

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia

IZADORA CIANFA FIRMINO DA SILVEIRA

**Efeitos Imunológicos da Terapia Probiótica com *Bifidobacterium animalis*
subsp. *lactis* HN019 no Tratamento da Periodontite em Pacientes Portadores
de Diabetes Mellitus Tipo 2**

Ribeirão Preto - SP
2024

IZADORA CIANFA FIRMINO DA SILVEIRA

**Efeitos Imunológicos da Terapia Probiótica com *Bifidobacterium animalis*
subsp. *lactis* HN019 no Tratamento da Periodontite em Pacientes Portadores
de Diabetes Mellitus Tipo 2**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto,
como requisito parcial à obtenção do título de
Cirurgião Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Aparecida
Chaves Furlaneto Messora

Ribeirão Preto – SP
2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar todas as oportunidades que me fizeram chegar até aqui e força para realizar esse sonho.

A Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto por me proporcionar momentos incríveis e maravilhosos durante minha jornada.

Ao meu irmão José Pedro (in memoriam) que sempre foi uma fonte de inspiração e apoio durante minha jornada. Você faz falta aqui, mas sei que está orgulhoso de mim.

Aos meus pais, Aparecido e Luciana por seu apoio e sacrifício constante, carinho, cuidado e amor. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu irmão Matheus, à minha cunhada Laila, aos meus avós Aparecido, Ivalda, José Pedro e Ana Maria. Às minhas tias Fabiana e Adriana e a todos os familiares que me apoiaram e ajudaram a realizar meu sonho de me formar em Odontologia pela FORP-USP.

Ao meu amor, Vinícius, que sempre me encorajou e me apoiou constantemente. Você tem sido minha fortaleza.

A minha orientadora, Flávia Furlaneto por todas oportunidades, dedicação e apoio. Você é uma inspiração para mim!

A minha dupla de faculdade, Alisson, agradeço por todos os momentos que passamos juntos, por seu cuidado comigo, por todos os aprendizados e por nossa evolução. Tenho orgulho do que nos tornamos. Meus dias não serão os mesmos sem você.

Aos meus queridos amigos, Alisson, Laura, Caroline, Luanna, Lucas, Maria Eduarda. Vocês conseguiram deixar os dias mais leves. Obrigada por toda ajuda ao longo do curso, por me apoiarem e me ajudarem quando precisei. Vocês foram essenciais em minha jornada. Que continuemos assim.

Às pós-graduandas mais maravilhosas da FORP-USP, Débora e Ana Carolina. Vocês são inspiração para mim, só tenho a agradecer por toda ajuda. Vocês foram e são essenciais.

Ao CNPq pelo fornecimento das bolsas e pela possibilidade de desenvolver meus projetos de pesquisa.

RESUMO

A Periodontite (PE) é uma doença crônica inflamatória multifatorial que afeta os tecidos de suporte dos dentes e está relacionada à microbiota subgengival e a fatores imuno inflamatórios do indivíduo. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico complexo e multifatorial, e alguns dos fatores contribuintes para seu agravamento são o estilo de vida do paciente, dieta, genética, obesidade e idade. Um dos fatores de risco para a PE é o DM2 não controlado, a presença e a PE também pode contribuir para a dificuldade de controle glicêmico em pacientes diabéticos. Probióticos têm sido considerados uma terapia adjunta tanto no manejo da PE como na regulação de fatores glicêmicos em pacientes diabéticos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da administração oral da cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (*B. lactis* HN019), como adjunto à raspagem e alisamento radicular (RAR), em marcadores da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes portadores de DM2 e PE estágio III graus B ou C generalizada. Trinta e oito pacientes foram randomizados nos grupos: Probiótico (PROB, n = 19; pacientes tratados com RAR associada ao uso de pastilhas probióticas) e Controle (C, n = 19; pacientes tratados com RAR associada ao uso de pastilhas placebo). No baseline (T0), os pacientes foram submetidos a RAR e receberam a orientação de consumirem as pastilhas 2 vezes ao dia, durante 3 meses (T3). Nos períodos T0 e T3, as amostras de FCG foram coletadas e analisadas por meio de imunoensaios enzimáticos (Luminex®/MAGpix technology, Austin, TX, Estados Unidos). Os dados foram estatisticamente analisados (Shapiro-Wilk, Wilcoxon, $p < 0,05$). Não houve diferenças significativas nas comparações intragrupo, entre os tempos T0 e T3, das razões IL-1 β /IL-10, IL-1 β /IL-4, TNF- α /IL-4 e IL-17A/IL-4 ($p > 0,05$). Ambos os grupos apresentaram redução significativa, entre os tempos T0 e T3, nas razões IL-6/IL-4 e IL-6/IFN- γ ($p < 0,05$). Somente o grupo PROB apresentou redução significativa, após 3 meses, na razão IL-1 β /IFN- γ ($p < 0,05$). Dentro das limitações do presente estudo, pode-se concluir que a RAR promoveu alterações em alguns marcadores imuno-inflamatórios do FCG, e o uso adjuvante do probiótico *B. lactis* HN019 levou a mudanças adicionais, em indivíduos portadores de DM2 e periodontite.

ABSTRACT

Periodontitis (PE) is a chronic multifactorial inflammatory disease that affects the supporting tissues of the teeth and is related to the individuals subgingival microbiota and immuneinflammatory factors. Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a complex and multifactorial metabolic disorder, and some of the factors contributing to its worsening are the patient's lifestyle, diet, genetics, obesity and age. One of the risk factors for PE is uncontrolled DM2, and the presence of PE can also contribute to the difficulty of glycemic control in diabetic patients. Probiotics have been considered an adjunct therapy both in the management of PE and in the regulation of glycemic factors in diabetic patients. The aim of this study was to evaluate the effects of oral administration of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (*B. lactis* HN019), as an adjunct to scaling and root planing (SRP), on markers of the host immunoinflammatory response in the gingival crevicular fluid (GCF) of patients with DM2 and generalized stage III PE grades B or C. Thirty-eight patients were randomized into groups: Probiotic (PROB, n = 19; patients treated with SRP associated with the use of probiotic lozenges) and Control (C, n = 19; patients treated with SRP associated with the use of placebo lozenges). At baseline (T0), the patients underwent SRP and were instructed to consume the lozenges twice a day for 3 months (T3). At T0 and T3, GCF samples were collected and analyzed using enzyme immunoassays (Luminex®/MAGpix technology, Austin, TX, United States). The data was statistically analyzed (Shapiro-Wilk, Wilcoxon, $p < 0.05$). There were no significant differences in intra-group comparisons between times T0 and T3 in the IL-1 β /IL-10, IL-1 β /IL-4, TNF- α /IL-4 and IL-17A/IL-4 ratios ($p > 0.05$). Both groups showed a significant reduction between T0 and T3 in the IL-6/IL-4 and IL-6/IFN- γ ratios ($p < 0.05$). Only the PROB group showed a significant reduction in the IL-1 β /IFN- γ ratio after 3 months ($p < 0.05$). Within the limitations of the present study, it can be concluded that SRP promoted changes in some immunoinflammatory markers of GCF, and the adjuvant use of the probiotic *B. lactis* HN019 led to additional changes in individuals with DM2 and periodontitis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Submissão do projeto de pesquisa.....	15
3.2 Cálculo do tamanho da amostra e população do estudo.....	15
3.3 Adequação do Meio Bucal, Exame Clínico Periodontal e Randomização.....	16
3.4 Calibração e Cegamento dos Examinadores.....	17
3.5 Raspagem e Alisamento Radicular e Administração de Pastilhas Placebo ou Contendo Probiótico.....	17
3.6 Monitoramento imunológico.....	18
3.7 Análise Estatística.....	19
4. RESULTADOS.....	20
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A periodontite (PE) é uma doença inflamatória crônica que leva à perda dos tecidos que suportam as unidades dentárias. A PE é uma condição altamente prevalente e estima-se que 10 a 15% da população mundial seja afetada por formas avançadas da doença¹. Atualmente, a PE é uma preocupação significativa da saúde pública, devido ao seu papel na patogênese de várias doenças com risco de vida, incluindo acidentes vasculares cerebrais e aterosclerose²⁻⁴.

