidade entre os grupos em relação a estes parâmetros no baseline. Na análise de estratificação das bolsas periodontais, observa-se que o uso do probiótico *L. reuteri* não produziu efeitos adicionais no tratamento periodontal quando comparado com o placebo.

Quando se analisa os resultados para PISA, nota-se que os valores reduziram significativamente e progressivamente ao longo dos 180 dias, em ambos os grupos. Aqui também não se pode inferir que o uso do probiótico trouxe efeitos adicionais ao grupo RAR+Probi. Na literatura, não foram encontrados estudos preliminares avaliando o índice PISA associado a terapia com probióticos como coadjuvante no tratamento periodontal.

Em relação aos efeitos adversos, os resultados do presente estudo indicam que tanto o uso do probiótico como o do placebo causam efeitos adversos nos pacientes, conforme relatado em estudos anteriores (Iniesta et al., 2012; Vicario et al., 2013). Ince et al. (2015), Twetman et al. (2009) e Vivekananda et. (2010) não encontraram efeitos adversos com o uso do *L. reuteri* ou placebo.

A análise dos resultados obtidos no questionário OHIP indica que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas avaliações intragrupo, tanto para RAR+Placebo, quanto para RAR+Probi, indicando que os participantes não relataram diferença na qualidade de vida após o tratamento recebido. Quanto a avaliação intergrupo, também não se observou diferenças significantes entre os grupos, indicando que as duas abordagens de terapia (placebo e probiótico) não interferiu na qualidade de vida dos pacientes.

A atividade de citocinas pró-inflamatórias detectada no fluido crevicular gengival de pacientes diabéticos pode estar relacionada a exacerbação da doença periodontal nesses pacientes (Glurich, Acharya, 2019). Os probióticos demonstram efetividade em diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, collagenases, elastases e prostaglandinas (Seminario-Amez et al., 2017). Sendo

assim, os probióticos podem auxiliar a resposta inflamatória do hospedeiro, pela modulação da concentração de citocinas. Neste estudo foi realizada a dosagem das seguintes citocinas do fluido crevicular gengival: INF- γ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α .

Na análise das citocinas, observa-se que apenas IL-8 exibe níveis estatisticamente maiores no grupo RAR+Placebo no baseline, enquanto as demais citocinas mostram níveis homogêneos iniciais. Observa-se que a terapia periodontal, com o uso ou não do adjuvante probiótico *L. reuteri*, não interferiu nas dosagens das citocinas IL-13, IL-6 e TNF- α durante todos os tempos avaliados, tanto nas avaliações intragrupo, como intergrupo.

Ao longo do tempo, no grupo RAR+Probi, os valores de INF- γ , IL-4, IL-8 mostraram diminuição, enquanto IL-12 e IL-1 β exibiram um aumento, corroborando com os resultados obtidos por Twetman et al. (2009). Já no grupo RAR+Placebo, IL-10 e IL-8 mostraram uma diminuição após o tratamento periodontal, enquanto que IL-12, um aumento. O estudo conduzido por Twetman et al. (2009) realizado com o probiótico *L. reuteri* mostrou uma diminuição significativa ($p < 0.05$) nos níveis de TNF- α e IL-8, mas não conseguiu detectar os marcadores de IL-6 e IL-10 nas amostras de fluido crevicular gengival. Szkaradkiewicz et al. (2014) encontraram significante redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β em pacientes do grupo probiótico, quando comparado com administração de placebo. Em contrapartida, um aumento na concentração de IL-1 β e diminuição de IL-8 durante o uso do probiótico foram os achados do estudo de Hallström et al. (2013). Os resultados do presente estudo demonstram que a terapia periodontal e/ou o efeito do probiótico influencia na dinâmica das citocinas presentes no fluido gengival de portadores de doenças periodontais.