A PE é resultante de uma complexa inter-relação entre a comunidade bacteriana residente em biofilme, a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e fatores ambientais modificadores⁵. De acordo com a “hipótese da placa ecológica”, que vem sendo amplamente aceita, a resposta do hospedeiro apresenta um papel-chave na patogênese da PE⁶. Na presença de uma resposta imunoinflamatória inapropriada, a microbiota comensal favorece a disbiose do biofilme, promovendo a presença de espécies bacterianas periodontopatogênicas e consequentemente aumentando o risco de destruição periodontal^{5,6}. Assim, fatores de risco sistêmicos e ambientais, como diabetes mellitus (DM) e tabagismo, bem como algumas características geneticamente transmitidas, podem alterar a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e, eventualmente, a suscetibilidade à PE⁷.

O DM é um distúrbio de componentes metabólicos e vasculares, caracterizado por hiperglicemia decorrente de defeitos na insulina ou alteração nos receptores celulares para insulina (resistência à insulina)⁸. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um dos principais problemas de saúde pública⁹, acometendo aproximadamente 9% da população global adulta, e representa uma das 10 principais causas de morte no mundo¹⁰. A natureza progressiva do DM2 e suas complicações envolve elevados custos tanto para o paciente como para a sociedade, e estima-se que essas despesas comprometem de 5 a 20% do total de gastos com a saúde na maioria dos países¹¹. Diversos fatores contribuem para o surgimento e desenvolvimento de complicações do DM, como genética, dieta, estilo de vida, idade e obesidade¹².

Tem sido demonstrado que a composição da microbiota intestinal influencia a permeabilidade intestinal, a inflamação e o metabolismo, e esses fatores estão relacionados à obesidade e a distúrbios associados, incluindo o DM2¹³⁻¹⁵. A disbiose do microbioma intestinal pode modular as funções da barreira da mucosa intestinal e assim influenciar vias metabólicas que estão relacionadas direta ou indiretamente à

resistência à insulina. Sabe-se que muitos metabólitos derivados de patógenos interagem com os receptores de células epiteliais intestinais, além de células hepáticas e cardíacas, os quais modulam a fisiologia do hospedeiro¹⁶.

Estima-se que o ser humano abriga aproximadamente 1014 microorganismos e que esse conjunto de micro-organismos, denominado microbioma humano, apresenta 10 vezes mais células do que todo o organismo humano¹⁷. Sabe-se que os micro-organismos apresentam papel fundamental para o desenvolvimento completo do sistema imunológico de um determinado organismo. Camundongos germ free são mais suscetíveis à infecção do que camundongos criados convencionalmente^{18,19}. Em animais germ free, a resposta imune TH2 é enviesada²⁰ e, após a restauração da microbiota intestinal desses animais, há um aumento de células TH1 e TH17 e redução das respostas do tipo TH2 aos níveis normais²⁰. É interessante observar também que o tratamento com antibióticos está associado ao aumento da colonização de patógenos em camundongos e humanos^{21,22}. Esses achados indicam o papel protetor que o microbioma desempenha no equilíbrio de respostas celulares e na manutenção da homeostase²³.

Conforme comentado previamente, o DM2 é um reconhecido fator de risco para a PE²⁴, afetando sua prevalência, incidência e gravidade²⁵. Por outro lado, a PE também pode influenciar o controle glicêmico, caracterizando uma relação bidirecional²⁴⁻²⁷. A relação entre DM e PE pode ser compreendida considerando dois principais pontos: inflamação sistêmica permanente e hiperglicemia. Os efeitos da hiperglicemia na saúde bucal podem ser atribuídos aos seguintes mecanismos patológicos²⁸: alteração patogênica da microbiota presente em bolsas periodontais, elevação dos níveis dos produtos finais de glicosilação avançada, destruição oxidativa não enzimática por metaloproteinases e indução de processos inflamatórios²⁹. Também, as infecções orais resultam em uma cascata de eventos que incluem o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação da síntese proteica de fase aguda, inflamação sistêmica de baixa intensidade e permanente e, por fim, resistência à insulina, resultando em aumento do risco de DM2³⁰. Assim, a alteração da resposta inflamatória sistêmica é observada tanto na PE quanto no DM2³¹. A PE pode, portanto, representar um fator contribuinte adicional para a inflamação sistêmica em pessoas com DM2 e vice-versa²⁸.

Nesse contexto, levando em consideração as limitações existentes na raspagem e alisamento radicular (RAR), têm sido propostas terapias adjuvantes para

potencializar os efeitos da terapia mecânica, especialmente para pacientes com PE avançada e com maior susceptibilidade à PE, como os pacientes diabéticos³²⁻³⁴. A antibioticoterapia sistêmica apresenta benefícios comprovados como adjuvante à RAR, mas os efeitos colaterais e a crescente preocupação mundial com a resistência bacteriana têm reforçado a necessidade de um uso mais restrito dessa terapia^{32,35-38}. Assim, têm sido buscadas outras alternativas de terapias adjuvantes, as quais não devem causar danos teciduais e, preferencialmente, devem proporcionar menor recolonização por periodontopatógenos após a fase do tratamento periodontal ativo^{5,39}. Dessa forma, essas terapias podem apresentar efeitos antimicrobianos e/ou imunomoduladores. A possibilidade de modular a resposta imunoinflamatória do hospedeiro pode ser de grande valia no tratamento periodontal, especialmente em pacientes com comprometimento sistêmico.

Dentre as terapias adjuvantes à RAR, têm sido investigados os efeitos dos probióticos, que são micro-organismos vivos, principalmente bactérias, seguros para o consumo e capazes de produzirem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades suficientes⁴⁰. Uma série de estudos tem examinado o efeito do uso de probióticos na prevenção e/ou tratamento de diversas condições e doenças, como infecções intestinais, infecções do trato respiratório, doenças cardiovasculares, osteoporose, infecções urogenitais, halitose, reações alérgicas, artrite reumatoide, cáries e doenças periodontais, dentre outras⁴¹.

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a ação dos probióticos na saúde geral⁴²⁻⁴⁴. Esses mecanismos relacionam-se com modulação imunológica, modulação dos mecanismos imunológicos intestinais, produção de mucinas, regulação negativa de respostas inflamatórias, secreção de substâncias antimicrobianas, competição com outras microbiotas, incluindo patógenos potenciais, por bloqueio competitivo de sítios de adesão em superfícies epiteliais e mucosas, inibição da invasão epitelial pela regulação da permeabilidade intestinal e estimulação da produção de imunoglobulinas⁴⁵.

Em relação aos mecanismos antimicrobianos de probióticos nas doenças periodontais, sabe-se que eles podem desencadear efeitos diretos sobre patógenos periodontais, afetando seu crescimento, adesão e colonização⁴⁶. Assim, o reequilíbrio da quantidade de bactérias benéficas bucais por meio do uso de probióticos pode representar uma estratégia interessante e pouco invasiva na prevenção e tratamento das doenças periodontais relacionadas ao biofilme. Outro mecanismo sugerido para

justificar os efeitos dos probióticos no tratamento das doenças periodontais refere-se à modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro⁴⁶. Alguns estudos têm demonstrado que determinadas espécies probióticas podem atenuar a expressão de IL-8 induzida por periodontopatógenos nas células epiteliais orais⁴⁷ e reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-17, IL-1 β e TNF- α), atividade de elastase de polimorfonucleares, níveis de mieloperoxidase e MMP-3 no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com doenças periodontais⁴⁸.

No entanto, os efeitos dos probióticos são dependentes da cepa, dose, frequência e via de administração utilizada⁴⁹. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) é uma cepa probiótica que faz parte da microbiota humana e apresenta uma relação simbiótica com o hospedeiro. É considerado um probiótico em potencial devido às suas propriedades imunomoduladoras^{50,51} e microbiológicas⁵². No que se refere aos efeitos no biofilme bucal⁵³, demonstraram que *B. lactis* pode sobreviver na saliva e se ligar à hidroxiapatita coberta por *F. nucleatum*⁵³. Esse achado pode ser um passo crítico para o sucesso da terapia periodontal, já que essa co-agregação pode reduzir o número de periodontopatógenos no biofilme oral. De fato, a mais importante função do *F. nucleatum* na biomassa bacteriana subgengival parece ser sua capacidade de facilitar a co-agregação de outros patógenos periodontais, como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*⁵⁴. Os efeitos da cepa *B. lactis* HN019 foi investigado em camundongos saudáveis, tendo sido demonstrado que a suplementação dietética com essa bactéria probiótica é capaz de melhorar a resposta imune inata e adquirida⁵⁰. Os achados de estudos realizados em humanos tratados com HN019 corroboram esses resultados imunológicos^{55,56}. O potencial da cepa HN019 na PE foi estudado em estudos pré-clínicos e clínicos do nosso grupo de pesquisa. Primeiramente, Oliveira e colaboradores (2017) administraram HN019 topicalmente em ratos com PE induzida por ligaduras. Nos animais tratados, os autores observaram significativa redução nas perdas óssea alveolar e de inserção do tecido conjuntivo, aumento da expressão de beta-defensinas (BDs) nos tecidos periodontais, níveis aumentados de citocinas anti-inflamatórias e mudanças na proporção de complexos microbianos presentes no biofilme oral, favorecendo espécies bacterianas compatíveis com saúde⁵⁷. Em outro estudo, foram avaliados os efeitos da administração oral de HN019 em associação à RAR em ratos com PE induzida por ligadura⁴⁹. Verificou-se que o probiótico potencializou os efeitos da terapia mecânica, pois influenciou positivamente o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e

quimioatraente de neutrófilos induzido por anti-citocina - CINC) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β 1), reduziu o número de osteoclastos, as perdas óssea alveolar e de inserção, a inflamação local e ainda favoreceu o reparo tecidual⁴⁹. Essa cepa também foi avaliada como adjuvante à RAR em um estudo clínico controlado randomizado, em indivíduos com PE crônica generalizada⁵⁸. O tratamento com a cepa probiótica, administrada oralmente, promoveu redução de profundidade sondagem e ganho de inserção clínica significativamente maiores que o grupo controle (RAR + placebo), bem como levou a menos sangramento à sondagem, menor índice de placa e maior redução de bolsas periodontais moderadas e profundas. A terapia também reduziu espécies microbianas dos complexos vermelho e laranja e promoveu aumento nas proporções de espécies microbianas do complexo azul. Em relação aos parâmetros imunológicos, a terapia probiótica levou à diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-8, promoveu aumento de IL-10 e levou à maior expressão de BD-3^{58,59}.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa finalizou o primeiro estudo clínico avaliando os efeitos da cepa *B. lactis* HN019, como adjuvante à raspagem supragengival, no tratamento da gengivite generalizada. Nesse ensaio, observamos que a administração oral da terapia probiótica, durante 8 semanas, potencializou os efeitos da raspagem. O grupo Teste apresentou valores significativamente reduzidos de sangramento à sondagem quando comparados ao grupo Controle após 8 semanas. Observou-se também que o grupo Teste apresentou níveis inferiores de IL-1 β , IL-1 α , e MCP-1 no FCG quando comparado ao grupo Controle⁶⁰.

Nesse contexto, é importante ressaltar que ainda há uma grande lacuna no que se refere ao entendimento completo dos mecanismos de ação dos probióticos no tratamento e prevenção das doenças periodontais, principalmente no que se refere à atuação dos mesmos na modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro. Como ocorrem mecanismos imunoinflamatórios similares, determinantes no processo de saúde-doença, nos tecidos periodontais e na mucosa intestinal, acredita-se que a ação imunoinflamatória dos probióticos na cavidade bucal seja análoga àquela descrita na mucosa intestinal⁴⁶. Na mucosa intestinal, estudos demonstraram que os probióticos podem: potencializar a imunidade do hospedeiro por meio de um aumento na expressão de BD⁶¹, reforçar a barreira epitelial intestinal aumentando a expressão de TLR²¹, reduzir a inflamação intestinal interferindo na expressão de células positivas para o Grupamento de Diferenciação (CD)-4, CD-8, CD-57 e foxhead box P3 (Foxp3)

ou na via do Fator Nuclear Kappa-beta^{62,63}, diminuir a produção de citocinas próinflamatórias (IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17, TNF- α , Interferon [INF]- γ , Proteína Quimiotática de Monócitos [MCP-1] e Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos [M-CSF])⁶⁴⁻⁶⁸ e aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e Fator de Crescimento Transformador [TGF]- β)⁶⁸⁻⁷⁰.

Com base no conhecimento existente, a partir dos estudos descritos, é evidente a importância de investigações acerca dos efeitos de cepas probióticas, especialmente do gênero *Bifidobacterium*, como uma potencial alternativa terapêutica para promover microbiomas compatíveis com saúde em indivíduos de alto risco para a PE, como os diabéticos⁷¹. No presente projeto de pesquisa, pretende se que a acadêmica realize as análises imunológicas, por meio de imunoensaios enzimáticos, das amostras de FCG dos indivíduos diabéticos tipo 2 com PE estágio III graus B ou C generalizada tratados com *B. lactis* HN019 ou placebo.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da administração oral da cepa probiótica *B. lactis* HN019, como adjuvante à RAR, em marcadores da resposta imunoinflamatória do hospedeiro, por meio de imunoensaios enzimáticos no fluido crevicular gengival de indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 e periodontite estágio III graus B ou C generalizada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Submissão do projeto de pesquisa

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão-Preto (CAAE: 26859719.2.0000.5419).

3.2 Cálculo do tamanho da amostra e população do estudo

O cálculo de tamanho amostral foi realizado pelo programa Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% para encontrar diferenças entre os grupos na análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi calculado considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão para a variável nível de inserção clínico entre os grupos teste e controle do estudo de Invernici et al. (2018), sendo o valor de α ajustado em 0,05. Para o cálculo do tamanho amostral, foi levada em consideração também a média de desistência de indivíduos em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (aproximadamente 20%). Dessa forma, chegou-se a um tamanho amostral adequado de 25 indivíduos para cada grupo experimental, sendo, portanto, 50 indivíduos.

Os indivíduos foram selecionados a partir da população que procura atendimento odontológico na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - FORP/USP. Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, incluindo os delineados na Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial (versão 2008) sobre experimentação envolvendo seres humanos, e requerimentos adicionais. Todos os indivíduos foram informados a respeito da natureza do estudo, bem como sobre riscos, desconfortos e benefícios potenciais de sua participação no mesmo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para serem incluídos na amostra, os indivíduos precisariam ter ≥ 18 anos de idade, pelo menos 15 dentes naturais, excluindo 3os molares e dentes indicados para extração. Os voluntários incluídos receberam diagnóstico de PE estágio III graus B ou C generalizada^{72,73}. Os indivíduos deveriam apresentar ainda, no mínimo, 30% dos dentes com pelo menos 1 sítio com PS e NIC ≥ 5 mm e sangramento à sondagem. Os indivíduos deveriam apresentar DM2 com diagnóstico há pelo menos 5 anos, com níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 7\%$, tratamento com dieta e suplementação

com insulina ou agentes hipoglicêmicos. Os critérios de exclusão para o estudo foram: presença de outras condições sistêmicas, com exceção do DM2, que podem afetar a progressão da PE ou a resposta ao tratamento da mesma, administração de medicação anti-inflamatória e imunossupressora em longo prazo, tratamento periodontal e/ou uso de antimicrobianos nos últimos 6 meses, uso de probióticos nos últimos 6 meses, uso contínuo de enxaguatórios bucais contendo agentes antimicrobianos nos últimos 6 meses, necessidade de antibioticoterapia profilática para procedimentos odontológicos de rotina, doenças gastrointestinais crônicas, reabilitações protéticas extensas, consumo de tabaco nos últimos 5 anos, gravidez e lactação.