Como limitação deste estudo pode-se citar a ausência de análises microbiológicas, as quais seriam essenciais para validação do efeito do

probiótico na terapia periodontal, já que o biofilme subgengival de diabéticos apresenta maior quantidade de microrganismos do complexo vermelho quando comparado com pacientes normoglicêmicos, indicando a importância da administração de um medicamento coadjuvante (Aemaimanan et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e considerando a metodologia utilizada no presente estudo, pode-se concluir que o debridamento periodontal promove melhora nos parâmetros clínicos periodontais em portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, mas o uso do probiótico não foi eficiente para resultados adicionais quando comparado com o placebo. A terapia periodontal interferiu nos níveis de citocinas do FCG, porém não se pode afirmar que o uso de probiótico apresenta o mesmo efeito.

REFERÊNCIAS*

- Aemaimanan P, Amimanan P, Taweetchaisupapong S. Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis. *Anaerobe*. 2013 Aug;22:64-8. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.06.010.
- Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV. Effect of scaling and root planing on serum interleukin-10 levels and glycemic control in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol*. 2015 Mar-Apr;19(2):188-93. doi: 10.4103/0972-124X.148644. PMID: 26015670; PMCID: PMC4439629.
- Aykol G, Baser U, Maden I, Kazak Z, Onan U, Tanrikulu-Kucuk S, et al. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol*. 2011;82:481-8. doi: 10.1902/jop.2010.100195.
- Bascones-Martinez A, Matesanz-Perez P, Escribano-Bermejo M, González-Moles MÁ, Bascones-Ilundain J, Meurman JH. Periodontal disease and diabetes- Review of the Literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Sep;16(6):e722-9. doi:10.4317/medoral.17032.
- Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology* 2000. 2011;55:36–47. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x.
- Bogdan M, Meca AD, Boldeanu MV, Gheorghe DN, Turcu-Stiolica A, Subtirelu MS, et al. Possible involvement of vitamin c in periodontal disease-diabetes mellitus association. *Nutrients*. 2020 Feb 20;12(2):553. doi: 10.3390/nu12020553.
- Borgnakke WS, Ylöstalo PV, Taylor GW, Genco RJ. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4 Suppl):S135-52. doi: 10.1902/jop.2013.1340013.
- Bower RC. Furcation morphology relative to periodontal treatment. Furcation root surface anatomy. *J Periodontol* 1979;50:366–74. doi: 10.1902/jop.1979.50.7.366.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Brayer WK, Mellonig JT, Dunlap RM, Marinak KW, Carson RE. Scaling and root planing effectiveness: the effect of root surface access and operator experience. *J Periodontol.* 1989;60:67–72. doi: 10.1902/jop.1989.60.1.67.

Bron PA, van Baarlen P, Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Nov 21;10(1):66-78. doi: 10.1038/nrmicro2690. PMID: 22101918.

Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr Clin Care.* 2004 Apr-Jun;7(2):56-68. PMID: 15481739; PMCID: PMC1482314.

Brugués A, Bromuri S, Barry M, Del Toro ÓJ, Mazurkiewicz MR, Kardas P, et al. Processing diabetes mellitus composite events in MAGPIE. *J Med Syst.* 2016 Feb;40(2):44. doi: 10.1007/s10916-015-0377-1. Epub 2015 Nov 21. PMID: 26590982.

Cervino G, Terranova A, Briguglio F, De Stefano R, Famà F, D'Amico C, et al. Diabetes: oral health related quality of life and oral alterations. *Biomed Res Int.* 2019 Mar 18;2019:5907195. doi: 10.1155/2019/5907195.

Claffey N, Polyzois I, Ziaka P. An overview of nonsurgical and surgical therapy. *Periodontology 2000.* 2004;36:35-44. doi: 10.1111/j.1600-0757.2004.00073.x.

Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, Gardy JL, Chikatamarla A, Gellatly S, et al. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun.* 2008 Sep;76(9):4163-75. doi: 10.1128/IAI.00188-08.

Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol 2000.* 2013 Feb;61(1):16-53. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00397.x. PMID: 23240942.