3.3 Adequação do Meio Bucal, Exame Clínico Periodontal e Randomização

Sete dias antes do *baseline*, os indivíduos receberam adequação do meio bucal, incluindo raspagem supragengival, e exame radiográfico periapical completo da boca toda. Foram realizadas as instruções para um efetivo autocontrole de biofilme, incluindo informações sobre a técnica de Bass (Bass, 1954), limpeza interproximal com fio dental ou escovas interdentais e escovação do dorso da língua. Os indivíduos também receberam um mesmo dentífrico que foi utilizado durante todo o período experimental (Colgate Total®, Anakol Ind. Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil).

No *baseline*, os voluntários retornaram para realização do exame periodontal de boca toda, usando uma sonda periodontal do tipo Carolina do Norte (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA). Os parâmetros clínicos periodontais incluíram: (i) presença/ausência de biofilme supragengival visível em 4 faces; (ii) profundidade de sondagem (PS; mm); (iii) sangramento à sondagem, avaliado dicotomicamente (Ainamo & Bay, 1975); (iv) nível clínico de inserção (NIC; mm); (v) distância da junção cemento-esmalte à margem gengival; e (vi) supuração. Com exceção da presença/ausência de biofilme supragengival, todas as medidas foram realizadas em 6 sítios por dente. O exame clínico periodontal completo foi executado novamente 3 meses após o *baseline*.

O coordenador do estudo identificou os indivíduos por um código numérico e a randomização foi feita de acordo com uma tabela numérica gerada por um *website* de randomização. O coordenador do estudo alocou os indivíduos em um dos seguintes

grupos experimentais: grupo C (Controle) e grupo PROB (Probiótico).

3.4 Calibração e Cegamento dos Examinadores

Um único examinador treinado e calibrado foi responsável por realizar todas as medidas clínicas periodontais, no *baseline* e após 3 meses. Foi realizada calibração do examinador para alcançar aceitável reproduzibilidade intra-examinador. Dez indivíduos, não envolvidos no estudo, que apresentaram pelo menos 5 dentes com PS e NIC ≥ 5 mm em faces interproximais foram recrutados e avaliados pelo examinador em duas ocasiões separadas, com um intervalo de 48 horas entre elas. Nessas avaliações, foram mensuradas a PS e o NIC. A calibração aceita apresentou coeficiente de kappa $\geq 0,85$ entre as duas avaliações⁷⁴.

Todos os pesquisadores envolvidos no estudo, incluindo os que realizaram exames clínicos periodontais, RAR, aplicação de questionários, verificação da adesão do indivíduo ao consumo das pastilhas, coleta de biofilme subgengival, entrega e recebimento de frascos coletores para fezes e análises de sequenciamento de nova geração, foram cegos quanto ao grupo experimental ao qual pertence cada indivíduo.

3.5 Raspagem e Alisamento Radicular e Administração de Pastilhas Placebo ou Contendo Probiótico

No *baseline*, os indivíduos receberam terapia periodontal não cirúrgica, a qual consiste em RAR realizada por instrumentos ultrassônicos associados a instrumentos manuais (curetas de Gracey; Hu Friedy, Chicago, IL, EUA) na boca toda. Duas sessões de RAR foram realizadas com um intervalo de 7 dias entre elas. Os resultados da instrumentação foram verificados, com auxílio de uma sonda exploradora, por um examinador clínico específico, diferente daquele que realizou a RAR. Reforços de instruções de higiene oral foram realizados em ambas as sessões de RAR. Durante os três meses de acompanhamento, houve visitas de controle e avaliação a cada 2 semanas, e a cooperação dos indivíduos foi monitorada, verificando-se o nível de higiene bucal.

Uma farmácia de manipulação especializada foi responsável por manipular as pastilhas placebo e probiótica. Ambas as pastilhas são idênticas em cor, formato, cheiro e tamanho. As pastilhas foram enviadas ao coordenador do estudo, o qual marcou um código numérico para identificar os grupos de pastilhas que pertencem a cada indivíduo. As pastilhas codificadas foram entregues ao examinador clínico, que

distribuiu os frascos contendo as pastilhas para os voluntários, mas não conhecia o conteúdo das pastilhas. Os frascos entregues aos indivíduos também não continham nenhuma identificação sobre o conteúdo das pastilhas, sendo os indivíduos cegos quanto ao tipo de pastilha que receberam.

Na primeira sessão de RAR (*baseline*), os indivíduos receberam frascos, com dessecadores para controle da umidade, contendo 29 pastilhas, sendo pastilhas placebo (grupo C) ou probiótico (grupo PROB). As pastilhas probióticas continham 10^9 unidades formadoras de colônia (UFCs) de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (HOWARU® Bifido LYO 40 DCU-S, DuPont™ Danisco® Sweeteners Oy, Kantvik, Finlândia;⁵⁸. Os indivíduos retornavam à clínica de atendimento a cada 2 semanas. Nessa visita, eles traziam os frascos onde foram colocadas as pastilhas anteriormente e recebiam mais pastilhas, suficientes para mais 2 semanas de consumo. As pastilhas foram administradas ao longo de 3 meses a partir do *baseline*. Nas visitas, era avaliada a adesão do indivíduo ao consumo das pastilhas e aplicado um questionário para investigação sobre possíveis efeitos adversos relacionados ao tratamento. O monitoramento da adesão do indivíduo e a aplicação do questionário foram realizados por um assistente de pesquisa, que não era examinador ou operador no estudo.

Os indivíduos foram orientados a consumirem duas pastilhas por dia, uma de manhã e uma à noite, após a higienização bucal, deixando-as dissolver na cavidade bucal. As pastilhas foram armazenadas sob refrigeração desde o momento da sua fabricação até o momento do consumo. Os indivíduos foram orientados quanto à necessidade de manter as pastilhas refrigeradas (em geladeira). Foram realizados testes de viabilidade com a pastilha extra (a 29^a pastilha) que o voluntário não consumiu e trouxe de volta à clínica. Além disso, de maneira aleatória, foram inseridas pastilhas extra nos frascos entregues aos indivíduos, de maneira a averiguar a adesão do indivíduo ao consumo caseiro das pastilhas. Os voluntários também foram orientados a não consumir nenhum outro produto contendo probióticos ou fazer uso de antimicrobianos ao longo do estudo.

3.6 Monitoramento imunológico

No *baseline* e 3 meses após o início da administração do probiótico ou placebo, foram coletadas amostras de FCG de 4 sítios interproximais não contíguos de cada indivíduo. O biofilme supragengival dos elementos dentários selecionados era

removido, os sítios eram cuidadosamente secos com jatos de ar, e posteriormente isolados com roletes de algodão estéreis. As amostras de FCG eram obtidas com a utilização de tiras de Periopaper® (Oralfow Inc., Amityville, NY, EUA). As tiras eram cuidadosamente inseridas junto à margem gengival, permanecendo por um período de 30 segundos, e posteriormente eram colocadas em frascos esterilizados do tipo eppendorf, os quais eram armazenados a -80°C. Foram realizadas quantificações (pg/μl) dos marcadores inflamatórios Interleucina (IL) -1β, IL-17, IL-4, IL-6, IL-10, Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) e Interferon-γ (IFN-γ). Os níveis de citocinas foram determinados por meio da tecnologia LuminexTM xMAP®. As amostras coletadas foram analisadas utilizando-se kits disponíveis comercialmente (HCYTOMAG-60K–Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em um analisador Luminex 100/200 (Luminex® 100/200™ System, Luminex Corporation, Austin, TX, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.7 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada (Shapiro-Wilk) e as comparações intra-grupos nos diferentes intervalos de tempo foram realizadas (Wilcoxon Signed Rank Test). Para todas as análises estatísticas, foi adotado um nível de significância de 95%. Todos os cálculos foram realizados pelo software GraphPad Prism 10.0.0 (GraphPad Prism version 10.0.0 for Windows, GraphPad Software, Boston, MA, EUA, www.graphpad.com).