Dhingra K. Methodological issues in randomized trials assessing probiotics for periodontal treatment. *J Periodontal Res.* 2012 Feb;47(1):15-26. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01399.x. Epub 2011 Jul 21. PMID: 21777405.

Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Feb; 11(2):98-107. doi: 10.1038/nri2925.

Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, et al. Atherosclerosis risk in communities study. Low-grade systemic inflammation

and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2003 Jul; 52(7):1799-805. doi.org/10.2337/diabetes.52.7.1799.

Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis—a comprehensive review. *J Clin Periodontol* 2017;44:S94–S105. doi: 10.1111/jcpe.12677.

Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4):556-65. doi: 10.1902/jop.2012.120163.

Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2014 Oct;49(5):584-94. doi: 10.1111/jre.12138.

Glurich I, Acharya A. Updates from the evidence base examining association between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: current status and clinical relevance. *Curr Diab Rep*. 2019 Nov 6;19(11):121. doi: 10.1007/s11892-019-1228-0.

Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS, Kent R, Teles R, Hasturk H, et al. Control of periodontal infections: a randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. *J Clin Periodontol*. 2012 Jun;39(6):526-36. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01870.x.

Grellmann AP, Sfreddo CS, Maier J, Lenzi TL, Zanatta FB. Systemic antimicrobials adjuvant to periodontal therapy in diabetic subjects: a meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016 Mar;43(3):250-60. doi: 10.1111/jcpe.12514.

Guarnelli ME, Farina R, Cucchi A, Trombelli L. Clinical and microbiological effects of mechanical instrumentation and local antimicrobials during periodontal supportive therapy in aggressive periodontitis patients: smoker versus non-smoker patients. *J Clin Periodontol*. 2010 Nov;37(11):998-1004. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01623.x.

Hallström H, Lindgren S, Yucel-Lindberg T, Dahlén G, Renvert S, Twetman S. Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during

experimental gingivitis. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):828-33. doi: 10.3109/00016357.2012.734406.

Harini PM, Anegundi RT. Efficacy of a probiotic and chlorhexidine mouth rinses: a short-term clinical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2010 Jul-Sep;28(3):179-82. doi: 10.4103/0970-4388.73799. PMID: 21157050.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec;444(7121):860-7. doi: 10.1038/nature05485.

Ince G, Gürsoy H, Ipçi SD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yilmaz S. Clinical and biochemical evaluation of lozenges containing *Lactobacillus reuteri* as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2015;86:746-54. doi: 10.1902/jop.2015.140612.

Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbriggen M, Matos AR, Marín MJ, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2012 Aug;39(8):736-44. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01914.x.

Jayaram P, Chatterjee A, Raghunathan V. Probiotics in the treatment of periodontal disease: A systematic review. *J Indian Soc Periodontol*. 2016 Sep-Oct;20(5):488-495. doi: 10.4103/0972-124X.207053.

Jones SE, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol*. 2009 Feb 11;9:35. doi: 10.1186/1471-2180-9-35.

Khanuja PK, Narula SC, Rajput R, Sharma RK, Tewari S. Association of periodontal disease with glycemic control in patients with type 2 diabetes in Indian population. *Front Med*. 2017 Mar;11(1):110-9. doi: 10.1007/s11684-016-0484-5.

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 Mar;32(3):266-72. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00658.x

Kolb H, Mandrup-Poulsen T. An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia*. 2005 Jun;48(6):1038-50. doi: 10.1007/s00125-005-1764-9. Epub

2005 Apr 30. Erratum in: *Diabetologia*. 2005 Aug;48(8):1677. PMID: 15864529.

Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Dec;20(6):354-61. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00239.x.

Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol*. 2011 Feb;38(2):142-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01652.x.

Kraft-Bodi E, Jørgensen MR, Keller MK, Kragelund C, Twetman S. Effect of Probiotic Bacteria on Oral Candida in Frail Elderly. *J Dent Res*. 2015 Sep;94(9 Suppl):181S-6S. doi: 10.1177/0022034515595950.

Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J*. 2006;30(2):55-60.

Li C, Liu J, Tan L, Yu N, Lin L, Geng F, et al. The sociodemographic characteristics, periodontal health status, and subgingivalmicrobiota of patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: a case-control study in a Chinese population. *J Periodontol*. 2013 Aug;84(8):1058-66. doi: 10.1902/jop.2012.120282.

Marsh P, Martin MV. *Oral Microbiology*. 4th ed. Oxford: Wright; 1999.

Matsuoka T, Sugano N, Takigawa S, Takane M, Yoshinuma N, ITO K et al. Effect of oral *Lactobacillus salivarius* TI2711 (LS1) administration on periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque. *J JPN Assoc Periodontol*. 2006;48:315-24. doi: 10.2329/perio.48.315

Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, Hirata H, Sakamoto M, Benno Y, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009 Jun;36(6):506-13. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01392.x.

Miranda TS, Feres M, Retamal-Valdés B, Perez-Chaparro PJ, Maciel SS, Duarte PM. Influence of glycemic control on the levels of subgingival periodontal pathogens in patients with generalized chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Appl Oral Sci.* 2017 Jan Feb;25(1):82-9. doi: 10.1590/1678 77572016-0302.

Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ.* 2010 Mar 23;340:c869. doi: 10.1136/bmj.c869. PMID: 20332511; PMCID: PMC2844943.

Morettini M, Storm F, Sacchetti M, Cappozzo A, Mazzà C. Effects of walking on low-grade inflammation and their implications for Type 2 Diabetes. *Prev Med Rep.* 2015 Jun 16;2:538-47. doi: 10.1016/j.pmedr.2015.06.012.

Nesse W, Abbas F, van der Ploeg I, Spijkervet FK, Dijkstra PU, Vissink A. Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *J Clin Periodontol.* 2008 Aug;35(8):668-73. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01249.x.

Nguyen ATM, Akhter R, Garde S, Scott C, Twigg SM, Colagiuri S, et al. The association of periodontal disease with the complications of diabetes mellitus. A systematic review. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020 Jul;165:108244. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108244.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001 Jul18;286(3):327-34. doi:10.1001/jama.286.3.327.

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 2012;55(1):21–31. doi: 10.1007/s00125-011-2342-y.

Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trinchieri V, Amicosante G, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis.* 2007 Jul;13(4):376-85. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x.

Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S, Black RE. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis.* 2006 Jun;6(6):374-82. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70495-9.

Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, et al. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*. 1999 May 15;353(9165):1649-52. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01046-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01046-6).

Seminario-Amez M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017 May 1;22(3):e282-e8. doi: 10.4317/medoral.21494.

Shah MP, Gujjari SK, Chandrasekhar VS. Evaluation of the effect of probiotic (inersan®) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. *J Clin Diagn Res*. 2013 Mar;7(3):595-600. doi: 10.7860/JCDR/2013/5225.2834.

Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):897-905. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01306.x.

Singh S, Kumar V, Kumar S, Subbappa A. The effect of periodontal therapy on the improvement of glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled clinical trial. *Int J Diabetes DevCtries* 2008; 28:38–44. doi: 10.1186/s13063-015-0810-2

Slawik S, Staufienbiel I, Schilke R, Nicksch S, Weinspach K, Stiesch M, et al. Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. *Eur J Clin Nutr*. 2011 Jul;65(7):857-63. doi: 10.1038/ejcn.2011.45.

Sliepen I, Van Damme J, Van Essche M, Loozen G, Quirynen M, Teughels W. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):1026-30. doi: 10.1177/0022034509347296.

Slots J, Rams TE. New views on periodontal microbiota in special patient categories. *J Clin Periodontol*. 1991 Jul;18(6):411-20. doi: 10.1111/j.1600-051x.1991.tb02309.x.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992 Apr;63(4 Suppl):322-31. doi: 10.1902/jop.1992.63.4s.322. PMID: 1573546.