4. RESULTADOS

Cinquenta indivíduos foram randomicamente distribuídos para os grupos C e PROB, porém o acompanhamento de alguns indivíduos e algumas amostras de FCG foram perdidos ao longo do desenvolvimento do estudo. Assim, as análises reportadas no presente relatório referem-se a trinta e oito indivíduos, sendo 19 do grupo C e 19 do grupo PROB. Mais indivíduos estão sendo selecionados e incluídos no presente estudo, de forma a alcançar o número de indivíduos determinado pelo cálculo amostral prévio.

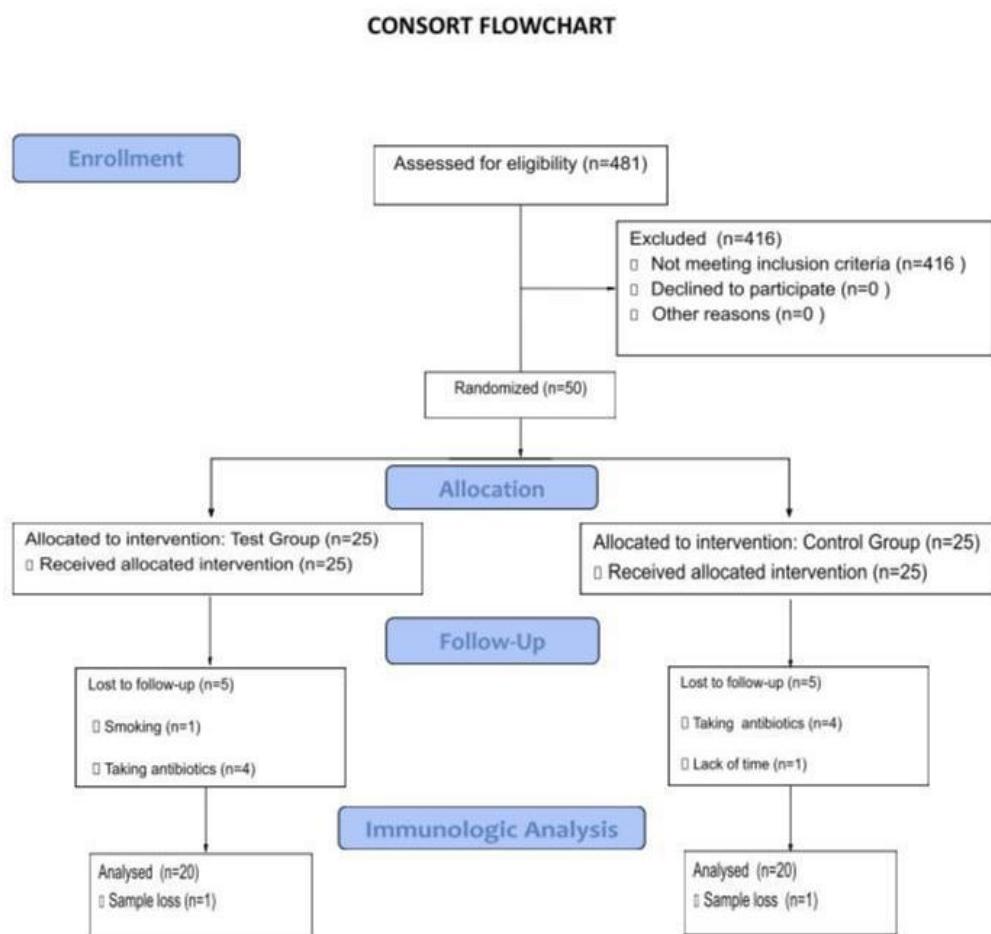


Figura 1. Flowchart do desenho do estudo.

Fonte: Autora.

Os resultados referentes às razões de mediadores pró e anti-inflamatórias do FCG dos indivíduos dos grupos C e PROB, no *baseline* (T0) e após 3 meses (T3) estão apresentados na Figura 2. Não houve diferenças estatisticamente significativas

na comparação intragrupo, entre T0 e T3, das razões IL-1 β /IL-10, IL-1 β /IL-4, TNF- α /IL-4 e IL-17A/IL-4 ($p>0,05$). Em ambos os grupos, houve diminuição das razões IL-6/IL-4 e IL-6/IFN- γ entre T0 e T3 ($p<0,05$). Somente no grupo PROB houve diminuição na razão IL-1 β /IFN- γ de T0 para T3 ($p<0,05$).

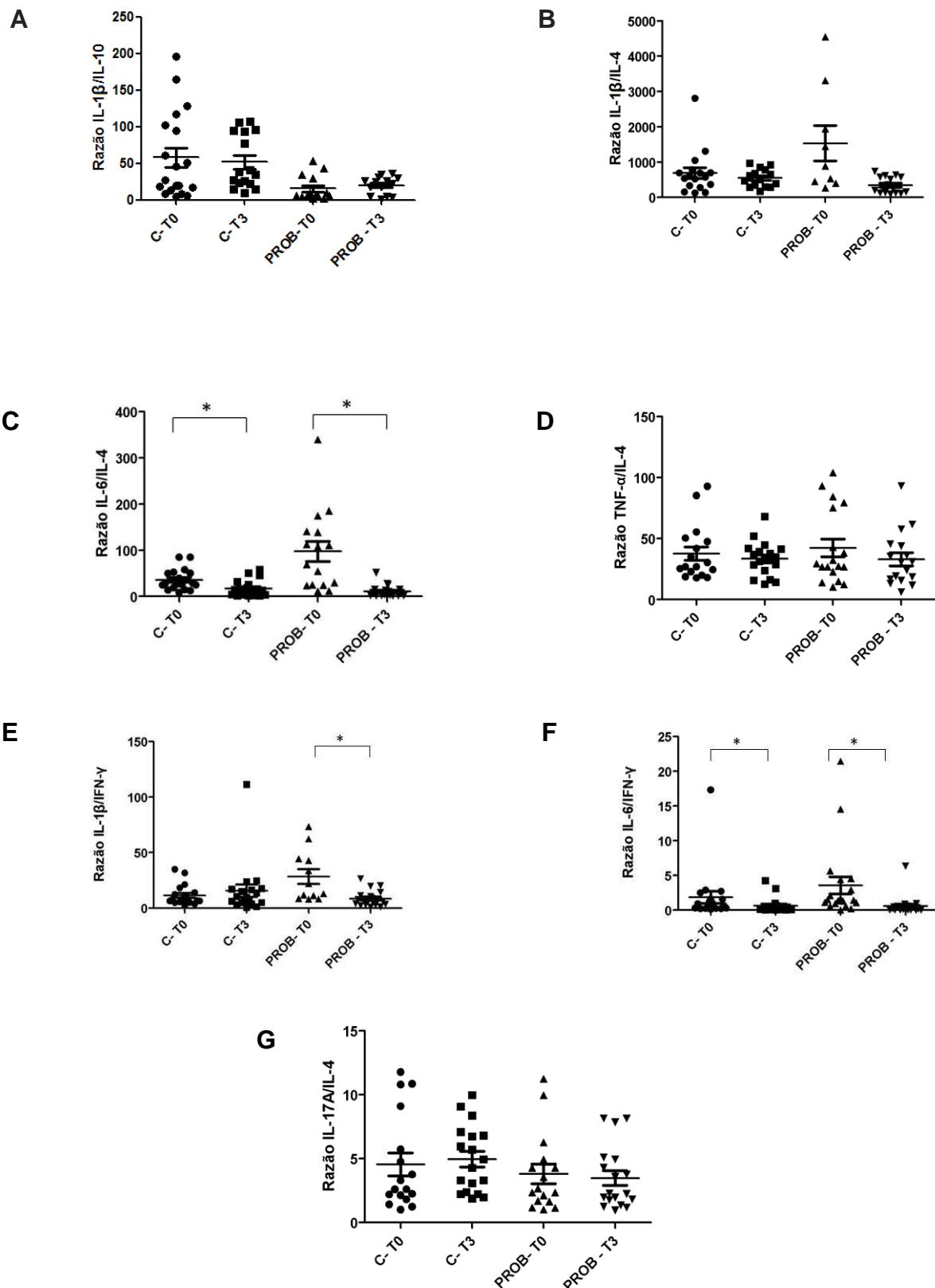


Figura 2. Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de razões dos marcadores IL-1 β /IL-10 (1A), IL-1 β /IL-4 (1B), IL-6/IL-4 (1C), TNF- α /IL-4 (1D), IL-1 β /IFN- γ (1E), IL-6/IFN- γ (1F) e IL-17A/IL-4 (1G) do FCG dos indivíduos dos grupos C e PROB, no *baseline* (T0) e após 3 meses (T3), bem como os resultados das comparações intragrupos. *indicam diferenças estatisticamente significativas nas comparações intragrupos (T0 - T3; Wilcoxon $p < 0,05$).