Staab B, Eick S, Knöfler G, Jentsch H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J Clin Periodontol*. 2009 Oct;36(10):850-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01459.x.

Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2009;51:141-51. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00305.x.

Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpiński TM. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014 Dec;62(6):495-500. doi: 10.1007/s00005-014-0277-y.

Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, et al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with noninsulin- dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1996; 67:1085e93. doi: 10.1902/jop.1996.67.10s.1085.

Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanism sthatmay link periodontitis and diabetes. *J ClinPeriodontol*. 2013;40 (Suppl 14):S113–S34. doi: 10.1111/jcpe.12059.

Tekce M, Ince G, Gursoy H, Dirikan Ipci S, Cakar G, Kadir T, et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr;42(4):363-72. doi: 10.1111/jcpe.12387.

Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2013 Nov;40(11):1025-35. doi: 10.1111/jcpe.12155.

Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:159-77. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01665.x.

Tsubura S, Mizunuma H, Ishikawa S, Oyake I, Okabayashi M, Katoh K, et al. The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Nov;28(11):1353-6. doi: 10.1007/s10096-009-0790-9.

Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksen-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(1):19-24. doi: 10.1080/00016350802516170.

Vicario M, Santos A, Violant D, Nart J, Giner L. Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):813-9. doi: 10.3109/00016357.2012.734404.

Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. *Lactobacillus reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol*. 2010 Nov;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5344. doi: 10.3402/jom.v2i0.5344.

Wennström JL, Tomasi C, Bertelle A, Dellasega E. Full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant scaling and root planing as an initial approach in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Aug;32(8):851-9. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00776.x.

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. doi: 10.1111/j.1600-051X.1996.tb00540.x.

Wolff L, Dahlén G, Aepli D. Bacteria as Risk Markers for Periodontitis. *J Periodontol*. 1994 May;65 Suppl 5S:498-510. doi: 10.1902/jop.1994.65.5s.498. PMID: 29539763.

Zhang G, Chen R, Rudney JD. *Streptococcus cristatus* attenuates *Fusobacterium nucleatum*-induced interleukin-8 expression in oral epithelial cells. *J Periodontal Res*. 2008 Aug;43(4):408-16. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01057.x.

APÊNCIDE A – Questionário OHIP

Quantas vezes você tem os seguintes problemas por causa da sua condição bucal?	Sempre	Quase sempre	Às vezes	Quase nunca	Nunca
Inabilidade física					
1. Você teve problemas para falar algumas palavras por causa da boca ou dentes?					
2. Você sentiu que o sabor dos alimentos ficou pior por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
Dor física					
3. Você sentiu dores em sua boca ou nos seus dentes?					
4. Você se sentiu incomodado ao comer algum alimento por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
Desconforto psicológico					
5. Você ficou preocupado por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
6. Você se sentiu estressado por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
Limitação funcional					
7. Sua alimentação ficou prejudicada por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
8. Você teve que parar suas refeições por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
Inabilidade psicológica					
9. Você encontrou dificuldade para relaxar por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
10. Você sentiu-se envergonhado por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
Inabilidade social					
11. Você ficou irritado com outras pessoas por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
12. Você teve dificuldades em realizar suas atividades diárias por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
Incapacidade					
13. Você sentiu que a vida, em geral, ficou pior por causa de problemas com sua boca ou dentes?					
14. Você ficou totalmente incapaz de fazer suas atividades diárias por causa de problemas com sua boca ou dentes?					

APÊNCIDE B- Formulário sobre reações adversas

FORMULÁRIO DE REAÇÕES ADVERSAS (baseado em Martys, 1982)

Paciente:

DATA:		
Nos últimos 3 dias, você:	SIM	NÃO
Teve dor de cabeça?		
Teve dor de estômago?		
Teve náusea ou vomitou?		
Sentiu gosto metálico na boca?		
Teve diarreia ou dor abdominal?		
Sentiu-se sonolento?		
Teve coceira na pele?		
Notou feridas na pele?		