Fonte: Autora.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da administração oral da cepa probiótica *B. lactis* HN019, como adjuvante à RAR, em marcadores da resposta imunoinflamatória do hospedeiro no FCG de indivíduos portadores de DM2 e periodontite estágio III graus B ou C generalizada. Alterações em sinais clínicos e histológicos relacionados à inflamação gengival, bem como em marcadores imuno-inflamatórios do FCG, são indicadores da resposta do hospedeiro na periodontite. O sangramento à sondagem é um indicador clínico sensível para definir a transição de saúde para inflamação gengival⁷⁵, mas também ocorrem alterações em uma grande variedade de mediadores inflamatórios presentes no FCG⁷⁶. Ainda, os produtos finais de glicação avançada também estão presentes nos tecidos gengivais e podem interagir com receptores específicos de células gengivais, estimulando assim a produção de proteínas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-1 β e metaloproteinases da matriz (MMPs), levando a um estado de estresse oxidativo aumentado e acelerando a lesão tecidual⁷⁷⁻⁷⁹. Assim, pode ser sugerido que portadores de DM2 e periodontite possuem duas condições inflamatórias crônicas que influenciam marcadores do FCG⁸⁰. De fato, uma revisão de literatura concluiu que o perfil das citocinas do FCG de indivíduos com periodontite portadores de DM2 é diferente do perfil de indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite⁸⁰.

Alguns mediadores inflamatórios presentes no FCG são caracterizados como pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL-6 e IL-8, os quais são decorrentes de uma resposta imunológica exacerbada e produção de enzimas envolvidas na degradação dos tecidos periodontais. Essas citocinas têm demonstrado envolvimento na patogênese da doença periodontal, havendo uma correlação entre a atividade da doença e níveis elevados dessas citocinas nos tecidos periodontais⁸¹⁻⁸³. A citocina IL-17, produzida pelas células Th17, promove o desenvolvimento de osteoclastos na presença de osteoblastos⁸⁴. Os níveis de IL-17 no FCG de indivíduos com periodontite apresentou-se mais elevado quando comparado ao de FCG de indivíduos sem periodontite; no entanto, esses níveis foram significativamente menores após o tratamento mecânico de remoção de biofilme^{83,85}. Contudo, no presente estudo, os níveis das razões TNF- α /IL-4 e IL-17/IL-4 no FCG de portadores de DM2 e periodontite não apresentaram alterações significativas após o tratamento periodontal nos grupos C e PROB.

A citocina IL-10 é conhecida como uma citocina anti-inflamatória que suprime as respostas imunológica e inflamatória^{83,86}. De fato, indivíduos com periodontite que receberam RAR e pastilha probiótica contendo *B. lactis* HN019 por 30 dias demonstraram maiores níveis de IL-10 no FCG ao final desse período do que no *baseline*⁵⁸. Ainda, ratos com periodontite experimental que receberam o probiótico *B. lactis* HN019 associado à RAR apresentaram níveis aumentados de IL-10 nos tecidos periodontais quando comparados aos animais com PE não tratados com o probiótico⁴⁹. Em contrapartida, Fu et al. (2013) não encontraram alterações nos níveis de IL-10 após o tratamento mecânico de indivíduos saudáveis com periodontite crônica⁸³. No presente estudo, a razão IL-1 β /IL-10 não apresentou alteração significativa após o tratamento periodontal com RAR no FCG dos indivíduos dos grupos C e PROB.

A citocina IL-6 está associada à patogênese da doença periodontal⁸¹⁻⁸³. Ainda, observaram-se maiores concentrações de IL-6^{87,88}, IL-17, IL-23, IFN- γ ^{89,90} e IL-8⁹⁰ no FCG de pacientes com periodontite e portadores de DM2 em comparação com pacientes com periodontite e sistematicamente saudáveis⁸⁰. A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória que tem sido relacionada a tecidos periodontais saudáveis^{89,91}. Embora alguns estudos tenham associado níveis mais elevados de IFN- γ a lesões periodontais progressivas e ativas^{92,93}, essa citocina também é altamente expressa por células de tecidos periodontais saudáveis^{94,95}. Assim, essa citocina apresenta um papel importante no controle de infecções, com ação protetora na patogênese da periodontite⁹⁵⁻⁹⁷. No presente estudo, a terapia periodontal não cirúrgica apresentou capacidade de diminuir os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 e/ou de aumentar os níveis de IL-4 e INF- γ no FCG de indivíduos periodontais portadores de DM2. As razões IL-6/IL-4 e IL-6/IFN- γ apresentaram diminuição significativa após a terapia com RAR tanto no grupo C como no grupo PROB.

A citocina IL-1 β é liberada por macrófagos após infecção bacteriana ou injúria tecidual e promove o desenvolvimento da resposta inflamatória, amplificando a inflamação e modulando processos imunológicos⁹⁸. Níveis aumentados desta citocina são observados no FCG de indivíduos com periodontite⁹⁸⁻¹⁰¹ e ela está associada a maior severidade da doença periodontal e destruição dos tecidos periodontais⁹⁸. Invernici et al. (2018) avaliaram os níveis de IL-1 β no FCG de pacientes com periodontite tratados com RAR associada ao consumo de pastilhas probióticas contendo *B. lactis* HN019 por 30 dias. Trinta e 90 dias após a RAR, o grupo que

recebeu apenas a RAR apresentou níveis mais elevados de IL-1 β do que o grupo que recebeu o probiótico⁵⁸. Outros autores que avaliaram os efeitos de probióticos como terapia adjuvante à RAR também observaram diminuição de IL-1 β no FCG de pacientes com periodontite crônica⁴⁸ e de pacientes com gengivite experimental¹⁰². No presente estudo, apenas o grupo PROB apresentou redução significativa na razão IL-1 β /IFN- γ e, embora a razão IL-1 β /IL-4 não tenha apresentado diferença significativa, os resultados sugerem que houve diminuição desta razão de T0 para T3 no grupo PROB.

É importante ressaltar que o presente trabalho apresenta os resultados apenas das análises imunológicas de alguns marcadores imuno-inflamatórios do FCG. Outras análises, clínicas e microbiológicas, devem ser realizadas para avaliar os efeitos da RAR, associada ou não ao probiótico *B. lactis* HN019, em indivíduos com DM2 e periodontite.

6. CONCLUSÃO

Dentro das limitações do presente estudo, pode-se concluir que a RAR promove alterações em alguns marcadores imuno-inflamatórios do FCG, e o uso adjuvante do probiótico *B. lactis* HN019 leva a mudanças adicionais, em indivíduos portadores de DM2 e periodontite.

REFERÊNCIAS

1. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Laverty D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. Março de 2017;44 Suppl 18:S94–105.
2. D'Aiuto F, Parkar M, Tonetti MS. Periodontal therapy: a novel acute inflammatory model. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. outubro de 2005;54(10):412–4.
3. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000*. Junho de 1997;14:12–32.
4. Ganesan SM, Joshi V, Fellows M, Dabdoub SM, Nagaraja HN, O'Donnell B, et al. A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. *ISME J*. Setembro de 2017;11(9):2075–89.
5. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. Outubro de 2017;75(1):317–29.
6. Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol*. Março de 2011;38 Suppl 11:28–35.
7. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:108–29.
8. Atkinson MA, Maclaren NK. What causes diabetes? *Sci Am*. Julho de 1990;263(1):62–3, 66–71.
9. Wang H, Song Z, Ba Y, Zhu L, Wen Y. Nutritional and eating education improves knowledge and practice of patients with type 2 diabetes concerning dietary intake and blood glucose control in an outlying city of China. *Public Health Nutr*. Outubro de 2014;17(10):2351–8.
10. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. Setembro de 2005;28(9):2130–5.
11. da Rocha Fernandes J, Ogurtsova K, Linnenkamp U, Guariguata L, Seuring T, Zhang P, et al. IDF Diabetes Atlas estimates of 2014 global health expenditures on diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. Julho de 2016;117:48–54.
12. Bergman M. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. Junho de 2013;43(3):504–13.
13. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*. Setembro de 2014;63(9):1513–21.
14. Weiss GA, Hennet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci CMLS*. Agosto de 2017;74(16):2959–77.

15. Wen L, Duffy A. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. *J Nutr*. Julho de 2017;147(7):1468S-1475S.
16. Sharma S, Tripathi P. Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go? *J Nutr Biochem*. Janeiro de 2019;63:101–8.
17. Hsiao WWL, Metz C, Singh DP, Roth J. The microbes of the intestine: an introduction to their metabolic and signaling capabilities. *Endocrinol Metab Clin North Am*. Dezembro de 2008;37(4):857–71.
18. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 27 de janeiro de 2011;469(7331):543–7.
19. Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong ML, Licinio J, Wesselingh S. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol Psychiatry*. Junho de 2016;21(6):738–48.
20. Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*. 22 de junho de 2012;149(7):1578–93.
21. Castillo NA, Perdigón G, de Moreno de Leblanc A. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in mice. *BMC Microbiol*. 3 de agosto de 2011;11:177.
22. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. Julho de 2009;7(7):526–36.
23. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. Maio de 2013;13(5):321–35.
24. Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol*. Dezembro de 2001;6(1):91–8.
25. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol*. Dezembro de 2001;6(1):99–112.
26. Choi YH, McKeown RE, Mayer-Davis EJ, Liese AD, Song KB, Merchant AT. Association between periodontitis and impaired fasting glucose and diabetes. *Diabetes Care*. Fevereiro de 2011;34(2):381–6.
27. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol*. Julho de 1998;3(1):51–61.
28. Demmer RT, Jacobs DR, Desvarieux M. Periodontal disease and incident type 2 diabetes: results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its epidemiologic follow-up study. *Diabetes Care*. Julho de 2008;31(7):1373–9.

29. Taiyeb-Ali TB, Raman RPC, Vaithilingam RD. Relationship between periodontal disease and diabetes mellitus: an Asian perspective. *Periodontol 2000*. Junho de 2011;56(1):258–68.
30. Han JL, Lin HL. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: from mechanism insights to therapeutic perspective. *World J Gastroenterol*. 21 de dezembro de 2014;20(47):17737–45.
31. Jagannathan M, Hasturk H, Liang Y, Shin H, Hetzel JT, Kantarci A, et al. TLR cross-talk specifically regulates cytokine production by B cells from chronic inflammatory disease patients. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1º de dezembro de 2009;183(11):7461–70.
32. Barbosa FI, Araújo PV, Machado LJC, Magalhães CS, Guimarães MMM, Moreira AN. Effect of photodynamic therapy as an adjuvant to non-surgical periodontal therapy: Periodontal and metabolic evaluation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Junho de 2018; 22:245–50.
33. Navarro-Sánchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martínez 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*. Outubro de 2007;34(10):835–43.
34. 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*. Fevereiro de 1997;68(2):127–35.
35. Botero JE, Yepes FL, Ochoa SP, Hincapie JP, Roldan N, Ospina CA, et al. Effects of periodontal non-surgical therapy plus azithromycin on glycemic control in patients with diabetes: a randomized clinical trial. *J Periodontal Res*. Dezembro de 2013;48(6):706–12.
36. Carlet J, Pittet D. Access to antibiotics: a safety and equity challenge for the next decade. *Antimicrob Resist Infect Control*. 10 de janeiro de 2013;2(1):1.
37. Eick S, Nydegger J, Bürgin W, Salvi GE, Sculean A, Ramseier C. Microbiological analysis and the outcomes of periodontal treatment with or without adjunctive systemic antibiotics-a retrospective study. *Clin Oral Investig*. Dezembro de 2018;22(9):3031–41.
38. Ikram S, Hassan N, Baig S, Borges KJJ, Raffat MA, Akram Z. Effect of local probiotic (*Lactobacillus reuteri*) vs systemic antibiotic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in chronic periodontitis. *J Investig Clin Dent*. Maio de 2019;10(2):e12393.
39. Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000*. Fevereiro de 2018;76(1):85–96.
40. Guidelines For The Evaluation of Probiotics in Food | PDF | Probiotic | Phases Of Clinical Research. Disponível em:

<https://www.scribd.com/doc/110123033/Guidelines-for-the-Evaluation-of-Probiotics-in-Food>

41. Martinez RCR, Bedani R, Saad SMI. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *Br J Nutr.* 28 de dezembro de 2015;114(12):1993–2015.
42. Bedaiwi MK, Inman RD. Microbiome and probiotics: link to arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* Julho de 2014;26(4):410–5.
43. Homayouni Rad A, Torab R, Ghalibaf M, Norouzi S, Mehrabany EV. Might patients with immune-related diseases benefit from probiotics? *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* março de 2013;29(3):583–6.
44. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci.* junho de 2005;113(3):188–96.
45. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr.* Fevereiro de 2004;79(2):261–7.
46. Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2009;51:141–51.
47. Sliepen I, Van Damme J, Van Essche M, Loozen G, Quirynen M, Teughels W. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res.* novembro de 2009;88(11):1026–30.
48. 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).* Dezembro de 2014;62(6):495–500.
49. Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiottini JP, Moreira ALG, et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179946.
50. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr.* Fevereiro de 2000;83(2):167–76.
51. Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal P. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *Int Dairy.* 1º de janeiro de 1998;8:993–1002.
52. Toivainen A, Jalasvuori H, Lahti E, Gursoy U, Salminen S, Fontana M, et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans

- streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin Oral Investig.* Janeiro de 2015;19(1):77–83.
53. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* Outubro de 2006;21(5):326–32.
 54. Periasamy S, Kolenbrander PE. Aggregatibacter actinomycetemcomitans builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. *Infect Immun.* setembro de 2009;77(9):3542–51.
 55. Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr.* Março de 2000;54(3):263–7.
 56. Chiang BL, Sheih YH, Wang LH, Liao CK, Gill HS. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur J Clin Nutr.* Novembro de 2000;54(11):849–55.
 57. Oliveira LFF, Salvador SL, Silva PHF, Furlaneto FAC, Figueiredo L, Casarin R, et al. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol.* Fevereiro de 2017;88(2):197–208.
 58. Invernici MM, Salvador SL, Silva PHF, Soares MSM, Casarin R, Palioto DB, et al. Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* Outubro de 2018;45(10):1198–210.
 59. Invernici MM, Furlaneto FAC, Salvador SL, Ouwehand AC, Salminen S, Mantzari A, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. *PLoS One.* 2020;15(9):e0238425.
 60. de Almeida Silva Levi YL, Ribeiro MC, Silva PHF, Silva GA, de Souza Salvador SL, de Souza SLS, et al. Effects of oral administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 on the treatment of plaque-induced generalized gingivitis. *Clin Oral Investig.* Janeiro de 2023;27(1):387–98.
 61. Deng J, Li Y, Zhang J, Yang Q. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. *Res Vet Sci.* fevereiro de 2013;94(1):62–8.
 62. Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, et al. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002714.
 63. Nishitani Y, Tanoue T, Yamada K, Ishida T, Yoshida M, Azuma T, et al. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Int Immunopharmacol.* Novembro de 2009;9(12):1444–51.