DATA:		
Nos últimos 7 dias, você:	SIM	NÃO
Teve dor de cabeça?		
Teve dor de estômago?		
Teve náusea ou vomitou?		
Sentiu gosto metálico na boca?		
Teve diarreia ou dor abdominal?		
Sentiu-se sonolento?		
Teve coceira na pele?		
Notou feridas na pele?		

DATA:		
Nos últimos 14 dias, você:	SIM	NÃO
Teve dor de cabeça?		
Teve dor de estômago?		
Teve náusea ou vomitou?		
Sentiu gosto metálico na boca?		
Teve diarreia ou dor abdominal?		
Sentiu-se sonolento?		
Teve coceira na pele?		
Notou feridas na pele?		

DATA:		
Nos últimos 21 dias, você:	SIM	NÃO
Teve dor de cabeça?		
Teve dor de estômago?		
Teve náusea ou vomitou?		
Sentiu gosto metálico na boca?		
Teve diarreia ou dor abdominal?		
Sentiu-se sonolento?		
Teve coceira na pele?		
Notou feridas na pele?		

ANEXO A- Certificado do comitê de ética

UNESP - INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS 			
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP			
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: Efeito da terapia probiótica (<i>Lactobacillus reuteri</i>) coadjuvante no tratamento da periodontite crônica associada ao Diabetes Mellitus. Estudo clínico, controlado e randomizado. Pesquisador: Juliana de Fátima Pedroso Área Temática: Versão: 1 CAAE: 90375518.8.0000.0077 Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 2.708.923 Apresentação do Projeto: O Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito da terapia probiótica (<i>Lactobacillus reuteri</i>) coadjuvante no tratamento da periodontite crônica associada ao Diabetes Mellitus: estudo clínico, controlado e randomizado" está adequadamente apresentado, contemplando a estrutura pré-textual, textual e pós-textual. Título e resumo pertinente com objetivo da pesquisa. Estão adequadamente apresentados em texto, o conteúdo introdutório, o objetivo, material e métodos. Apresenta suporte teórico e dados de pesquisas atualizados com justificativas plausíveis quanto a promoção de benefícios sociais e científicos. Demonstrou com clareza o problema sobre o qual a pesquisa e seus resultados pretendem ajudar a resolver. O problema descrito é que o procedimento de padrão-ouro para combater o biofilme dentário não funciona tão suficientemente em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, principalmente em áreas de difícil acesso ao debridamento mecânico (bolsas periodontais profundas). Assim, a proposta é testar um procedimento a partir de probióticos, que pode ser mais eficiente na regeneração do tecido de suporte ao dente (obter microbiota mais compatível com periodonto saudável). Argumentou que outras terapias associadas à convencional acarretam riscos, pois reduzem ou eliminam microrganismos benéficos nos tecidos periodontais. Neste contexto, propor tratamento de probióticos associado a debridamento radicular tem se tomado comum, mas há pouco conhecimento sobre isso em pessoas com diabetes mellitus tipo 2. Há sugestão de que probióticos modulam respostas inflamatórias, o que			
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;"> Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777 Bairro: Jardim São Dimas UF: SP Telefone: (12)3947-9079 </td> <td style="padding: 5px; text-align: center;"> CEP: 12.245-000 Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS Fax: (12)3947-9010 </td> <td style="padding: 5px;"> E-mail: cep@fotops.unesp.br </td> </tr> </table>	Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777 Bairro: Jardim São Dimas UF: SP Telefone: (12)3947-9079	CEP: 12.245-000 Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS Fax: (12)3947-9010	E-mail: cep@fotops.unesp.br
Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777 Bairro: Jardim São Dimas UF: SP Telefone: (12)3947-9079	CEP: 12.245-000 Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS Fax: (12)3947-9010	E-mail: cep@fotops.unesp.br	

Página 01 de 04