64. Badia R, Brufau MT, Guerrero-Zamora AM, Lizardo R, Dobrescu I, Martin-Venegas R, et al. β -Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* modulate the immune response against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. *Clin Vaccine Immunol* CVI. Março de 2012;19(3):368–76.
65. Mariman R, Kremer B, van Erk M, Lagerweij T, Koning F, Nagelkerken L. Gene expression profiling identifies mechanisms of protection to recurrent trinitrobenzene sulfonic acid colitis mediated by probiotics. *Inflamm Bowel Dis*. agosto de 2012;18(8):1424–33.
66. Okamoto K, Fujiya M, Nata T, Ueno N, Inaba Y, Ishikawa C, et al. Competence and sporulation factor derived from *Bacillus subtilis* improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *Int J Colorectal Dis*. agosto de 2012;27(8):1039–46.
67. Philippe D, Heupel E, Blum-Sperisen S, Riedel CU. Treatment with *Bifidobacterium bifidum* 17 partially protects mice from Th1-driven inflammation in a chemically induced model of colitis. *Int J Food Microbiol*. 1º de setembro de 2011;149(1):45–9.
68. Rodrigues DM, Sousa AJ, Johnson-Henry KC, Sherman PM, Gareau MG. Probiotics are effective for the prevention and treatment of *Citrobacter rodentium*-induced colitis in mice. *J Infect Dis*. 1º de julho de 2012;206(1):99–109.
69. Arribas B, Garrido-Mesa N, Perán L, Camuesco D, Comalada M, Bailón E, et al. The immunomodulatory properties of viable *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius* CECT5713 are not restricted to the large intestine. *Eur J Nutr*. Abril de 2012;51(3):365–74.
70. Finamore A, Roselli M, Britti MS, Merendino N, Mengheri E. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* MB5 induce intestinal but not systemic antigen-specific hyporesponsiveness in ovalbumin-immunized rats. *J Nutr*. Fevereiro de 2012;142(2):375–81.
71. Wang S, Liu J, Zhang J, Lin J, Yang S, Yao J, et al. Glycemic control and adipokines after periodontal therapy in patients with Type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Braz Oral Res*. 27 de novembro de 2017;31:e90.
72. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. Junho de 2018;45 Suppl 20:S68–77.
73. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. Junho de 2018;89 Suppl 1:S173–82.
74. Organization WH. Oral health surveys: basic methods. World Health Organization; 1997. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/41905>

75. Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol.* Março de 2011;38 Suppl 11:159–77.
76. Teughels W, Newman MG, Coucke W, Haffajee AD, Van Der Mei HC, Haake SK, et al. Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. *J Dent Res.* novembro de 2007;86(11):1078–82.
77. 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.* Janeiro de 2006;77(1):15–20.
78. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest.* Abril de 2000;105(8):1117–24.
79. Hollá LI, Kanková K, Fassmann A, Bucková D, Halabala T, Znojil V, et al. Distribution of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol.* Dezembro de 2001;72(12):1742–6.
80. Javed F, Al-Askar M, Al-Hezaimi K. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of periodontitis patients with and without type 2 diabetes: a literature review. *J Periodontol.* Fevereiro de 2012;83(2):156–61.
81. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gürgan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res.* abril de 2007;86(4):347–51.
82. Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res.* setembro de 2008;87(9):817–28.
83. Fu QY, Zhang L, Duan L, Qian SY, Pang HX. Correlation of chronic periodontitis in tropical area and IFN- γ , IL-10, IL-17 levels. *Asian Pac J Trop Med.* junho de 2013;6(6):489–92.
84. Zhang F, Tanaka H, Kawato T, Kitami S, Nakai K, Motohashi M, et al. Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E2 in osteoblasts. *Biochimie.* Fevereiro de 2011;93(2):296–305.
85. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* Junho de 2011;38(6):509–16.
86. Al-Rasheed A, Scheerens H, Rennick DM, Fletcher HM, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10. *J Dent Res.* agosto de 2003;82(8):632–5.

87. Kardeşler L, Biyikoğlu B, Cetinkalp S, Pitkala M, Sorsa T, Buduneli N. Crevicular fluid matrix metalloproteinase-8, -13, and TIMP-1 levels in type 2 diabetics. *Oral Dis.* julho de 2010;16(5):476–81.
88. Duarte PM, de Oliveira MCG, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontal Res.* agosto de 2007;42(4):377–81.
89. Ribeiro FV, de Mendonça AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol.* Agosto de 2011;82(8):1187–96.
90. Engebretson SP, Vossoughi F, Hey-Hadavi J, Emingil G, Grbic JT. The influence of diabetes on gingival crevicular fluid beta-glucuronidase and interleukin-8. *J Clin Periodontol.* Novembro de 2006;33(11):784–90.
91. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci.* janeiro de 2007;23(1):1–7.
92. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, et al. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* Fevereiro de 2009;80(2):290–6.
93. Garlet GP, Martins W, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* abril de 2003;38(2):210–7.
94. Gonzales JR, Gröger S, Boedeker RH, Meyle J. Expression and secretion levels of Th1 and Th2 cytokines in patients with aggressive periodontitis. *Clin Oral Investig.* Outubro de 2012;16(5):1463–73.
95. Stolf CS, Sacramento CM, Alvarenga CAPG, Vieira JR, Araújo CF, Monteiro MF, et al. Immune response characterization of primary gingival fibroblasts from Grade C periodontitis patients. *J Periodontol.* Março de 2023;94(3):429–38.
96. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci.* 5 de novembro de 2019;11(3):30.
97. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* fevereiro de 2004;75(2):163–89.
98. Konopka L, Pietrzak A, Brzezińska-Błaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1 β , interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* dezembro de 2012;47(6):681–8.

99. Figueiredo CM, Ribeiro MS, Fischer RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1beta concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol.* Dezembro de 1999;70(12):1457–63.
100. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol.* Outubro de 2000;71(10):1535–45.
101. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* Janeiro de 2002;29(1):48–53.
102. Kuru BE, Laleman I, Yalnizoğlu T, Kuru L, Teughels W. The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol.* Novembro de 2017;88(11):1115–23.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

DADOS PESSOAIS

Nome: Izadora Cianfa Firmino da Silveira

Nº USP: 11384729 Período: 8º período

Telefone de contato: (16) 99153-7633 E-mail USP: Izadoracianfa@usp.br

INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Nome do Orientador(a): Flávia Aparecida Chaves Furlaneto Messora

Departamento: DCTBMFP

Área de conhecimento: Periodontia

Subárea: Periodontia

MODALIDADE

Modalidade: Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional

ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)

Eu, Prof(a). Dr(a). Flávia Aparecida Chaves Furlaneto Messora, aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.

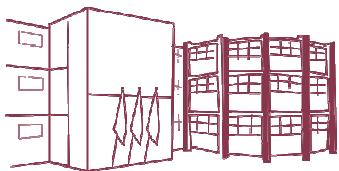
Ribeirão Preto, 14 de abril de 2023

Izadora Cianfa Firmino da Silveira



Izadora Cianfa Firmino da Silveira

Flávia Aparecida Chaves Furlaneto Messora



Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEx-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 536^a Reunião Ordinária, realizada em 04 de outubro de 2024, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA)**.

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador), conforme menção constante no trabalho e documentação existente no Serviço de Graduação da FORP.

Ribeirão Preto, 04 de novembro de 2024.

Prof. Dr. Michel Reis Messora
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP