

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Antonio Carlos Gargioni Filho

**O EFEITO DO TRATAMENTO GENGIVAL SOBRE A
QUALIDADE DE VIDA RELACIONADA A SAÚDE BUCAL DE
INDIVÍDUOS DIABÉTICOS**

**Taubaté-SP
2015**

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Antonio Carlos Gargioni Filho

**O EFEITO DO TRATAMENTO GENGIVAL SOBRE A
QUALIDADE DE VIDA RELACIONADA A SAÚDE BUCAL DE
INDIVÍDUOS DIABÉTICOS**

Tese apresentada para obtenção do
Título de Doutor pelo Programa de Pós-
graduação em Odontologia, nível
Doutorado, da Universidade de Taubaté.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Davi Romeiro
Aquino

Co-orientadora: Profa. Dra. Sheila
Cavalca Cortelli

**Taubaté-SP
2015**

Ficha catalográfica elaborada por
Liliane Castro – Bibliotecária CRB-8/6748

G231e Gargioni Filho, Antonio Carlos

O efeito do tratamento gengival sobre a qualidade de vida relacionada a saúde bucal de indivíduos diabéticos / Antonio Carlos Gargioni Filho. - 2015.
135f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade de Taubaté, Departamento de Pós-graduação em Odontologia, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino; Co-orientadora: Profa. Dra. Sheila Cavalcanti Cortelli, Departamento de Pós-graduação em Odontologia.

1. Gengivite. 2. Diabetes mellitus. 3. Compostos sulfurados voláteis.
4. Qualidade de vida. I. Título.

ANTONIO CARLOS GARGIONI FILHO

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Dr. José Roberto Cortelli

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Profa. Dra. Suzane A Raslan

Universidade de Cuiabá

Assinatura: _____

Prof. Dr. Caio Vinícius Gonçalves Roman Torres

Universidade de Santo Amaro

Assinatura: _____

Dedico este trabalho...

À DEUS, por ter me dado a graça de poder viver cada momento destes últimos quatro anos com pessoas incríveis e ter permitido eu ampliar meus conhecimentos, superando obstáculos e me dando forças para acreditar que todas as barreiras podem ser ultrapassadas;

À Antonio Carlos Gargioni e Fátima Lourdes de Souza, meus pais, que sempre colocaram os estudos como prioridade, que sempre me deram amor, dedicação e a vida; palavras são poucas para poder agradecê-los;

Às minhas irmãs Liliâne Ibraíma Gargioni Berro e Ana Gabriela Gargioni, que juntas sempre proporcionaram carinho e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. Davi Romeiro Aquino que com muito carinho, profissionalismo e paciência orientou-me neste trabalho, mostrou toda sua grandeza durante as aulas de estatística e durante as supervisões de clínica; um homem sério, dedicado a sua família e ao seu trabalho, fiel a Deus; sou muito grato.

À Universidade de Taubaté, instituição que me proporcionou momentos de crescimento científico e profissional.

À Coordenadora do Programa Doutorado em Odontologia Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves, pela dedicação a todos os professores e alunos.

À minha orientadora Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli, que se despenda cada vez mais nos meios acadêmico e profissional dos cenários nacional e internacional, resultado de muitos estudos e dedicação à ciência.

Ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli, pelo incrível caminho científico nacional e internacional traçado ao longo destes anos e que não hesita em compartilhar conhecimento com seus alunos, juntamente com seu espírito empreendedor, de companheirismo e amizade conquistada.

Ao Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco, que mostra toda sua nobreza ao dedicar-se de forma humilde, toda punjança de seu conhecimento científico e profissional.

Prof. Dra. Karina Cogo, que através de gentileza e carisma, conquista um a um com seu conhecimento e disposição para ensinar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa na categoria Auxílio Pesquisa Regular sob nº 2010/20424-1.

A todos os professores do programa da Pós-graduação que fizeram parte da minha formação.

À bióloga Juliana Santos e Taís Browne, que contribuíram de forma muito paciente e profissional na fase laboratorial.

Aos funcionários Ana, Benedito Oswaldo, Edson e João da Clínica de Pós-graduação em Odontologia da UNITAU, pela colaboração e empenho durante o atendimento clínico.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação, Adriana e Ricardo pela paciência, carinho e dedicação conosco.

A todos os funcionários da faculdade de Odontologia que nunca mediram esforços em nos ajudar.

A bibliotecária Liliane Castro pela correção das normas.

A todos os novos colegas e amigos do programa de pós-graduação da turma 2012, especialmente Camila Alencar, Marcos Vinícius Castro e Rodrigo Dalla Pria Balejo; três anos de muita convivência, aprendizado e trocas de experiência.

À uma amiga especial, Suzane A Raslan, que sinto orgulho de ter sido aluno em Periodontia durante a graduação e que logo se tornaria uma profissional talentosa, sonhadora e executora de um mundo melhor para se viver, carismática, fiel; eternamente grato.

À Professora Dra. Viviane Cury, guerreira, amiga e grande profissional, que sem querer me fez enxergar e amar a Periodontia.

Aos grandes amigos Ana Paula Silva de Faria, Ericson Janólio de Camargo, Arilson Matos, Antonio Amaral, César Proença, Aleksander Miscevic, Jucy Lemes cujas diferenças de cada um faz com que minha vida se complete de maneira plena.

Ao Governo do Estado de Mato Grosso, em nome da Secretaria de Estado de Saúde e Escola de Saúde Pública (SES/MT), que com muito carinho, respeito e apoio concederam Licença a Qualificação Profissional.

A todos os indivíduos que aceitaram participar e concluir o estudo.

“Não podemos ter medo das novas idéias. Elas podem significar a diferença entre o triunfo e o fracasso.”

(Napoleon Hill)

Gargioni Filho AC. O efeito do tratamento gengival sobre a qualidade de vida relacionada a saúde bucal de indivíduos diabéticos [Tese de doutorado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Programa de Pós-graduação em Odontologia, 2015. 135p.

RESUMO

Hipótese do estudo: Indivíduos com diabetes quando submetidos ao tratamento gengival podem apresentar diferentes percepções e gerar impacto sobre sua qualidade de vida. **Objetivos:** Este estudo avaliou o efeito do tratamento gengival sobre a qualidade de vida relacionada à saúde bucal de indivíduos diabéticos (DM). **Metodologia:** Foram incluídos no presente estudo 150 indivíduos, sendo cem com gengivite divididos em dois grupos: diabetes (n=50) e Controle (sistemicamente saudável, n=50) em adição a um grupo controle negativo (sistemicamente saudável e com saúde gengival, n=50). Os grupos receberam profilaxia profissional e instrução de higiene bucal. Em seguida os indivíduos foram aleatoriamente distribuídos em óleos essenciais – OE (Listerine cuidado total, n=25) ou placebo (n=25), totalizando seis grupos aleatorizados. Para avaliar o impacto do Fator de Qualidade de Vida - FQV (questionário OHQoL-UK), bem como sua interação com DM (diabético ou não diabético), com tratamento (óleos essenciais ou placebo) e com o tempo (baseline e três meses), nos fatores clínicos (índices de placa e gengival – IP, IG e profundidade de sondagem – PS), microbiológicos (*Porphyromonas gingivalis* - Pg, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - Aa, *Tannerella forsythia* - Tf e carga bacteriana total - CBT), imunológicos (interleucina 1 β – IL-1 β) e halitométricos (níveis de compostos sulfurados voláteis – CSV), foram utilizados modelos de Regressão Linear Múltipla. Análises comparativas foram realizadas intra-grupo (inicial vs. final) e inter-grupos (em cada tempo experimental) com auxílio do *software Bio Estat 5.0* e *SPSS 14.0*. **Resultados:** O valor obtido em Alpha de Cronbach (0,971), a significância do teste de Bartlett ($p < 0,0001$) e o valor de 0,935 para o teste KMO indicaram boa consistência, correlação de variáveis e adequação do tamanho da amostra do instrumento OHQoL que foi demonstrado estar latente quando submetido a uma análise fatorial. O Modelo de Regressão Linear Múltipla detectou impacto entre o FQV e o tratamento em IG ($p = 0,03$), entre o FQV e CBT ($p = 0,03$) e entre FQV e tratamento com OE em CSV ($p = 0,011$). **Conclusão:** Participantes com diabetes e gengivite que relataram melhora na qualidade de vida tendem a apresentar melhores indicadores de saúde periodontal e hálito, principalmente quando fizeram uso diário de solução à base de óleos essenciais.

Palavras-chave: Gengivite; *Diabetes mellitus* tipo-2; Halitose; Qualidade de vida.

Gargioni Filho AC. The gingival treatment effect on quality of life related to oral health of type-2 diabetic patients [Thesis PhD in Periodontics]. Taubaté: University of Taubaté, Graduate Program in Dentistry, 2015. 135p.

ABSTRACT

Study Hypothesis: People with diabetes when submitted to gingival treatment may have different perceptions and have an impact on their quality of life. **Objectives:** This study evaluated the effect of gingival treatment on quality of life related to oral health in type-2 diabetic patients (DM2). **Methods:** 150 patients were included in this study, 100 with gingivitis divided into two groups: diabetes (n=50) and control group (systemically healthy, n=50) in addition to a negative control group (systemically healthy and gingival health, n=50). The groups received professional treatment and oral hygiene instruction. Then the subjects were randomly divided into essential oils (Listerine total care, n=25) or placebo (n=25), six randomized groups total. To assess the impact of the Quality of Life Factor - QoL (OHQoL-UK questionnaire) and its interaction with DM (diabetic or non-diabetic), with treatment (essential oils or placebo) and with time bases (baseline and three months) in clinical factors (plaque and gingival indexes - PI, GI and probing depth - PD), microbiological factors (Porphyromonas gingivalis - Pg, Aggregatibacter actinomycetemcomitans - Aa, Tannerella forsythia - Tf and total bacterial load - TBL), immunological (interleukin 1 β -IL-1 β) and breath levels (volatile sulfur compound levels - VSC), we used multiple linear regression analysis. Comparative analyzes were performed intra-group (initial vs. final) and inter-group (in each experimental time) using the *Bio Estat 5.0 and SPSS 14.0 software*. **Results:** The value obtained in Cronbach's alpha test (0.971), the significance of the Bartlett's test ($p < 0.0001$) and the value of 0.935 for KMO test indicated good agreement, correlation variables and adaptation of the size of the instrument's sample that OHQoL was shown to be latent when subjected to factor analysis. The Multiple Linear Regression Analysis detected impact between QoL and treatment in GI ($p = 0.03$) between the QoL and TBL ($p = 0.03$) and between QoL and treatment in VSC ($p = 0.011$). **Conclusion:** Participants with diabetes and gum disease who reported improvement in quality of life tend to have better periodontal health and breath indicators, especially when a daily rinse with essential oils mouthrinse is executed.

Key words: Gingivitis; Type-2 *Diabetes mellitus*; Halitosis; Quality of Life.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação da halitose.....	26
Figura 2 - Relação entre saúde, doença e qualidade de vida	39
Figura 3: Categorização do instrumento OHQoL.	40
Figura 4: Descrição dos grupos experimentais	45
Figura 5: Distribuição das respostas do questionário OHQoL (<i>Oral health related quality of life</i>)	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média, mediana, desvio padrão, valores mínimos e máximos das questões do instrumento OHQoL (<i>Oral health and quality of life</i>) na população geral	55
Tabela 2 - Análise fatorial para as questões do instrumento OHQoL (<i>Oral Health and Quality of Life</i>), com as cargas fatoriais e os respectivos auto-valores, percentual da variabilidade explicada, alpha de cronbach, teste de Bartlett e KMO.....	56
Tabela 3 - Regressão linear múltipla para profundidade de sondagem (PS), índice de placa (IP) e índice gengival (IG).	57
Tabela 4 - Regressão linear múltipla para carga bacteriana total, <i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i>	58
Tabela 5 - Regressão linear múltipla para interleucina1beta (IL-1B), volume de fluido crevicular gengival (FCG) e compostos sulfurados voláteis (CSV)	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Gengivite - Generalidades	16
2.1.1 Citocina pró-inflamatória IL-1 β	18
2.1.2 Parâmetros microbiológicos	18
2.2 Compostos Sulfurados Voláteis - CSV	21
2.2.1 Classificação dos CSV	25
2.3 Diabetes Mellito do Tipo 2	26
2.3.1 DM tipo 2 - Diagnóstico	28
2.4 Relações entre DM Tipo 2 e parâmetros clínicos, halitométricos e microbiológicos	29
2.5 Tratamento da gengivite	32
2.6 Qualidade de vida e auto-percepção	36
3 PROPOSIÇÃO	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 METODOLOGIA	42
4.1 Critérios de elegibilidade	43
4.1.1 Critérios de Inclusão	43
4.1.2 Critérios de Exclusão	44
4.2 Grupos de tratamento	44
4.2.1 Aleatorização	45
4.2.2 Tratamento	45
4.2.3 Avaliação Clínica e Radiográfica	47
4.2.4 Calibração do Examinador	47
4.3 Coletas das amostras	48
4.3.1 Coleta Microbiana	48
4.3.1.1 Análise Microbiológica	48
4.3.2 Coleta de fluido crevicular gengival	49
4.3.2.1 Análise de Citocina	50
4.3.3 Coleta e análise de CSV	50
4.3.4 Análises de auto-percepção (Análises Qualitativas)	51
4.3.5 Metodologia Estatística	52
5 RESULTADOS	54
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	81
ANEXOS	92

1 INTRODUÇÃO

O envolvimento científico na busca de alternativas mais eficientes na terapia da doença periodontal e na manutenção da saúde bucal restabelecida torna-se cada vez maior. Porém, entender o grau de percepção do indivíduo quanto ao impacto que a sua condição de saúde ou doença bucal exerce sobre sua qualidade de vida pode ser um grande desafio. Indivíduos com periodontite enxergam de forma negativa a relação entre condição bucal e qualidade de vida (Needleman et al., 2004). Por outro lado, o tratamento periodontal resulta em um impacto positivo sobre a qualidade de vida destes pacientes (Aslund et al., 2008). E esses são por si só indicadores dessa auto-percepção.

A cavidade bucal é um local que frequentemente reflete a presença e progressão de doenças e condições sistêmicas. A relação entre doenças periodontais e o diabetes melito (DM) tem sido muito estudada nos últimos anos (Noack et al., 1999; Mealey & Oates, 2006; Kiedrowicz et al., 2015). A grande maioria dos trabalhos elucida o papel desta condição nas periodontites, porém sugere-se que o diabetes seja um fator de risco para a gengivite (Raslan et al., 2015) - condição de estudo deste trabalho. Por se tratar de uma doença que resulta de uma interação entre a predisposição genética e fatores de risco, caracteriza-se por ter suscetibilidade aumentada às infecções, dificuldade no processo de reparo e cicatrização, retinopatia, nefropatia e alta relação com índices de mortalidade associada a progressão da doença sem acompanhamento profissional. Embora a hipótese genética ainda esteja sendo estudada em pacientes com diabetes do tipo 2, pode haver evidências de que fatores de risco do cotidiano como a obesidade e o

sedentarismo sejam os principais determinantes desta condição. Porém as razões específicas para o desenvolvimento destas anomalias ainda não são conhecidas (American Diabetes Association, 2012).

O impacto das doenças periodontais é geralmente estabelecido por parâmetros clínicos como profundidade de bolsa e nível de inserção clínica. Porém, a doença periodontal através de seu processo inflamatório, que pode evoluir para destruição óssea, produz outros sinais e sintomas que advem do resultado da interação entre o componente microbiológico e o sistema imunológico que pode ou não interferir no dia-a-dia ou na qualidade de vida do indivíduo, o que ainda foi pobremente estudado. Em décadas mais recentes observou-se que, na verdade, apenas uma pequena variabilidade microbiológica em relação aos indivíduos não diabéticos é observada (Mealey, 1999). A maior prevalência de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) pode ser uma indicação de progressão da saúde para doença periodontal ou da gengivite para periodontite, uma vez que estas espécies estão relacionadas diretamente à ocorrência e severidade das doenças do periodonto associadas ao biofilme (Socransky et al., 1998; Fine et al., 2007; Teles et al., 2008; Cortelli et al., 2008). Essa baixa variabilidade entre as espécies bacterianas, induziu a uma atenção especial às respostas imunoinflamatórias. Células de defesa podem produzir elevada concentração de citocinas proinflamatórias frente a estes patógenos, como as interleucinas proinflamatórias 1 β (IL-1 β) que foram encontradas em dobro no fluido crevicular de indivíduos com diabetes que possuíam doença periodontal (Engelbreton et al., 2004), o que contribui para uma resposta inflamatória elevada e

organiza a ideia de associação entre a glicemia e a progressão para destruição periodontal.

A degradação microbiana na cavidade bucal muitas vezes está relacionada com a produção de malodor (halitose) que é resultado da presença de Compostos Sulfurados Voláteis (CSV) originados desta atividade bacteriana. CSV são produzidos principalmente pelo processo de degradação proteolítica de peptídeos de bactérias anaeróbias Gram-negativas (Krespi et al., 2006) e indivíduos que tiveram histórico de malodor relatam um impacto negativo sobre sua qualidade de vida. Pacientes diabéticos tendem a apresentar maior nível de halitose em decorrência de suas alterações metabólicas, sobretudo em função da hiperglicemia (Southerland et al., 2005).

O tratamento da doença periodontal em indivíduos com diabetes tem demonstrado bons resultados clínico-profissionais nos níveis de mediadores da inflamação, na microbiota específica e em aspectos clínicos de sangramento gengival e malodor bucal. De forma cautelosa, espera-se que a modificação de alguns destes parâmetros possa ser perceptível pelos indivíduos o que colaboraria para um efeito positivo indicado pela melhora nos índices de qualidade de vida relacionados a condição bucal.

Assim, após a investigação da resposta ao tratamento gengival de indivíduos diabéticos através dos desfechos tradicionais, no presente estudo nosso grupo pretendeu em uma análise complementar de aspectos qualitativos entender o cenário da auto-percepção das melhoras provenientes do tratamento e seu impacto na qualidade de vida dessa população.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gengivite - Generalidades

A gengivite é uma doença inflamatória reversível que afeta os tecidos periodontais de proteção, cuja etiologia primária é o biofilme dental (Løe et al., 1965), e que pode se correlacionar com doenças crônicas como o diabetes melito (AAP, 1999). Num estágio inicial, há uma grande proliferação de arteríolas e vênulas e a pressão hidrostática presente nesta microcirculação aumenta, favorecendo a permeabilidade da parede desta rede microvascular e permitindo que proteínas e o fluido, de uma maneira geral, venham a exsudar no interior dos tecidos (Kinane, 2001), elucidando os sinais clássicos de edema, rubor, sensibilidade, sangramento espontâneo ou provocado e graus de halitose (Morita & Wang, 2001). Sua classificação, segundo aspectos histopatológicos, foi definida por Page & Schroeder (1976). Na “lesão inicial” encontra-se uma gengiva clinicamente sadia com placa recente. Microscopicamente há arteríolas, capilares e vênulas que aumentam a permeabilidade do exsudato. O infiltrado infamatório migra do tecido conjuntivo para a região do epitélio juncional e do sulco gengival e quando ativados nos tecidos produzem interleucina 1 α (IL-1 α), IL-1 β , interleucina 8 (IL-8), TNF- α , leucotrienos e metaloproteinases (MMP). Na “lesão precoce” geralmente ocorre após sete dias de acúmulo de placa e as alterações são verificadas através de exame clínico (Løe et al., 1965; Page & Schroeder, 1976). O infiltrado inflamatório é maior e ocupa 15% do local de destruição do colágeno. A atividade de macrófagos determina a liberação de citocinas IL-1 β , IL-1 α , IL-8, TNF- α (Drugarin et al., 1988). Até este estágio ainda

caracteriza-se dentro de conceitos da gengivite. E, finalmente na “lesão estabelecida”, prevalece a presença de edema e sangramento. É dominada por plasmócitos, há perda de colágeno e um grande acúmulo de leucócitos (Kinane et al., 2010). O epitélio juncional é substituído pelo epitélio da bolsa, que é mais permeável à passagem de substâncias vindas do tecido conjuntivo subjacente. Este estágio já caracteriza um estado de periodontite.

O biofilme dental, anteriormente chamado de placa dental, é uma massa constituída por elementos extracelulares de origem bacteriana, exsudato do sulco gengival e uma comunidade intensa de microrganismos (Lang et al., 1999; Marshall, 2004). Em 1998 Sokransky et al. analisaram várias amostras de biofilme e definiram alguns agrupamentos bacterianos denominados por cores. As espécies mais relacionadas com periodontite formaram o complexo vermelho do qual fazem parte *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e o complexo verde do qual faz parte *A. actinomycetemcomitans*.

Dentro da condição caracterizada como gengivite, células inflamatórias são encontradas, como linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Kinane, 2001) embora a predisposição do hospedeiro seja fundamental para a evolução da doença. Løe et al. (1986) ao avaliarem um programa de prevenção, descreveram que a gengivite precede a periodontite, que nem toda gengivite progride para periodontite e que as doenças periodontais podem ser modificadas e/ou potencializadas por fatores externos como o tabagismo e doenças cônicas como o diabetes.

2.1.1 Citocina pró-inflamatória IL-1 β

As citocinas são polipeptídeos que exibem, entre diversas funções, o papel de mediadores químicos inflamatórios. Suas principais células produtoras são os linfócitos, monócitos, macrófagos e neutrófilos, bem como células epiteliais e fibroblastos (Drugarin et al., 1988) e encontram-se em forma de grânulos no interior de estruturas citoplasmáticas. São classificadas como proinflamatórias que incluem TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, sendo que as duas primeiras produzem efeitos semelhantes e estão envolvidas na evolução da doença rumo ao processo de reabsorção óssea e as antiinflamatórias que incluem IL-4, IL-10 e IL-13. As proinflamatórias chamam a atenção porque induzem a dilatação e permeabilidade vascular além de induzirem a resposta inflamatória (Okada et al., 1997). Acerca do papel da IL-1 β , esta induz a síntese de prostaglandinas (PG) por meio de macrófagos e fibroblastos gengivais aumentando a permeabilidade vascular e desmineralização óssea, facilitam ativação de linfócitos T e B na ativação e secreção de anticorpos e ainda induzem febre por sintetizar PG (Taylor et al., 1998).

2.1.2 Parâmetros microbiológicos

Estudos longitudinais tem associado a presença de algumas espécies bacterianas em indivíduos com saúde gengival e periodontal (Papapanou, 1997; Tanner et al., 1998; Cortelli et al., 2002). Estimam-se que mais de setecentas espécies bacterianas distintas colonizem os tecidos bucais, embora a maioria vivam em harmonia com o hospedeiro (Paster et al., 2001; Kazor et al., 2003; Aas et al., 2005). A composição do biofilme depende de sua localização e do seu grau de

maturidade. Entre três e doze semanas de formação o biofilme subgengival se diferencia pela presença de bactérias anaeróbias Gram-negativas, como *Porphyromonas gingivalis* (Li et al., 2004; Kuramitsu et al., 2005).

Como mencionado em 1998, Sokransky et al. distinguiram associações específicas entre as espécies bacterianas para promoção de saúde ou doença periodontal. Examinaram mais de 13.000 amostras de placa subgengival de 185 participantes e organizaram grupos bacterianos de acordo com a especificidade deles e suas semelhanças. A espécie *Porphyromonas gingivalis* foi enquadrada no complexo vermelho e sua prevalência chegou a 93% em participantes com periodontite. *P. gingivalis* é um bastonete, anaeróbio obrigatório, apresenta limitada capacidade de fermentar carboidratos e é proteolítico. Possui fímbrias com as quais adere a células epiteliais e a outras espécies (co-agregação), além de produzir proteases (colagenase e fosfolipase A) e ser considerada a mais proteolítica dentre as bactérias Gram-negativas da boca (Haffajee & Sokransky, 1994). A atividade proteolítica desta bactéria é conferida por proteínas chamadas gingipaínas, que desempenham papel importante na adesão, degradação e evasão das respostas do hospedeiro e são consideradas os fatores de virulência mais potentes desta bactéria, que ligam e clivam uma ampla gama de proteínas do hospedeiro (Fitzpatrick et al., 2009).

Estudos demonstram que *P. gingivalis* está ausente ou muito pobremente presente em participantes com saúde periodontal ou na gengivite (Haffajee & Sokransky, 1994; Takeuchi et al., 2001) e por outro lado, encontrada facilmente nas formas destrutivas da doença, em sítios de bolsas profundas, em sítios de progressão de doença periodontal e em bolsas recorrentes (Sokransky, 1988; Haffajee 1994; Grossi et al., 1994; Mombelli et al., 2000). Todavia, o papel dessa

bactéria nos quadros de gengivite de pacientes com doenças sistêmicas tem sido pouco investigado. Segundo Fitzpatrick et al. (2009) *P. gingivalis* se relacionam a doenças cardíacas e diabetes.

Tannerella forsythia, previamente chamada de *Bacteroides forsythus* e *Tannerella forsythensis*, também classificada no grupo vermelho segundo Sokransky et al. (1998), é um bastonete anaeróbio, Gram negativo, fortemente relacionado com o aumento da profundidade da bolsa tornando-se, desta forma, uma das principais espécies presentes em sítios que se converteram de periodontalmente saudáveis para doentes, estão em maiores proporções em regiões com periodontite que naqueles indivíduos com periodonto saudável e apresentam maior risco para perda óssea alveolar, perda de inserção e do elemento dentário quando comparado a indivíduos nos quais a espécie não foi detectada (Haffajee & Sokransky, 2009). Após a terapia periodontal bem sucedida a presença deste microrganismo encontra-se reduzida (Teles et al., 2008).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, anteriormente chamado de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, classificado no grupo verde segundo Sokransky et al. (1998), anaeróbio facultativo, possui prevalência em sítios subgengivais, chegando a 68% em casos de periodontite crônica, a 97% das periodontites agressivas, 18% de jovens adultos saudáveis (Zambon et al., 1996; Cortelli et al., 2000) e em inflamações gengivais (Melvin et al., 1994), portanto muito associado ao biofilme subgengival de bolsas profundas (Cortelli et al., 2004). Dentre os fatores de virulência citam-se a presença de fímbrias, adesinas, vesículas de membrana extracelular, produção de lucotoxinas, inibidores de células epiteliais e fibroblastos. Com isso, é capaz de invadir o tecido gengival e promover absorção óssea (Cortelli et al., 2004; Graves et al., 2008).

2.2 Compostos Sulfurados Voláteis - CSV

A palavra halitose é derivada do latim “*halitus*”, que significa exalação e é utilizado para referenciar o malodor ou odor perceptivelmente desagradável. Normalmente o hálito humano é inodoro ou pouco perceptível e torna-se um importante problema de saúde pública quando causa constrangimento em si mesmo e/ou àqueles que a possuem, percentual de incidência que atinge cerca de 30% da população brasileira (Associação Brasileira de Halitose - ABHA).

Várias pessoas sofrem por ter halitose que pode ser sinal ou sintoma de várias desordens sistêmicas e bucais. Cerca de 85% da halitose tem origem bucal, 10% se origina da região de orofaringe/nariz/ouvido e apenas 5% se relaciona a desordens endócrino/gastrointestinais (Tonzetich, 1971). Segundo Quirynen et al. (2009) das causas orais, língua saburrosa representa 43%, gengivite/periodontite 11% e 18% combinação dos dois. Para outros autores em 80-90%, a causa da halitose não é somente em função de uma higienização inadequada e sim por gengivite e periodontite (Oho et al., 2001; Van den Velde et al., 2007; Calil et al., 2009).

A língua saburrosa é a maior causa de mau odor (Roldán et al., 2003). O dorso irregular da região posterior da língua, com aproximadamente 26cm², é um nicho ideal para bactérias orais (Collins & Dawes, 1987). Trabalho de Allaker et al. (2008), mostra que a região dorsal posterior da língua tem concentração de bactérias Gram-negativas, anaeróbias e aquelas produtoras de CSV aumentadas juntamente com o aumento da intensidade de mau hálito, concluindo portanto que esta região da língua apresenta a maior carga de bactérias que contribuem para o mau hálito. Por causa da descamação de células epiteliais e alimentos

remanescentes que estão presentes, a putrefação ocorre, servindo, desta forma, como um importante reservatório para a recolonização da superfície dos dentes (Faveri et al., 2006). A saburra não é fácil de remoção, daí a necessidade de sua higienização e remoção do substrato que será metabolizado, além de promover uma melhora na sensação do paladar (Quirynen et al., 2004).

Estudos tratam a halitose como resultado da presença de Compostos Sulfurados Voláteis (CSV) originados da boca ou do ar exalado dela. Foi observado que não há diferença significativa entre a prevalência de halitose e idade, porém observou-se que as mulheres são mais preocupadas que os homens sobre o seu hálito e o papel dele em suas relações cotidianas (Hughes & McNab, 2008). Os estudos ainda revelam que o mau hálito frequentemente não é sentido pela própria pessoa (Eli et al., 2001).

Espécies patogênicas que colonizam o ambiente subgengival de pacientes com gengivite (Pereira et al., 2012; Eicke et al., 2013) produzem CSV. Com o desenvolvimento do processo inflamatório e possível aprofundamento do sulco gengival, os níveis bacterianos totais tendem a aumentar, inclusive os produtores de CSV (Ge et al., 2013). Segundo Tonzetich (1977), os principais subprodutos resultantes do processo de degradação incluem sulfetos de hidrogênio (H_2S), metil-mercaptanas (CH_3SH) e dimetil sulfeto (CH_3SCH_3). Estes provocam odores fétidos em 90% dos casos e tem ação deletéria sobre os tecidos periodontais (Sokransky & Haffajee, 2005) além de serem tóxicos durante o processo de cicatrização de cirurgias periodontais e de implantes dentários (Yaegaki et al., 1986). Outras moléculas voláteis menos importantes no processo de degradação bacteriana também estão envolvidas, como as diaminas (putrescina e cadaverina). Estes componentes também são produzidos durante a degradação proteolítica de

peptídeos e os substratos mais predominantes na produção de CSV são a cisteína, cistina e metionina (Goldberg & Kozlovsky, 1994; Greeman et al., 2004).

Em pacientes com Doença Periodontal, apesar de ainda não ser muito claro, a metilmercaptana foi encontrada em maior quantidade que o sulfeto de Hidrogênio (Yaegaki & Sanada, 1992). Segundo os mesmos autores, a quantidade total de CSV e os níveis de metilmercaptana e sulfeto de hidrogênio foram maiores em pacientes com doença periodontal que em pacientes saudáveis.

Entre os exames realizados para diagnóstico de halitose, o organoléptico continua como a referência (Greenman & Rosenberg, 2005; Laleman et al., 2014) pela sua facilidade e dispensa de qualquer equipamento. Porém é um exame subjetivo e requer treino e calibração adequada entre os examinadores. A cromatografia gasosa talvez seja o mais fiel (Murata et al., 2002) pois identifica os gases sulfurados de forma isolada, porém é um aparelho com dimensões grandes, oneroso e necessita de treinamento de pessoal, o que o torna uma avaliação não rotineira (Furne et al., 2002). Já o monitor de sulfeto (Halimeter®), além de ser portátil e de fácil manuseio, determina a concentração total dos três gases sulfurados voláteis mais importantes (sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana e dimetil sulfeto) e seus resultados já são correlacionados com aqueles obtidos no exame organoléptico (Iwanicka-Grzegorek et al., 2005; Laleman et al., 2014; Seemann et al., 2014), tornando-o assim, também um exame de escolha para o diagnóstico de halitose.

É possível que a presença de metilmercaptana dentro de uma bolsa periodontal esteja envolvida na indução ou progressão da doença periodontal. Yaegaki & Coil (1999) publicaram que o aumento nos níveis de metilmercaptana e sulfeto de hidrogênio no sulco gengival está relacionado com bolsas profundas ou

simplesmente bolsas sangrantes. O autor ainda refere que CSV são encontrados em maiores níveis em gengivas inflamadas que em gengivas saudáveis. Como os CSV são potencialmente capazes de alterar a permeabilidade dos tecidos gengivais, podem desempenhar papel na patogênese da gengivite e periodontite, degradando colágeno e levando a uma menor síntese de colágeno. Metilmercaptanas podem provocar ainda outras mudanças deletérias na matriz extracelular além de poder interferir na resposta imune dos tecidos periodontais às bactérias do biofilme. Outros achados incluem inibição da migração celular dentro do ligamento periodontal, alteração da síntese de proteínas dos fibroblastos além é claro da produção do malodor (Ratkay 1995; Ratcliff & Johnson, 1999; Torresyap et al., 2003). Ratcliff & Johnson (1999) também demonstraram através de experimentos in vitro a secreção de citocinas associadas à doença periodontal.

Porphyromonas gingivalis é um dos microrganismos que produzem a maior quantidade de *metilmercaptana* havendo, portanto, uma relação quantitativa entre níveis de *P. gingivalis* e a condição de halitose (Kato et al., 2005). Citam-se ainda como produtores de CSV, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. A presença destes organismos no biofilme dental pode ser detectada por várias técnicas laboratoriais e em testes para consultório como aquele que se baseia na habilidade bacteriana de hidrolizar o substrato peptídico sintético Benzoyl-DL-Arginine-Naphthylamide – BANA (Loesche et al., 1990; Kozlovsky et al., 1994) que é adicionado em fitas sensíveis e na presença destes microrganismos durante coleta de amostra de placa, tornam-se azuis por serem colorimétricos. Quanto maior a intensidade do azul, maior a concentração do microrganismo. Quando estes indivíduos se queixando de halitose foram estudados, os resultados BANA obtidos

de vários sítios, dentre eles a saliva, bolsa periodontal e língua, foram relacionados com o malodor (Kozlovsky et al., 1994).

Ao relacionar microorganismos com Compostos Sulfurados Voláteis, entre as cepas bacterianas, a cepa W83 de *P. gingivalis* foi a que produziu a maior quantidade de metilmercaptana; cepa que também é conhecida por ter um alto poder de invasão e portanto, possível prever que a metilmercaptana seja um dos fatores de virulência da *P. gingivalis* (Coil & Tonzetich, 1992).

Vários são os desafios que o portador de gengivite encontra frente aos sinais e sintomas da doença. Dentre esses a halitose e o sangramento gengival parecem ser queixas bastante frequentes e muitas vezes responsáveis pela procura por atendimento especializado. Eli et al. (2001), publicaram dados relatando que os pacientes possuem uma imagem própria sobre seu hálito e que esta imagem varia de pouca ou nenhuma distorção até psicopatologias severas. Por isso a auto-percepção deve sempre ser confrontada com dados objetivos.

2.2.1 Classificação dos CSV

Lu (1982) foi a primeira a classificar a halitose e naquele momento excluía a influência perceptiva da pessoa. Em 1992, a OMS discutiu uma nova classificação, que se mostrou incompleta e impraticável. No início do século, Yaegaki & Coil (2000) reeditaram o diagnóstico do mau hálito. Nesta classificação, a pseudo-halitose é diagnosticada quando o mau hálito não está presente, porém o indivíduo acredita apresentar o problema. Se mesmo após o tratamento ele continuar afirmando, o diagnóstico se altera para halitofobia, conforme quadro mostrado a seguir.

Pacientes com halitofobia apresentam comportamento semelhante a de pessoas (cobrir o nariz ou afastar-se) com halitose, daí a necessidade de avaliar a percepção individual quanto a condição de hálito e comparar com resultados coletados por profissionais.

A Figura 1, a seguir, mostra a classificação da halitose:

1) Halitose Genuína		Malodor evidente com intensidade além do socialmente aceito
a) Halitose fisiológica		1. Malodor ocorre por processo de putrefação na cavidade oral. Não associa a doença. 2. Origem frequente da região posterior do dorso da língua. 3. Fatores temporários (ex: alho) devem ser excluídos)
b) Halitose patológica		
i) Oral		1. Condição de doença/patologia de tecidos orais. 2. Halitose derivada da saburra da língua por condição patológica (ex: doença periodontal, xerostomia)
ii) Extra-oral		1. Malodor com origem nasal, paranasal e/ou laríngea. 2. Malodor com origem do trato pulmonar ou digestivo superior. 3. Malodor de doenças sistêmicas emitido pelos pulmões (ex: diabetes, cirrose hepática, uremia, hemorragia interna)
2) Pseudo-halitose		1. Malodor não sentido por outros, apesar do paciente reclamar de sua existência.
3) Halitofobia		1. Depois do tratamento da Halitose Genuína ou pseudo-halitose, o paciente insiste em acreditar que ele tem halitose.

Figura 1: Classificação da halitose.
Fonte: Yaegaki & Coil (2000).

2.3 Diabetes Melito do Tipo 2

A Sociedade Americana de Diabetes apontou a doença periodontal como a sexta complicação do diabetes em 1997. No Brasil há aproximadamente 14 milhões de pessoas portadoras de DM e no mundo, este número ultrapassa 370 milhões de

peessoas, segundo a *International Diabetes Federation* (IDF, 2013), podendo chegar a 19 milhões e a 500 milhões, respectivamente, no ano de 2030.

Em estágio mais avançado da doença, a produção de insulina é diminuída e não ocorre a auto-destruição de células β como no tipo 1. Esta baixa, porém existente produção de insulina, ainda mantém o sintoma de cetoacidose em níveis baixos que pode ser aumentado com estresse ou alguma condição de infecção (Rhodes, 2005).

Alguns fatores determinam a manifestação, gravidade e progressão desta doença, como por exemplo, fatores genéticos, condições sócio-econômicas e composição microbiana (Nunn, 2003).

O diagnóstico de diabetes tipo 2, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, normalmente é feito usando três exames: 1) Glicemia de jejum, 2) Hemoglobina glicada e 3) curva glicêmica. A glicemia de jejum é um exame que mede o nível de açúcar no seu sangue naquele momento, servindo para monitorização do tratamento do diabetes. Os valores de referência ficam entre 65 a 99 miligramas de glicose por decilitro de sangue (mg/dL). Assim, valores acima de 100mg/dL requerem investigação adicional enquanto valores repetidos acima de 126mg/dL ou isolados acima de 200mg/dL são considerados diagnósticos para diabetes tipo 2. Por outro lado, a hemoglobina glicada (HbA1c) é a fração da hemoglobina (proteína dentro do glóbulo vermelho) que se liga a glicose. Durante o período de vida da hemácia - 90 dias em média - a hemoglobina vai incorporando glicose, em função da concentração deste açúcar no sangue. Se as taxas de glicose estiverem altas durante todo esse período ou sofrer aumentos ocasionais, haverá necessariamente um aumento nos níveis de hemoglobina glicada. Dessa forma, o exame de hemoglobina glicada consegue mostrar uma média das concentrações de

hemoglobina em nosso sangue nos últimos meses. Os valores da hemoglobina glicada irão indicar presença ou não de hiperglicemia, iniciando uma investigação para o diabetes tipo 2. Para as pessoas saudáveis valores entre 4,5% e 5,7% são considerados normais enquanto valores iguais ou superiores a 6,5% indicam diabetes.

Finalmente, o exame de curva glicêmica simplificada mede a velocidade com que o corpo absorve a glicose após a ingestão. Os valores de referência são: a) Em jejum: abaixo de 100mg/dl; b) após 2 horas: 140mg/dl; c) curva glicêmica maior que 200 mg/dl após duas horas da ingestão de 75g de glicose é suspeito para diabetes.

2.3.1 DM tipo 2 - Diagnóstico

A Sociedade Brasileira de Diabetes recomenda como critério de diagnóstico de diabetes tipo 2 as seguintes condições:

- Hemoglobina glicada maior que 6,5% confirmada em outra ocasião (dois testes alterados);
- Uma dosagem de hemoglobina glicada associada a glicemia de jejum maior que 200 mg/dl na presença de sintomas de diabetes;
- Sintomas de urina e sede intensas, perda de peso apesar de ingestão alimentar, com glicemia fora do jejum maior que 200mg/dl;
- Glicemia de jejum maior ou igual a 126mg/dl em pelo menos duas amostras em dias diferentes;
- Glicemia maior que 200mg/dl duas horas após ingestão de 75g de glicose.

2.4 Relações entre DM Tipo 2 e parâmetros clínicos, halitométricos e microbiológicos.

O diabetes melito (DM) é uma doença crônica de complicações sistêmicas e bucais, resultante da deficiência de secreção de insulina – hormônio que regula a homeostase da glicose, em função da disfunção de células β do pâncreas ou então pela resistência à ação de insulina no tecido muscular, fígado ou em ambos (Mealey & Ocampo, 2007). Por ser uma síndrome, esta patologia de distúrbio glicêmico afeta diretamente os sistemas circulatório e neural, afeta visão (retinopatia) e rins. Os sintomas mais comuns, menos graves, com progressão mais gradual e em função da hiperglicemia, são polidipsia, poliúria, perda de peso, polifagia, visão turva e doença periodontal (Mealey & Ocampo, 2007), sendo esta última condição considerada a sexta complicação da síndrome (Orso & Pangnongcelli, 2002; Kawamura, 2005).

O fluxo salivar reduzido favorece o aumento de microrganismos e o risco para desenvolvimento de doenças gengivais, periodontais e halitose. Além da redução vinculada ao sono, condições como alcoolismo, desnutrição, crises emocionais, uso de medicamentos (anti-hipertensivos, antidepressivos, anti-histamínicos, diuréticos) e doenças crônicas como o diabetes melito são fatores que afetam a taxa de fluxo salivar (Lorenzo, 2004). Aqueles que utilizam hipoglicêmicos orais podem sofrer de xerostomia e predisposição a infecções como lesão fúngica (Ueta et al., 1993). Ainda, pacientes diabéticos tendem a apresentar maior nível de halitose em decorrência de suas alterações metabólicas, sobretudo em função da hiperglicemia (Negrato & Tarzia, 2010). Por aumentar o risco à vários problemas bucais (Atkinson, 1994) a diminuição na produção de saliva contribui para efeitos negativos sobre a

qualidade de vida do paciente. Essa situação se agrava quando se considera a relação entre baixo fluxo salivar e dificuldades ao falar, comer, deglutir e degustar (Von Bultzingslowen et al., 2007).

Em aspectos clínicos, existem interações potenciais envolvendo condições sistêmicas e orais (Pihlstrom & Michalowicz, 2005; Kinane et al., 2006). Pacientes diabéticos com periodontite apresentam risco de perda óssea até três vezes maior quando comparado a não diabéticos (Shlossman et al., 1990; Emrich et al., 1991; Papapanou, 1997). Adicionalmente, a perda de inserção periodontal tem sido mais frequentemente encontrada em pacientes com pobre controle glicêmico do que em participantes com a doença bem controlada (Westfelt et al., 1996). Outros estudos evidenciam que o baixo controle glicêmico se apresenta como importante fator de risco para a prevalência e severidade da inflamação gengival e consequentemente seus sinais clínicos, como o sangramento (Ervasti et al., 1985; Tervonen & Oliver, 1993; Genco & Löe, 1993; Karjalainen & Knuuttila, 1996; Campus et al., 2005).

O oposto também pode ocorrer. A resistência à insulina pode desenvolver-se em resposta à infecção bacteriana crônica observada na doença periodontal, piorando o controle metabólico nos pacientes diabéticos (Grossi et al., 1996). Embora a maior parte das publicações refira-se ao estado de periodontite, uma hipótese similar para gengivite parece plausível (Atkinson & Maclaren, 1990). Ainda que poucas investigações foram conduzidas em diabéticos com gengivite, uma condição que parece ser bastante relevante mediante dois aspectos principais: a história natural das doenças periodontais e a alta taxa de periodontite em diabéticos.

Ervasti et al. (1985) observaram maiores níveis de sangramento e Soory, (2000) maiores níveis de cicatrização deficiente de feridas em pessoas com diabetes que naquelas que não possuíam a doença. Isto foi observado com maior frequência

em pessoas com menor controle glicêmico. Por outro lado, há resultados importantes mostrando o impacto da terapia periodontal na melhora do controle glicêmico. O tratamento periodontal em fase inicial, através da orientação, motivação do paciente e aplainamento radicular nos pacientes diabéticos tipo 2, resultou em melhor controle metabólico do diabetes (Stewart et al., 2001; Kiran et al., 2005; Santos et al., 2013).

As espécies microbianas subgengivais de pacientes com diabetes são predominantemente microrganismos Gram-negativos assemelhando-se a microbiota de não-diabéticos (Zambon et al., 1988; Mealey, 1999; Sbordone et al., 1995, da Cruz et al., 2008), sugerindo então que as alterações imunológicas teriam um papel fundamental no processo de destruição periodontal. Em um estudo de periodontite e diabetes melito tipo 2, Ebersole et al. (2008) descreveram que houve uma maior frequência de *Porphyromonas gingivalis* e outras bactérias no grupo com a doença sistêmica. Assim, a baixa variabilidade entre as espécies bacterianas tem induzido uma atenção especial à análise das respostas imunoinflamatórias. Células de defesa podem estar produzindo elevada concentração de citocinas próinflamatórias frente a estes patógenos, como IL 1 β que aumenta a destruição tecidual (Salvi et al., 1997). Estas citocinas quando alteradas podem aumentar a atividade de transição de gengivite para periodontite (Andriankaja et al., 2009) as quais, segundo Engebredson et al. (2004) e Nagata (2009), possuem incidência de duas a três vezes maior em pacientes diabéticos do que em não-diabéticos.

O monitoramento da relação destes mediadores pró-inflamatórios tem se mostrado relevante para o estudo da etiopatogênese da doença periodontal em diabéticos. O entendimento na fisiopatologia da inflamação no fluido crevicular é importante para se entender o papel de suas citocinas. Participantes diabéticos com

periodontite apresentam níveis mais elevados de IL-1 β no fluido gengival que não diabéticos com grau semelhante de doença periodontal (Salvi et al., 1997). A maior liberação dessas citocinas pelos monócitos e macrófagos em pacientes com diabetes torna mais difícil o controle glicêmico (Iacopino, 2001; Brownlee, 2003). O alto nível glicêmico resulta em glicosilação de numerosas proteínas, levando ao acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGE), que são importantes na atuação de complicações diabéticas (Brownlee, 1994). Quanto maior o número de ligações das AGE aos macrófagos e monócitos, maior a alteração fenotípica destas duas células inflamatórias e maior a liberação de citocinas que por sua vez, retardam o processo de reparo e cicatrização de feridas (Iacopino, 1995).

Apesar da doença se desenvolver de forma diferente em cada indivíduo, o controle glicêmico insuficiente tem sido associado ao aumento de risco de inflamação gengival, perda de inserção e de osso alveolar (De Pommereau et al., 1992; Taylor et al., 1998). O aumento da resistência à insulina ajuda a elucidar a maior dificuldade no controle glicêmico de diabéticos com periodontite. Justamente por isso, o controle glicêmico tende a se tornar mais fácil após a terapia periodontal (Mealey, 2006). Iwamoto et al. (2001) acrescentam que após o tratamento periodontal, há uma redução significativa em níveis séricos de TNF- α além da redução de níveis de HbA_{1c} e na sequência, a melhora no controle glicêmico.

2.5 Tratamento da gengivite

A base do tratamento da gengivite consiste na remoção diária do biofilme (Marsh, 2006) dental pois é através do biofilme que as células do epitélio do sulco e do epitélio juncional entram em contato com enzimas, endotoxinas e bactérias

nocivas que desencadearão um processo inflamatório. A terapia em pacientes periodontais tem se mostrado eficiente nestes importantes parâmetros, colaborando para a redução de níveis de citocinas IL-1 β (Yang et al., 2003; Correa et al., 2010), diminuição da quantidade e do tipo das espécies microbianas (Rosalem et al., 2011) além da esperada melhora clínica (sangramento gengival e odor).

A remoção profissional do biofilme dental é importante para a manutenção de saúde bucal e sistêmica do indivíduo. A remoção deste biofilme em sua fase inicial de maturação mantém a carga bacteriana em um nível baixo e a colonização por bactérias anaeróbias pode ser limitada (Page et al., 1997; Goodson et al., 2004). A raspagem manual supragengival é o tratamento padrão para pessoas com gengivite (Westfelt, 1996), tendo como objetivo principal a remoção de cálculo e biofilme dental (Costerton & Stewart, 2001). Sokransky & Haffajee (2002) demonstraram haver o restabelecimento de uma microbiota compatível com saúde após a redução de periodontopatógenos e desorganização do biofilme dental.

Embora Lee et al. (2012) tenham relatado que o tratamento gengival manual em indivíduos sistemicamente saudáveis resultou em reduções dos índices de placa e gengival o uso de curetas requer um grande cuidado e destreza manual do profissional para atingir resultados satisfatórios, além de consumir um grande tempo de trabalho. Uma alternativa para atingir os mesmos objetivos são os instrumentos ultrassônicos (Cobb, 1996). Aparelhos ultrassônicos piezoelétricos permitem uma dinâmica linear das pontas, devendo evitar o seu uso em ângulo de 90 graus com a superfície dental e poupando perda de estrutura dental. Já os aparelhos ultrassônicos baseados na dinâmica de magnetostrição (Cavitron® - Dentsply) permitem uma dinâmica elíptica das pontas, também devendo evitar ângulo de 90 graus com a superfície dental pelo mesmo motivo (Kawashima et al., 2007).

Os agentes químicos capazes de alterar ou inibir o desenvolvimento do biofilme sem romper o equilíbrio ecológico da cavidade bucal vem potencializar os efeitos da terapia mecânica no controle do biofilme bucal (Baehni & Takeuchi, 2003). Nem todos agentes antimicrobianos são igualmente eficazes. A estrutura do biofilme bacteriano confere maior resistência contra a ação das drogas antimicrobianas comparativamente às bactérias plantônicas (estado livre). Esse fato explica, por exemplo, por que o simples uso de antibióticos no combate de microrganismos do biofilme bucal se torna ineficiente (Davey & O'Toole, 2000) como estratégia terapêutica. O processo de evolução de antissépticos bucais está na busca de agentes químicos com eficácia adequada e que produzam o menor efeito colateral possível.

Há mais de cem anos foi proposta uma combinação fixa de quatro óleos essenciais: timol (0.064%), mentol (0,042%), eucaliptol (0,092%) e salicilato de metila (0.06%). Em odontologia além de inibirem e reduzirem o biofilme e a inflamação gengival possuem as vantagens de não alterarem o paladar, não causarem pigmentação de dentes e restaurações nem tampouco facilitar a deposição de cálculo supragengival. Trabalho publicado por Charles et al. (2004) no período de seis meses em 108 participantes, no intuito de comparar resultados antiplaca, redução de gengivite e outros efeitos adversos entre enxaguatórios bucais contendo óleos essenciais e clorexidina, verificou-se que aos três e seis meses ambos apresentaram reduções significativas nos índices de placa (listerine em 18,8% e clorexidina em 21,6%) e gengival (listerine 14% e clorexidina 21,6%) quando comparados ao grupo controle, porém sem diferenças significativas entre eles mesmos. Ainda, o grupo clorexidina apresentou uma quantidade significativa

superior de manchas extrínsecas e cálculo dentário quando foi comparado aos grupos de óleos essenciais e controle.

Outro trabalho de Pilloni et al. (2010) realizado em 766 participantes com gengivite durante noventa dias no intuito de avaliar os benefícios clínicos periodontais realizando higienização bucal em associação ao uso de antissépticos à base de óleos essenciais em uma frequência de duas vezes ao dia mostrou redução significativa dos índices de placa (1,56 para 0,81) e gengival (1,95 para 1,06), concluindo assim que a recomendação da associação da escovação dental com o uso de antisséptico oral à base de óleos essenciais proporcionou benefícios clínicos perceptíveis pelo paciente e constatado pelo profissional.

Um dos aspectos que asseguram sua eficácia clínica é a boa penetrância no biofilme dental (Charles et al., 2004; Fine et al., 2005; Sharma et al., 2010; Cortelli et al., 2013). Adicionalmente, diminuem a síntese de prostaglandinas e a quimiotaxia para neutrófilos (Mendes et al., 1995). Fine et al. (2005) conduziram dois estudos utilizando óleos essenciais e demonstraram efeitos prolongados sobre a contagem total de bactérias anaeróbias Gram-negativas bem como sobre as bactérias produtoras de CSV. Estes achados podem explicar parcialmente a ação do produto sobre a redução da placa supragengival e gengivite, além do controle da halitose. Sharma et al. (2008) testaram a ação de antissépticos bucais sobre o índice de placa, índice gengival e citocinas pró-inflamatórias em oitenta adolescentes com gengivite. Após duas semanas de uso constatou-se redução significativa em todos os parâmetros. Em trabalho recente de Cortelli et al. (2013) envolvendo 337 participantes com gengivite, objetivou-se comparar os efeitos antiplaca e redução de gengivite utilizando enxaguatórios bucais sem álcool distribuídos em três grupos: óleos essenciais, cloreto de cetilpiridínico e grupo negativo. Foram realizados

registros de índices de placa e gengival e foram realizados profilaxia dental e orientação quanto ao uso dos enxaguatórios. Reavaliação dos participantes ocorreu após seis meses e os resultados demonstraram que ambos os enxaguatórios tiveram um resultado na redução dos índices de placa (31,6% para óleos essenciais e 24% para cloreto de cetilpiridínico) e gengival (6,4% e 4,4% respectivamente). Os óleos essenciais se mostraram superiores ao outro enxaguatório e ao grupo controle através de resultado demonstrado na redução de placa em 26,9% e de gengivite em 20,5%.

Em 2015, nosso grupo avaliou o impacto do DM sobre a resposta ao tratamento gengival mecânico-químico tendo como controle um grupo de indivíduos sistemicamente saudáveis com gengivite. Inicialmente os indivíduos diabéticos apresentaram maior inflamação clínica gengival. Os parâmetros inflamatórios foram os mais afetados pela condição de DM no pós-operatório. Apesar de uma resposta um pouco inferior comparativamente a não diabéticos, ambos os grupos se beneficiaram do uso diário regular de antissépticos após a raspagem ultrassônica em seção única.

2.6 Qualidade de vida e auto-percepção

Qualidade de vida é o bem-estar dos indivíduos nas sociedades. Está inserida em vários contextos como desenvolvimento social, política, emprego, segurança, educação, lazer e saúde. Não pode ser confundida com “padrão de vida”, sendo este último ligado muito mais com a renda do que a discussão do meio em que o indivíduo vive, sua saúde mental e física e grupos sociais em que ele se insere (Magee et al., 2012).

O questionário de Qualidade de Vida, ou ***Oral Health and Quality of Life - UK (OHQoL - UK)*** é um questionário que foi desenvolvido inicialmente para avaliar a qualidade de vida de indivíduos do Reino Unido, mas tem sido amplamente utilizado em outras populações. É composto por 16 questões-chave, que avaliam o efeito que os dentes, boca, gengiva e próteses provocam em diferentes situações habituais relacionadas com quatro aspectos principais da qualidade de vida, incluindo limitações funcionais, dor ou desconforto, e impactos psicológicos, sociais e comportamentais. A grande diferença deste instrumento para os demais é sua capacidade de registrar a relação entre a qualidade de vida e um estado de saúde ou de doença (modelo “estrutura-função-atividade-participação”), enquanto os demais avaliam apenas os aspectos negativos (modelo “doença-impedimento-disfunção-incapacidade”). As opções de respostas variam de “muito ruim” (escore 1), “ruim” (escore 2), “nenhum” (escore 3), “bom” (escore 4) e “muito bom” (escore 5), assim, somando cada item, o resultado final pode variar entre 16 (pior qualidade de vida) a 80 (melhor qualidade de vida) (McGrath & Bedi, 2003). A versão com adaptação transcultural para ser utilizada no Brasil já está validada (Dini et al., 2003).

Como as doenças e seus tratamentos podem afetar o bem-estar psicológico, biológico, social e econômico, todas estas áreas deveriam estar delineadas de forma que possam sempre ser questionadas ao serem aplicadas aos indivíduos. Isso permite que o impacto de diferentes doenças ou intervenções sejam analisadas de uma forma geral ou em aspectos específicos na qualidade de vida das pessoas (Webster et al., 2003).

Em geral, o tratamento periodontal é longo e envolve procedimentos não tão confortáveis. Pode ser que o tratamento periodontal não seja tão eficaz quando o

resultado dele é avaliado dentro da perspectiva do próprio indivíduo. As evidências que mostram a eficiência da terapia periodontal na qualidade de vida ainda são limitadas (Bajwa et al., 2007).

A cada ano, uma maior atenção tem sido dada à abordagem dos participantes, onde eles passam a não ser um agente exclusivo sob tratamento e investigação, mas um indivíduo que percebe, analisa e interage com o meio ambiente. Quando se objetiva propor um tratamento realmente eficaz é importante determinar a natureza das queixas que levaram o paciente a procurar cuidados odontológicos e de que modo isso afeta a sua qualidade de vida (Quality of Life – QoL). Hoje a comunidade científica reconhece o fato de que a saúde bucal tem um impacto não só físico, mas também social e no bem estar individual. Por isso as necessidades do paciente podem guiar o profissional de modo a alcançar resultados que tragam maior satisfação pessoal (Hegarty et al., 2002).

É interessante a relação entre saúde e qualidade de vida. Em algumas definições, as duas são sinônimas, indicando que suas medidas ou resultados são associados. Ao contrário, Stewart & King (1994), dizem que a qualidade de vida se refere a algo muito além da saúde. Sugerem que enquanto condições clínicas e problemas de saúde possam impactar na qualidade de vida, não são necessariamente elas a razão principal por esta percepção. Citam ainda que embora na maioria das vezes consideremos que uma má saúde geral significa menos qualidade de vida, muitas pessoas com doenças crônicas se apresentam com qualidade de vida melhor que aquelas pessoas sem doença, pois, consideram que a saúde é parte integrante dela e não a razão principal.

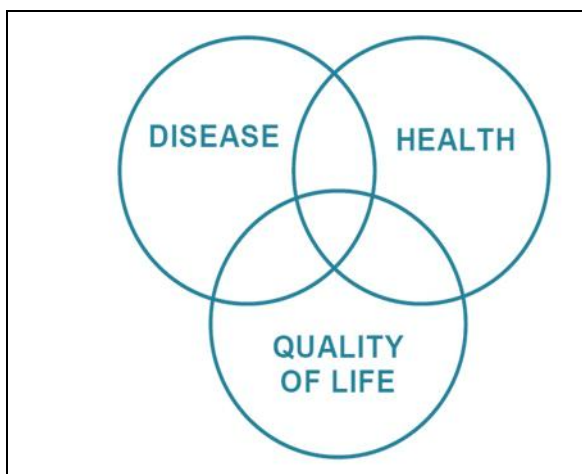


Figura 2 - Relação entre saúde, doença e qualidade de vida

Fonte: Stewart & King (1994)

No intuito de verificar a percepção da saúde bucal na qualidade de vida das pessoas, vários questionários foram desenvolvidos e tem sido aprimorados. Onze destes foram revisados em um encontro na Universidade da Carolina do Norte (Slade et al., 1998). Dois deles receberam bastante atenção: o australiano *Oral Health Impact Profile* (OHIP-14) e o inglês *Oral Health Related Quality of Life* (OHRQoL-UK); McGrath & Bedi, (2001). O primeiro é um questionário auto-aplicável sobre o impacto da condição bucal na rotina diária do participante cuja versão reduzida consta de 14 perguntas o que torna mais prática sua aplicação. Já o segundo (OHQoL-UK) possui 16 perguntas, recorre a uma ideologia da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2001) e agrega aspectos positivos e negativos na relação direta entre saúde bucal e qualidade de vida. É um questionário que avalia a relação entre as condições de saúde bucal e o bem estar dos indivíduos. Uma de suas forças é a sua compactação além de exibir padrões de correlação entre saúde bucal e qualidade de vida como um todo. No mais, o instrumento exibe boas propriedades de avaliação psicológica, física além de possuir boa consistência e poder de confiabilidade (Krespin, 1996). As 16 perguntas são categorizadas em quatro grupos (aspectos físico, psicológico, social e sintomático), conforme figura 3:

Categorias	Questões
Aspecto físico	a) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua alimentação ou na satisfação alimentar?
Aspecto físico	b) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua aparência?
Aspecto físico	c) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua fala?
Aspecto físico	d) Qual o efeito que a sua saúde bucal tem na sua saúde geral/ bem estar?
Aspecto psicológico	e) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu sono ou na capacidade de relaxar?
Aspecto social	f) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua vida social?
Aspecto social	g) Qual o efeito de sua saúde bucal nas suas relações românticas?
Aspecto físico	h) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu sorriso ou na sua risada?
Aspecto psicológico	i) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua auto confiança (ausência de situações embaraçosas)?
Aspecto psicológico	j) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua maneira de ser (ausência de preocupação)?
Aspecto psicológico	k) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu humor ou felicidade?
Aspecto social	l) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu trabalho ou nas suas atividades usuais?
Aspecto social	m) Qual o efeito de sua saúde bucal nas suas finanças?
Aspecto psicológico	n) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua personalidade?
Sintomática	o) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu conforto (ausência de dor / desconforto)?
Sintomática	p) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu hálito?

Figura 3: Categorização do instrumento OHQoL.

Fonte: Slade et al. (1998)

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento gengival sobre a qualidade de vida relacionada a saúde bucal de indivíduos diabéticos.

3.2 Objetivos específicos

Comparar o impacto do tratamento gengival sobre a qualidade de vida entre diabéticos e não diabéticos.

Avaliar a relação entre qualidade de vida auto-relatada, presença de diabetes e tratamento mecânico-químico sobre parâmetros periodontais e halitometria.

4 METODOLOGIA

Por se tratar de um ensaio clínico randomizado – RCT, algumas estratégias importantes foram tomadas para garantir sua viabilidade, oferecendo grande disponibilidade de horários para atendimento nos períodos matutino, vespertino e noturno, garantindo a aderência e retenção dos sujeitos da pesquisa. Esse ensaio clínico foi registrado no *ClinicalTrials.gov* (NCT 02123563). A amostra foi definida após a realização de um cálculo amostral. Para tanto utilizaram-se dados previamente levantados da literatura. Adotou-se nível de significância estatística de 95% e Power de 80%. Foi empregado o teste estatístico *t* par amostras independentes, com o auxílio do *software Bio Estat 5.0*.

- a) Tipo de estudo: Ensaio Clínico Randomizado duplo-cego controlado por placebo;
- b) Grupos experimentais de tratamento: teste (Listerine® *Cuidado Total*) e placebo;
- c) Período total de acompanhamento dos participantes: 90 dias;
- d) Períodos de Compliance: 30 e 60 dias.

Foram avaliados participantes com doença gengival e sem a doença em participantes com e sem DM do tipo 2, em momentos pré e pós tratamento. Os participantes fizeram inscrição voluntária no serviço de triagem da clínica de Periodontia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté-SP, atendendo a chamadas de seleção para a participação no projeto.

Os grupos experimentais foram compostos por 25 indivíduos atendendo às necessidades do cálculo amostral. Considerando-se uma probabilidade de perda

amostral (*drop out*) de até 20% em seis grupos totais (descritos a seguir), a amostra obtida foi de 150 indivíduos.

A todos os participantes recrutados foram oferecidas orientações verbais e escritas sobre os objetivos, método, benefícios e eventuais riscos relacionados à participação na pesquisa, com assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade de Taubaté (UNITAU) sob protocolo nº 522/10 (anexo A), garantindo aos participantes princípios da beneficência, justiça, autonomia e equidade.

4.1 Critérios de elegibilidade

4.1.1 Critérios de Inclusão

No grupo diabéticos foram incluídos indivíduos de ambos os gêneros, entre 18 e 35 anos de idade, apresentando no mínimo vinte dentes, ausência de evidente saburra lingual, diagnóstico de gengivite (acima de 30% dos sítios com sangramento à sondagem segundo López et al. (2002) e Souto et al. (2011) e Diabetes Melito tipo 2 (American Diabetes Association, 2012). Para o grupo controle foram selecionados indivíduos sistemicamente saudáveis e com gengivite. Os outros quesitos foram mantidos para este grupo.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos que apresentaram: (1) diagnóstico de periodontites assim como qualquer tipo de crescimento gengival; (2) diabetes tipo 1; (3) outra doença ou condição imunossupressiva; (4) gestante ou lactante; (5) indivíduos portadores de aparelhos ortodônticos fixos ou próteses extensas; (6) tratamento periodontal prévio em um período de 12 meses ao início do estudo; (7) uso de antibióticos locais e sistêmicos nos últimos três meses ou anti-inflamatórios no último mês; (8) uso contínuo de medicações que possam alterar os níveis de glucose sanguínea (esteróides e diuréticos); (9) necessidade de profilaxia antibiótica; (10) uso rotineiro (2x/dia) de antissépticos bucais nos últimos 3 meses.

4.2 Grupos de tratamento

Os grupos diabetes e controle receberam raspagem ultrassônica em sessão única, orientação de higiene bucal e foram randomizados em dois subgrupos: grupo com enxaguatório bucal à base de óleos essenciais - Listerine® (n=50) com frequência de uso em duas vezes ao dia por 90 dias consecutivos ou grupo placebo (n=50) executando bochechos no mesmo regime diário (Figura 4). Já o grupo controle negativo, pela ausência de doença gengival antes da randomização em óleos essenciais ou placebo recebeu deplacagem profissional através de profilaxia seguida de orientação de higiene bucal. Em todos os grupos apenas o primeiro bochecho foi supervisionado.

Grupo	<u>Características clínicas</u>	<u>Tratamento</u>		<u>Total</u>
		<u>Teste</u>	<u>Placebo</u>	
Diabetes	diabetes tipo 2 + gengivite	n = 25	n = 25	n = 50
Controle	não-diabéticos + gengivite	n = 25	n = 25	n = 50
Controle Negativo	não-diabéticos + saúde gengival (sem gengivite)	n = 25	n = 25	n = 50

Figura 4: Descrição dos grupos experimentais

4.2.1 Aleatorização

Para propiciar o mascaramento dos grupos, foi realizado um processo de Aleatorização Estratificada Central que consistiu em utilizar 150 envelopes opacos contendo as identificações dos grupos óleos essenciais e placebo. Os envelopes foram lacrados, embaralhados e posteriormente numerados em ordem sequencial. A cada novo indivíduo que entrou no estudo foi aberto um envelope de numeração subsequente por um indivíduo cego para o tipo de intervenção.

4.2.2 Tratamento

Todos os participantes previamente selecionados foram divididos em blocos semanais para o início do tratamento que foi realizado por dois periodontistas a partir de março de 2012. Os participantes com gengivite receberam raspagem dental ultrassônica (Cavitron Select – Dentsply) e profilaxia com taça de borracha e pasta profilática para remoção de manchas extrínsecas, biofilme e cálculo.

Os indivíduos receberam instruções de higiene oral sobre a técnica de escovação e utilização de fio/fita dental. Cada participante recebeu um kit para

controle mecânico do biofilme supragengival contendo um tubo de dentifrício fluoretado (Colgate tripla ação), uma escova de dentes multitufos com cabeça pequena e cerdas macias (Johnson & Johnson – Eco 30) e um rolo pequeno de fio dental (Johnson & Johnson – Reach – expansionplus).

Com a finalidade de garantir o cegamento dos participantes, tanto os óleos essenciais/Listerine® Cuidado Total como a solução placebo (Terapêutica, Taubaté - SP, Brasil) foram dispensados em frascos plásticos idênticos. A solução placebo foi manipulada (Rondofarma, Rondonópolis, MT, Brasil) de acordo com a fórmula do Listerine® cuidado total, mantendo-se os ingredientes não ativos e mimetizando ao máximo cor e sabor. Anteriormente ao armazenamento da solução placebo, os frascos foram lavados com água destilada cinco vezes ao dia (dez minutos cada lavagem) por cinco dias, eliminando possíveis resíduos.

Adicionalmente, todos os participantes receberam dosadores plásticos com uma marca indicando o volume de 20ml o qual foi utilizado em cada um dos dois bochechos diários (bochechos 20ml/2x/dia/30seg) durante 90 dias. O primeiro bochecho foi realizado no próprio local do estudo de forma supervisionada por um dos membros da equipe designado para essa função. Os bochechos subsequentes foram realizados em casa, seguindo orientações fornecidas.

Mensalmente, cada participante recebeu de acordo com seu grupo três frascos (500ml) de antisséptico teste ou placebo. As trocas dos enxaguatórios ocorreram ao final do primeiro e segundo meses quando um novo kit de controle mecânico também foi fornecido e nova instrução de higiene bucal foi oferecida.

4.2.3 Avaliação Clínica e Radiográfica

Para a verificação clínica que este trabalho propõe, inicialmente foram realizados registros da profundidade de sondagem-PS (distância em mm entre a margem gengival e o fundo do sulco/bolsa periodontal), dos índices de placa (Silness & Loe, 1964) e gengival (Loe & Silness, 1963) utilizando-se uma sonda periodontal manual (PCPUNC 15 Hu-friedy Mfg Co Inc. Chigago IL) em seis sítios por dente (mésio-vestibular; médio-vestibular; disto-vestibular; mésio-palatino; médio-palatino e disto-palatino), em todos os dentes presentes excetuando-se os terceiros molares. Especificamente como desfecho clínico, os valores de índice gengival aos 90 dias foi considerado.

Exames complementares radiográficos panorâmicos iniciais foram utilizados para confirmar a altura óssea e o diagnóstico periodontal clinicamente estabelecido pela American Academy of Periodontology (Armitage, 1999).

4.2.4 Calibração do Examinador

O examinador foi único e foi calibrado considerando-se como referência um examinador padrão. Este processo seguiu o modelo adotado por Araújo et al. (2003) e foi realizado anteriormente ao início do estudo (dia 0) e novamente antes do exame final (90º dia). Para determinação da reprodutibilidade intra-examinador, dez exames foram repetidos num intervalo de trinta dias e submetidos à análise. O examinador foi considerado calibrado quando $EPM \leq 0,8$ e $K > 0,8$ e $< 0,95$. Esses mesmos valores foram atingidos antes do início do estudo para que o examinador fosse considerado calibrado em relação ao examinador padrão.

4.3 Coletas das amostras

4.3.1 Coleta Microbiana

Foram coletadas amostras intra-sulculares de todos os participantes envolvidos no dia zero e aos noventa dias. Foram selecionados os sítios mesio-vestibulares dos dentes 16, 11, 26, 36, 31 e 46 (Cortelli et al., 2008) ou na ausência desses, dos dentes 17, 21, 27, 37, 41 e 47. Inicialmente o biofilme supragengival foi removido com gaze estéril e os sítios então isolados com roletes de algodão e secos delicadamente com jato de ar. Cones de papel absorvente estéreis (nº 30, marca Tanari®) foram introduzidos no sulco/bolsa gengival e mantidos em posição por sessenta segundos (Cortelli et al., 2005). Os cones foram colocados no mesmo minitubo seco (*pool*) e congelados a -80°C. Posteriormente as amostras foram ressuspensas em tampão TE. A extração do DNA genômico das amostras foi realizada através do kit PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.1.1 Análise Microbiológica

A quantificação de *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* e *Carga bacteriana total* foi realizada utilizando-se uma reação de cadeia da polimerase (qPCR) em tempo real utilizando-se primers especificamente desenhados (NCBI Nucleotide Search - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; software Primer3 - <http://frodo.wi.mit.edu/>) e testados

quanto à especificidade (NCBI BLAST - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e sistema de detecção TaqMan®.

PCR em tempo real foi empregada com o sistema de detecção TaqMan®. A concentração dos primers, bem como, as condições ideais para que ocorra o processo de amplificação (concentrações dos reagentes / determinação das temperaturas envolvidas) foram previamente estabelecidas para cada conjunto de primers incluído no estudo. A quantificação absoluta do microrganismo em análise foi realizada através da comparação do ciclo no qual a fluorescência se torna detectável acima da fluorescência de fundo (background), e é inversamente proporcional ao logaritmo do número de moléculas iniciais alvo obtido das amostras com os valores do ciclo determinados de uma curva padrão (10^1 - 10^8 ufc/ml), a partir de cepas ATCC fornecidas gentilmente pelo Instituto Fio Cruz – RJ (INCQS). Controles positivo e negativo foram empregados no estudo.

4.3.2 Coleta de fluido crevicular gengival

Amostras de fluido crevicular gengival foram obtidas dos mesmos sítios eleitos para a coleta microbiana também nos dias zero e noventa. Após a coleta microbiológica, aguardou-se entre sessenta a noventa segundos (Casarin et al., 2010) e os mesmos elementos foram lavados, secados e isolados novamente. Utilizaram-se tiras de papel absorvente Periopaper (PerioCol Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA) que foram introduzidos no sulco/bolsa gengival até encontrar resistência moderada, onde permaneceram durante trinta segundos (Teles et al., 2009). Em seguida, foi realizado o cálculo do volume do fluido gengival em μ l através de uma curva-padrão pré-estabelecida por um transdutor eletrônico

Periotron 8000 (IDEInterstate, Amityville, NY). Após a quantificação do volume do fluido, foi feito um pool das tiras de papel dos sítios, os quais foram colocados em microtubos estéreis contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS) juntamente com o coquetel inibidor de protease PMSF (Sigma®) e em seguida congeladas a -80°C. No laboratório, os tubos foram descongelados, mecanicamente agitados por dez segundos centrifugados (dez minutos a 6.000rpm/4°C) e o sobrenadante foi coletado e utilizado para análise.

4.3.2.1 Análise de Citocina

As quantificações de IL-1 β no fluido gengival foi realizada através de ensaio imunoenzimático de captura (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay), empregando os Kits comerciais (R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA) seguindo as instruções do fabricante. O desenvolvimento de cor em cada poço foi monitorado com o emprego de um leitor de ELISA (comprimento de onda: 490nm, ASYS Expert Plus®). A quantificação foi realizada plotando os resultados relativos à absorbância de cada amostra com uma curva de calibração elaborada a partir de concentrações conhecidas dos respectivos antígenos. Todo o experimento foi executado em duplicata.

4.3.3 Coleta e análise de CSV

A coleta de CSV foi realizada nos dias zero, trinta, sessenta e noventa dias. Para a coleta de CSV, uma orientação quanto a dieta, no dia anterior, foi realizada para evitar qualquer leitura de forma super ou subestimada. Compostos

aromatizantes podem mascarar resultados, por isso o participante foi orientado para evitar fazer uso de antissépticos bucais, consumir balas de menta ou chás de erva, abster-se de alimentos, fumo, bebidas em geral (água foi permitida) e de higienização bucal por pelo menos três a quatro horas antes do exame (Richter, 2009). As coletas foram realizadas no período da manhã.

Foi solicitado aos pacientes respirarem pelo nariz durante um minuto. Após, um canudo foi acoplado ao dosador portátil Halimeter® - Interscan Corporation (Electrochemical voltammetric) e seus 5cm iniciais foram introduzidos na cavidade bucal do paciente, que levemente inclinou a cabeça para baixo, manteve a mandíbula em repouso (nunca de forma a fechar a boca, soprar ou succionar o canudo) e respirou somente pelo nariz. O resultado foi dado em parte por bilhão (ppb) revelando principalmente a concentração de sulfeto de hidrogênio. Três mensurações consecutivas foram efetuadas e geraram uma média final (considerações do fabricante).

Adotou-se no presente estudo a classificação de Iwanicka-Grzegorek et al. (2005) que consideraram participantes com halitose aqueles que apresentaram valores acima ou igual a 125 ppb, halitose fisiológica acima de 75 ppb e saudáveis abaixo de 75 ppb.

4.3.4 Análises de auto-percepção (Análises Qualitativas)

No primeiro e último dias fora aplicado o questionário previamente validado de Qualidade de Vida (OHQoL). Por ser autoaplicável, todos os pacientes foram alocados em espaço amplo e confortável, livre de barulhos externos, onde tiveram a chance de responder as 16 perguntas (de A – P) fechadas, estruturadas,

relacionadas com a saúde bucal em relação a sua qualidade de vida. Anteriormente uma explicação foi realizada de forma a situar o participante sobre a importância deste instrumento.

4.3.5 Metodologia Estatística

O instrumento OHQoL é composto por 16 questões e, em função de respostas “muito ruim” (valor 1) ou “muito boa” (valor 5) tem variação do total de escores entre 16 e oitenta, onde 16 indica a pior qualidade de vida e oitenta a melhor qualidade de vida mensurável, ambas relacionadas com a condição bucal.

O Alpha de Cronbach obtido (valor observado = 0,971) indicou a confiabilidade do instrumento, bem como a estabilidade e consistência dos valores obtidos na pesquisa.

A Análise Fatorial foi utilizada afim de reduzir as variáveis através da identificação de fatores comuns que são designados como variáveis latentes. Ou seja, o fator latente, ou fatores latentes, explica o comportamento de um número relativamente alto de variáveis, no presente estudo as 16 questões do OHQoL, agrupadas segundo as correlações entre elas. Portanto, um fator negativo indica um relação inversa.

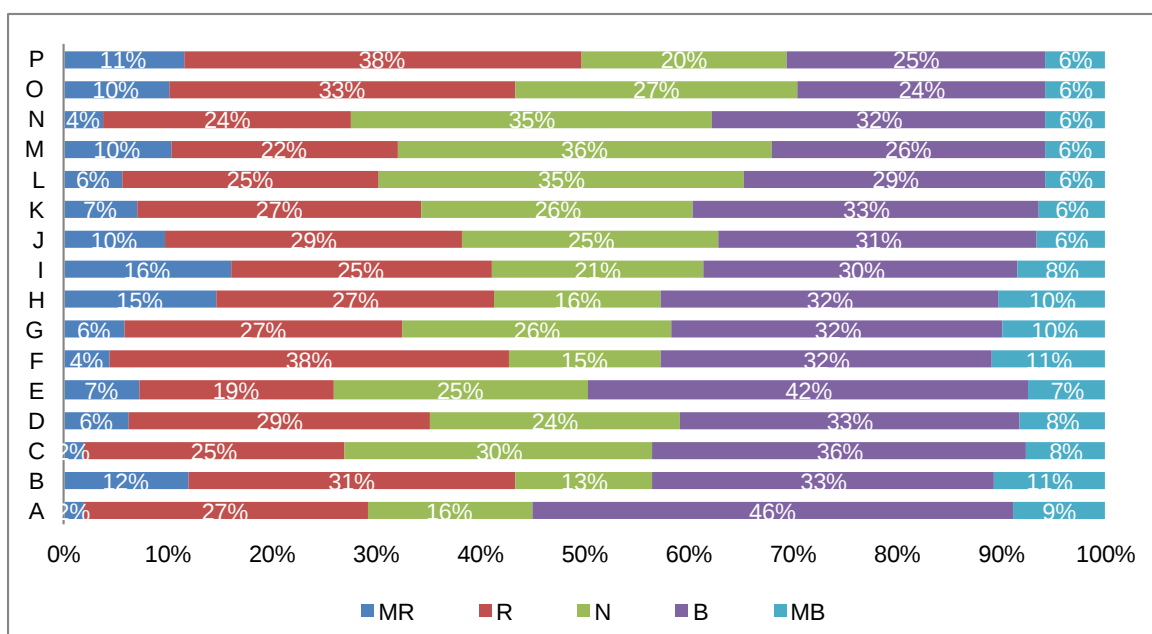
O teste de Bartlett permitiu confirmar a possibilidade e adequação do método de análise fatorial para o tratamento dos dados ao verificar se há correlações desejáveis entre as variáveis. Este teste justificou a aplicação da Análise Fatorial e como é um teste sensível ao tamanho da amostra, foi conveniente também usar os testes MSA de KMO, onde seu resultado indicou que a Análise Fatorial foi adequada para a amostra utilizada.

Por fim, foi utilizada a Regressão Linear Múltipla, onde buscou-se avaliar o impacto do fator latente obtido na análise fatorial, bem como sua interação com DM, tratamento e tempo (inicial e três meses) nos fatores microbiológicos, clínicos, imunológicos e níveis de CSV. Assim, o fator e suas interações foram as variáveis independentes dos modelos de regressão enquanto os parâmetros periodontais e halitométricos foram as variáveis dependentes. As variáveis dependentes tiveram seus valores transformados (LN da variável dependente), e a análise gráfica de resíduos (QQ-Plots) mostrou pequenos desvios da normalidade, garantindo resultados válidos para os modelos de regressão desenvolvidos.

Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas acompanhadas de p valor $< 0,05$.

5 RESULTADOS

As respostas do OHQoL foram quantificadas em uma escala likert de 5 pontos, recebendo o valor um para “muito ruim”, dois para “ruim”, três para “nenhum”, quatro para “bom” e cinco para “muito bom”. A distribuição das respostas do OHQoL indicou que a maior parte dos pacientes assinala respostas do tipo “ruim” ou “bom”, passando pelo “nenhum”. Em relação à “muito bom” as frequências mais elevadas foram para as questões B (11%) e F (11%) referentes a aparência pessoal e vida social, respectivamente. Em contrapartida as questões que apresentaram a maior quantidade de resposta “muito ruim” foram as H (15%) e I (16%), referentes a autoconfiança e os atos de sorrir e dar risada, respectivamente (Figura 5).



MR – muito ruim; R – ruim; N – nenhum; B – bom; MB – muito bom.

Figura 5: Distribuição das respostas do questionário OHQoL (*Oral health related quality of life*)

A Tabela 1 demonstra que, independente do grupo, a questão que apresentou maior valor médio de resposta foi a questão A (referente à alimentação e satisfação alimentar), enquanto as questões O (referente a ausência de dor e desconforto) e P (referente ao hálito) apresentaram os menores valores médios de resposta. Ou seja, a alimentação e satisfação alimentar tiveram efeito mais positivo sobre a qualidade de vida comparativamente às respostas relativas a ausência de dor e halitose que tiveram efeito mais negativo sobre a qualidade de vida.

Tabela 1 - Média, mediana, desvio padrão, valores mínimos e máximos das questões do instrumento OHQoL (*Oral health and quality of life*) na população geral

Questão	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
A	3.3	4	1.0	1	5
B	3.0	3	1.3	1	5
C	3.2	3	1.0	1	5
D	3.1	3	1.1	1	5
E	3.2	3	1.1	1	5
F	3.1	3	1.2	1	5
G	3.1	3	1.1	1	5
H	3.0	3	1.3	1	5
I	2.9	3	1.2	1	5
J	3.0	3	1.1	1	5
K	3.0	3	1.1	1	5
L	3.0	3	1.0	1	5
M	3.0	3	1.1	1	5
N	3.1	3	1.0	1	5
O	2.8	3	1.1	1	5
P	2.8	3	1.1	1	5

O valor obtido do Alpha de Cronbach de 0,971, indicou boa consistência e validade interna adequada para o instrumento OHQoL. Como o instrumento avalia assuntos parecidos e correlatos foi desenvolvida uma Análise Fatorial, para se identificar possíveis informações latentes e diferenças de percepções pelos indivíduos, além de se evitar multicolinearidade. A significância do teste de Bartlett ($p < 0,0001$) confirmou a existência de correlações entre as variáveis do instrumento. E, finalmente, o valor de 0,935 para o MSA de KMO demonstrou que a análise fatorial seria adequada ao tamanho da amostra do presente estudo.

Pela Análise Fatorial (Tabela 2) foi possível extrair um único fator, ou seja, existiu uma única informação latente – designado então como Fator de Qualidade de Vida, que pode ser interpretada como o efeito da saúde bucal na qualidade de vida. A questão com maior carga fatorial (maior peso no fator) foi a questão I (referente a autoconfiança) e a com menor carga fatorial (menor peso no fator) foi a questão A (referente a alimentação).

Tabela 2 - Análise fatorial para as questões do instrumento OHQoL (*Oral Health and Quality of Life*), com as cargas fatoriais e os respectivos auto-valores, percentual da variabilidade explicada, alpha de cronbach, teste de Bartlett e KMO

Fator	Questão	Carga Fatorial Fator 1
Fator Qualidade de Vida	A	0.64
	B	0.83
	C	0.72
	D	0.88
	E	0.81
	F	0.87
	G	0.88
	H	0.89
	I	0.91
	J	0.89
	K	0.85
	L	0.88
	M	0.83
	N	0.88
	O	0.85
	P	0.74
Auto-valor		11.23
% da variabilidade		70%
Alpha de Cronbach		0.971
Teste de Bartlett (p-valor)		<0.0001
KMO		0.935

Para avaliar o impacto do Fator de Qualidade de Vida, bem como sua interação com DM (diabético ou não diabético), com tratamento (óleos essenciais ou placebo) e com o tempo (baseline e três meses), nos fatores clínicos, microbiológicos, imunológicos e halitométricos, foram utilizados modelos de Regressão Linear Múltipla.

Dentre os modelos para os fatores clínicos, foi possível detectar um impacto estatisticamente significativo da interação entre DM e o Fator de Qualidade de Vida em IP ($p=0,03$), com parâmetro estimado negativo igual a -0.28. Assim, diabéticos que sofreram melhora na qualidade de vida em função do tratamento gengival tiveram menor IP ao final do período de acompanhamento.

Foi detectado ainda efeito estatisticamente significativo da interação entre o tratamento e o Fator de Qualidade de Vida em IG ($p=0,03$), com parâmetro estimado negativo igual a -0,26 (Tabela 3). Assim, tanto indivíduos diabéticos quanto não diabéticos que tiveram melhora na qualidade de vida e que usaram OE tiveram menores valores de IG. Condição similar foi observada para IP embora para PS não tenham sido detectados impactos estatisticamente significativos associados à qualidade de vida.

Tabela 3 - Regressão linear múltipla para profundidade de sondagem (PS), índice de placa (IP) e índice gengival (IG).

Variável	PS		IP		IG	
	Parâmetro Estimado	p-valor	Parâmetro Estimado	p-valor	Parâmetro Estimado	p-valor
Diabetes (sim) e Qual. de vida	-0.05	0.49	-0.28	0.03	-0.22	0.07
Tratamento (OE) e Qual. de vida	-0.01	0.91	-0.23	0.02	-0.26	0.03
Tempo (inicial) e Qual. de vida	0.11	0.13	-0.09	0.44	0.03	0.76
Qual. de vida	-0.08	0.26	-0.01	0.93	-0.04	0.70

Em relação aos modelos para os fatores microbiológicos, foi possível detectar impacto estatisticamente significativo da interação entre DM e o Fator de Qualidade de Vida na carga bacteriana total (Tabela 4). Assim, diabéticos que sofreram melhora na qualidade de vida em função do tratamento gengival tiveram menor carga bacteriana total.

Tabela 4 - Regressão linear múltipla para carga bacteriana total, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans*

Variável	Carga bacteriana total		<i>P. gingivalis</i>		<i>T. forsythia</i>		<i>A. actinomycetemcomitans</i>	
	Parâmetro Estimado	p-valor	Parâmetro Estimado	p-valor	Parâmetro Estimado	p-valor	Parâmetro Estimado	p-valor
Diabetes (sim) Qual. de vida	-0.98	0.03	0.45	0.60	-0.16	0.73	-1.14	0.19
Tratamento (OE) e Qual. de vida	-0.26	0.07	-1.63	0.06	-0.29	0.54	-0.83	0.34
Tempo (inicial) e Qual. de vida	0.05	0.90	0.17	0.83	-0.39	0.36	-0.44	0.59
Qual. de vida	0.57	0.15	1.02	0.19	0.59	0.16	1.41	0.08

Por fim, foram desenvolvidos os modelos de regressão para os fatores imunológicos e halitométricos. O único impacto estatisticamente significativo foi da interação tratamento e a qualidade de vida sobre os níveis de CSV (Tabela 5). Independente da condição sistêmica, os indivíduos tratados com OE que tiveram melhora na qualidade de vida apresentaram melhor condição de hálito revelada pelos menores valores de CSV.

Tabela 5 - Regressão linear múltipla para interleucina1beta (IL-1B), volume de fluido crevicular gengival (FCG) e compostos sulfurados voláteis (CSV)

Variável	IL-1B		GCF		CSV	
	Parâmetro Estimado	p-valor	Parâmetro Estimado	p-valor	Parâmetro Estimado	p-valor
Diabetes (sim) e Qualidade de vida	0.01	0.88	0.00	0.94	-0.20	0.05
Tratamento (OE) e Qualidade de vida	0.05	0.47	0.10	0.06	-0.15	0.011
Tempo (inicial) e Qualidade de vida	0.04	0.50	-0.02	0.73	-0.01	0.89
Qualidade de vida	-0.04	0.53	-0.06	0.23	-0.06	0.52

6 DISCUSSÃO

A prevalência de gengivite é alta em todo o mundo, independente de localização geográfica e condição social (Gjerme et al., 2002). O último relatório SB Brasil (Brasil, 2011) informou que a doença periodontal foi a forma de doença mais comumente encontrada, onde a prevalência de gengivite chegou a 33,8%, 45,8% e 64,1% em indivíduos de 15, 35 e 44 anos, respectivamente. Quando associada a doenças crônicas como o DM, há um risco de progressão de gengivite para um estado de periodontite de duas a três vezes maior que em outros indivíduos não-diabéticos (Taylor et al., 1998; Nagata, 2009). E, considerado-se o DM uma condição crescente em todo o mundo, buscam-se mais alternativas na melhoria da qualidade de vida destas pessoas. D'Aiuto et al. (2008) avaliaram a associação entre periodontite e DM em 13.994 indivíduos acima dos 17 anos de idade nos Estados Unidos. Com um intervalo de confiança de 95% a prevalência do DM foi de 18% em indivíduos sem sinais de doença periodontal, de 34% em indivíduos com doença periodontal moderada e de 37% em pacientes com doença periodontal severa. A literatura parece ter clarificado que o DM envolve um estado de pró-oxidação, que induz a formação de produtos finais da glicação avançada, que por sua vez interferem no curso e gravidade das doenças periodontais (Pietropaoli et al., 2012).

Assim, o presente estudo avaliou a relação entre parâmetros tradicionalmente utilizados como desfechos do tratamento periodontal com a qualidade de vida relacionada a saúde bucal.

Exceto por poucos indivíduos que adicionalmente compuseram a população final do presente estudo, a eficácia do tratamento gengival de indivíduos diabéticos e

não-diabéticos foi previamente reportada (Raslan et al., 2015) – ANEXO E. Nessa fase preliminar do estudo foi demonstrado que o estado de DM pode influenciar negativamente o grau de inflamação gengival e podem dificultar a melhora de alguns parâmetros após o tratamento. Além disso, foi demonstrado que o uso de óleos essenciais acarretou benefícios superiores ao uso de solução placebo tanto em indivíduos diabéticos quanto não diabéticos. Entretanto o que ainda não havia sido demonstrado era que tais melhoras poderiam se relacionar com a qualidade de vida da população. Essa relação é bastante interessante pois o caráter de cronicidade do DM e suas comorbidades poderiam fazer com que gengivite assumisse um peso menor na qualidade de vida.

Muitos indivíduos com gengivite possuem cálculo ou outros fatores que possam interferir na higienização. O melhor tratamento é aquele onde o auto-controle caseiro do biofilme seja executado juntamente com a remoção profissional de biofilme e/ou cálculo. No tratamento periodontal o uso de ultrassom é amplamente utilizado e tem por objetivo remover o cálculo que, em gengivite, costuma ser supragengival (AAP, 2001). Além de serem tão eficazes quanto o procedimento manual, apresentam algumas vantagens como redução do tempo de trabalho e maior eficácia na remoção de manchas (Jacobson et al., 1994). No presente estudo, os indivíduos receberam raspagem ultrassônica em seção única, instrução de higiene bucal seguidas de três meses de uso de óleos essenciais. A higiene bucal mecânica diária continua sendo a mais importante estratégia no controle do biofilme (Løe et al., 1965; Van der Weijden & Slot, 2011), porém não atinge sua eficácia na maioria das vezes em função da falta de motivação e habilidade manual (Teles & Teles, 2009). Assim para vencer tais dificuldades e buscar resultados melhores no processo de tratamento da gengivite, pesquisadores

tem testado outras alternativas que como, por exemplo, o uso de soluções antissépticas como aquelas contendo uma combinação fixa de quatro óleos essenciais (Stoeken et al., 2007; Van Leeuwen et al., 2011; Cortelli et al., 2013). Apesar das soluções à base de clorexidina serem amplamente utilizadas, estas apresentam efeitos adversos indesejáveis como manchamento extrínseco na superfície do dente e alteração no paladar, o que limita o seu uso de forma prolongada (Jones, 1997). Fine et al. (2005) conduziram dois estudos para determinar a ação antimicrobiana de solução contendo óleos essenciais, testando bochechos diários num intervalo de 12 horas durante duas semanas. Amostras subgengivais e do dorso da língua foram analisadas e a contagem bacteriana foi menor para indivíduos que utilizaram óleos essenciais ao invés de placebo, demonstrando redução de bactérias anaeróbias Gram-negativas bem como de bactérias produtoras de CSV, explicando parcialmente a redução de biofilme subgengival, gengivite e halitose. Clinicamente, o trabalho de Sharma et al. (2008) demonstrou que a ação de antissépticos bucais ajudou a reduzir o índice de placa e índice gengival de oitenta adolescentes com gengivite, além de ter ajudado a reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Esses estudos prévios suportam os achados do presente estudo, relacionados aos índices de placa e gengival, a carga total bacteriana e os níveis de CSV. E, felizmente como resultado do questionário auto-aplicável o presente estudo demonstrou que tais melhoras podem ser percebidas pelos indivíduos tratados podendo impactar positivamente sua qualidade de vida.

Doenças como o DM alteram o ambiente do hospedeiro e possivelmente aumentam a vulnerabilidade do indivíduo para a evolução de gengivite em função de mudanças na resposta inflamatória frente a microrganismos (Mealey & Ocampo, 2007; Salvi et al., 2008). O DM pode aumentar a resposta inflamatória do hospedeiro

frente ao biofilme dental, aumentando, desta por exemplo, os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β (Andriankaja et al., 2009). Após o tratamento periodontal e readequação da higienização bucal, é esperado o retorno dos mediadores aos valores iniciais (Offenbacher et al., 2010; Lee et al., 2012). No estudo preliminar o DM não influenciou os níveis pós-tratamento de IL-1 β . Ao contrário, após o tratamento, o menor valor médio de volume total de fluido gengival foi observado no grupo sistemicamente saudável que bochechou óleos essenciais após a raspagem.

A maior parte de sua etiologia da halitose é de origem bucal, incluindo gengivite e periodontite (Oho et al., 2001; Van den Velde et al., 2007; Calil et al., 2009; Apatzidou et al., 2012) e grande parte dos indivíduos não reconhece que possuem tal condição. A maior parte das vezes o malodor é resultado de uma higienização pouco adequada embora seja sabido que a halitose pode ser o indicador de outras doenças sistêmicas que requerem tratamento (Tonzetich, 1971), como refluxo (estenose pilórica), carcinomas gástricos, úlceras e fechamento inadequado do esôfado. O monitor de sulfeto (Halimeter®) pode ser uma opção adequada para o diagnóstico de halitose uma vez que obtém hoje dados semelhantes com aqueles obtidos no exame organoléptico (Laleman et al., 2014; Seemann et al., 2014), determinando a concentração conjunta dos três gases sulfurados voláteis mais importantes (sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana e dimetil sulfeto). Preliminarmente, foi reportado que o grupo sistemicamente saudável com gengivite, apresentou melhoras nos níveis médios de CSV. Essas melhoras foram superiores no grupo que bochechou óleos essenciais (Garcia et al., 2014).

O resultado positivo do tratamento gengival/periodontal tem sido amplamente estudado, estabelecido e divulgado no meio científico em favor da saúde da população. Os estudos tradicionais tem focado sobretudo na melhora da inflamação.

Aparentemente nota-se que há a necessidade pela busca de outros impactos do tratamento gengival sobre o estado de saúde do indivíduo e a investigação da qualidade de vida deste quando submetido ao tratamento. O impacto da saúde sobre a qualidade de vida de uma pessoa, quando ligada à saúde bucal, é determinada por uma variedade de condições que afetam a percepção do indivíduo, tendo como referência atividades diárias. A habilidade de poder extrair do indivíduo informações subjetivas e poder, a partir daí, avaliar de forma quantitativa percepções e sentimentos da vida cotidiana, torna-se um desafio de pesquisa em um campo que pode ser bastante produtivo. Porém, sabe-se muito pouco do perfil comportamental de um indivíduo quando refere-se ao impacto de sua saúde bucal sobre sua qualidade de vida. Em geral, as características comportamentais individuais são pobremente escutadas ou analisadas. Mas, não é apenas o investigador que tem capacidade de dar sentido ao seu trabalho intelectual, mas todos os seres humanos podem atribuir significado de consciência histórica do seu tempo (Minayo & Gomes, 2008). Pode-se identificar o grau de identidade entre sujeito da pesquisa e objeto de análise. Esse tópico realmente ultrapassa a odontologia tradicional e aproxima a ciência da sociedade, abordando o conjunto das expressões humanas nas estruturas, processos e significados além de poder ser uma tarefa seguramente prazerosa e desafiadora.

Ao eleger o OHQoL como instrumento de busca desses dados subjetivos, houve a intenção de entender a percepção dos indivíduos sobre o impacto da saúde bucal modificada pelo tratamento em suas vidas. A análise fatorial foi capaz de extrair um único fator latente, ou seja, revelou um padrão de resposta que foi comum para todas as perguntas.

Para o modelo de fatores clínicos (Tabela 3) a análise indicou um impacto estatístico significativo nos índices de sangramento e de placa. Dessa forma, os diabéticos que relataram uma melhor qualidade de vida no fim do estudo foram aqueles que tiveram menor índice de placa. Similarmente, tanto os diabéticos quanto os não diabéticos que experimentaram melhora na qualidade de vida depois do tratamento, tiveram os menores índices de sangramento aos três meses. Embora em números absolutos também tenha havido melhora de PS (Raslan et al., 2014), essa não foi suficiente para ser percebida pelos participantes. Esses achados mostram, no mínimo, uma diferença entre os desfechos escolhidos para fornecer respostas centradas no paciente e respostas centradas no profissional. Previamente, o tratamento de pacientes com periodontite também acarretou melhora da qualidade de vida auto-relatada, resultado similar com o trabalho de Nagarajan & Chandra (2012). Observou-se ainda significância estatística para a relação entre os indicadores de halitose e tratamento com OE. Novamente, os indivíduos que tiveram melhora na qualidade de vida após o tratamento combinado com OE apresentaram menores valores de CSV. Fine et al. (2005) investigaram o efeito dos óleos essenciais sobre as bactérias produtoras de CSV e observaram reduções significativas 12 horas após a realização de bochecho único e após 14 dias de uso consecutivo, justificando os achados do presente estudo.

Um dos achados mais surpreendentes se refere a relação observada entre qualidade de vida e carga total bacteriana (tabela 4). Pois, ao contrário dos parâmetros IP, IG e CSV que podem ser percebidos pelos próprios indivíduos, a carga total bacteriana é um desfecho laboratorial. Busato et al. (2012) observaram, por exemplo, uma relação entre xerostomia, que é um desfecho claramente percebido pelo paciente, e a qualidade de vida de pacientes com DM do tipo 1.

O estado de saúde bucal foi percebida de forma mais impactante na qualidade de vida nos aspectos físicos e sintomáticos (conforto/sangramento e hálito), semelhante com outro trabalho (Needleman et al., 2004). Isso pode ser um indicativo sobre o quanto as doenças periodontais de maneira geral podem influenciar de forma negativa a qualidade de vida das pessoas. De fato, foi demonstrado que a severidade da doença periodontal mensurada por indicadores clínicos, tem um impacto sobre a qualidade de vida de diabéticos (de Pinho et al., 2012).

Ainda que as queixas de “gengiva sangrante” e “malodor” sejam associadas com qualidade de vida reduzida, pacientes que foram submetidos ao tratamento periodontal obtiveram melhores resultados de qualidade de vida quando comparados com pacientes novos, indicando que pode ser também um instrumento de avaliação pré e pós tratamento. Por se tratar também de um estudo de qualidade de vida em pacientes que receberam referência aos cuidados essencialmente de gengivite, espera-se que o mesmo efeito possa se estender aos demais pacientes em clínica geral.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados aqui apresentados, é possível concluir que em participantes com diabetes e gengivite, que apresentaram melhora na qualidade de vida auto-relatada tendem realmente a apresentar melhores indicadores de saúde periodontal e hálito. Conclui-se também essa relação foi mais clara no protocolo de tratamento gengival que incluiu o uso diário de solução à base de óleos essenciais.

REFERÊNCIAS¹

1. Needleman I, McGrath C, Floyd P, Biddle A. Impact of oral health on the life quality of periodontal patients. *J Clin Periodontol* 2004;31:454-7.
2. Aslund M, Suvan J, Moles DR, D'Aiuto F, Tonetti MS. Effects of two different methods of non-surgical peri-odontal therapy on patient perception of pain and quality of life: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008;79:1031-40.
3. Noack B, Jachman I, Roscher S, Sieber L, Kopprasch S, Luck C, Hanefeld M, Hoffmann T. Metabolic Diseases and their possible link to risk indicators of periodontitis. *J Periodontol* 1999;71(6):898-903.
4. Mealey B, Oates T. Diabetes Mellitus and Periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77(8):1289-1303.
5. Kiedrowicz M, Dembowska E, Banach J, Safranow K, Pynka S. A comparison of the periodontal status in patients with type 2 diabetes based on glycated haemoglobin levels and other risk factors. *Adv Med Sci* 2015;60(1):156-61.
6. Raslan S, Cortelli J, Costa F, Aquino D, Franco G, Cota L, Gargioni Filho A, Cortelli S. Clinical, Microbial and Immune responses observed in patients with diabetes after treatment for gingivitis: a three-month randomized clinical trial. *J Periodontol* 2015;86:1-17.
7. American Diabetes Association. Position Statement. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:S11-63.
8. Mealey B. Diabetes and periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70:935-49.
9. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-44.
10. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Goldsmith D, Ricci-Nittel D, Charles CH, Peng P, Lynch MC. Effect of rinsing with an essential oil-containing mouthrinse on subgingival periodontopathogens. *J Periodontol* 2007;78:1935-42.
11. Teles R, Patel M, Socransky S, Haffajee A. Disease progression in periodontally healthy and maintenance subjects. *J Periodontol* 2008;79:784-94.
12. Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Fernandes CB, de Carvalho-Filho J, Franco GC, Costa FO, Kawai T. Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *J Clin Microbiol* 2008;46:1322-9.

¹ Referências elaboradas de acordo com Modelo Vancouver

13. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol* 2004;75:1203-8.
14. Krespi YP, Shrimme MG, Kacker A. The relationship between oral malodor and volatile sulfur compound-producing bacteria. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;135:671-6.
15. Southerkand J, Taylor G, Offenbacher S. Diabetes and Periodontal Infection: making the connection. *Clinical Diabetes* 2005;23:171-8.
16. L  e H, Theilade E, Jensen B. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36:177-87.
17. American Academy of Periodontology. International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
18. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 2001;25:8-20.
19. Morita M, Wang HL. Relationship between sulcular sulfide level and oral malodor in subjects with periodontal disease. *J Periodontol* 2001;72: 9-84.
20. Page R, Schroeder PR. Patogenesis of inflammatory periodontal disease. *Lab Invest* 1976;33(3):235-49.
21. L  e H, et al. Natural history of periodontal disease in man. Rapid moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986;13:431-45.
22. Drugarin D, Onisei D, Koreck A, Negru S, Drugarin M. Proinflammatory cytokines production and PMN-elastase release from activated PMN cells in the periodontal disease. *Rom Arch Microbiol Immunol* 1988;57(3):295-307.
23. Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J. Intera   es hospedeiro-parasita. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de Periodontia Cl  nica e Implantologia Oral. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p 275-9.
24. Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, et al. Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4(1):53.
25. Marshall R. Gingival defensitis: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontol 2000* 2004;35:14-20.
26. Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamatsu Y, Hanazawa S, Kitano S, ET AL. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodontol Res* 1997;32:559-69.

27. Taylor G, Burt B, Becker M, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol* 1998;69(1):76-83.
28. Papapanou PN. 1997 World Workshop in Clinical Periodontics. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1997;1:1–36.
29. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ., Murray LL., Kent RL. Microbiota of health, gingivitis and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25:85-98.
30. Cortelli JR, Cortelli SC, Pallos D, Jorge A. Prevalence of aggressive periodontitis in adolescents and young adults from Vale do Paraíba. *Pesqui Odontol Bras* 2002;16(2):163-8.
31. Paster B, Boches S, Galvin J, Ericson R, Lau C, Levanos V, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183(12):3770-83.
32. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 2003;41(2):558-63.
33. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43(11):5721-32.
34. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004;97(6):1311-8.
35. Kuramitsu HK, Chen W, Ikegami A. Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2005;76:2047-51.
36. Sokransky SS, et al. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol. Immunol.* 1988;3:1-7.
37. Haffajee AD, Sokransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease: microbiology and immunology of periodontal diseases. *Periodontology 2000* 1994;5:78-111.
38. Fitzpatrick RE, Wijeyewickrema LC, Pike RN. The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Future Microbiol* 2009;4(4):471-87.
39. Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* 2001;72:1354-63.
40. Grossi SG, Zambon JJ, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease: risk indicators for attachment loss. *Journal of Periodontology* 1994;65:260-7.

41. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *Journal of Periodontology* 2000;71:14-21.
42. Haffajee AD, Socransky SS. Relation of body mass index, periodontitis and *Tannerella forsythia*. *J Clin Periodontol* 2009;36:89-99.
43. Zambon J, Haraszthy V, Hariharan G. The microbiology of early-onset periodontitis: association of highly toxin Actinobacillus actinomycetemcomitans strains with localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1996;67:282-90.
44. Cortelli S, Jorge A, Nascimento L, Cortelli J. Prevalence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in moderate and advanced periodontitis. *Pos-Grad Rev* 2000;3(2):30-6.
45. Melvin W, Assad D, Miller G, Gher M, Simonson L, York. A Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodontitis. *J Periodontol* 1994;65(6):576-82.
46. Cortelli S, Cortelli J, Faria I, Jorge A. Ocorrência bucal de Actinobacillus actinomycetemcomitans em indivíduos com doença periodontal não tratada avaliada por cultura e ensaio "dot-blot". *RPG Rev. Pós-Grad* 2004;11(3):227-32.
47. Graves D, Fine D, Teng Y, Van Dyke T, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2008;35:89-105.
48. Tonzetich J. Direct gas chromatographic analysis of sulphur compounds in mouth air in man. *Arch Oral Biol* 1971;16:587-97.
49. Quirynen M, Dadamio J, Van den Velde S, et al. Characteristics of 2000 patients who visited a halitosis clinic. *J Clin Periodontol* 2009;11:970-5.
50. Oho T, Yoshida Y, Shimazaki Y, Yamashita Y, Koga T: Characteristic of patients complaining of halitosis and the usefulness of gas chromatography for diagnosing halitosis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 2001;91:531-4.
51. Van den Velde S, Quirynen M, Van Hee P, Van Steenberghe D. Halitosis associated volatiles in breath of healthy subjects. *Journal of Chromatography B* 2007;853:54-61.
52. Calil C, Liberato FL, Pereira AC. The relationship between volatile sulphur compounds, tongue coating and periodontal disease. *Int J Dent Hyg* 2009;7:251-5.
53. Roldán S, Herrera D, Sanz M. Biofilms and the tongue: therapeutical approaches for the control of halitosis. *Clin Oral Investig.* 2003;74:189-197.

54. Collins LM, Dawes C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *Journal of Dental Research* 1987;66:1300-2.
55. Allaker RP, Hughes FJ, et al. Topographic distribution of bacteria associated with oral malodour on the tongue. *Arch Oral Biol.* 2008;53:S8-12.
56. Faveri M, Feres M, Shibli JA, et al. Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans. *J Periodontol.* 2006;77:1539–46.
57. Quirynen M, Avontroodt P, Soers C, et al. Impact of tongue cleansers on microbial load and taste. *J Clin Periodontol.* 2004;31:506–10.
58. Hughes FJ, McNab R. Oral malodour - a review. *Archives of Oral Biology* 2008;53:1-7.
59. Eli I, Baht R, Koriati H, Rosenberg M. Self-perception of breath odor. *Journal of the American Dental Association* 2001;132:621-6.
60. Pereira AL, Cortelli SC, Aquino DR, Franco GC, Cogo K, Rodrigues E, et al. Reduction of salivary arginine catabolic activity through periodontal therapy. *Quintessence Int* 2012 Oct;43(9):777-87
61. Eicke S, Pietkiewicz M, Sculean A. Oral microbiota in Swiss adolescents. *Clin Oral Investig.* 2013 Jan;17(1):79-86.
62. Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *PLoS One* 2013 June;8(6):e65520.
63. Tonzetich J. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. *Journal of Periodontology* 1977;48:13–20.
64. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiologia da doença peridontal. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.105-147.
65. Yaegaki K, Tonzetich J, Ng W. Improved high – performance liquid chromatography method for quantitation of proline and hydroxiprolin in biological materials. *J Chromat* 1986;356:163-70.
66. Goldberg S, Kozlovsky A, Gordon D, et al. Cadaverine as a putative component of oral malodour. *J Dent Res* 1994;73(6):1168-1172.
67. Greenman J, Duffield J, Spencer P, Rosenberg M, Corry D. Study on the organoleptic intensity scale for measuring oral malodor. *Journal of Dental Research.* 2004;83:81-5.
68. Yaegaki K, Sanada K. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontitis. *J Periodontal Res* 1992;27:233-8.

69. Greenman J, Rosenberg M. Proceedings of the sixth international conference on breath odor. *Oral Diseases* 2005;11:5–6.
70. Laleman I, Dadamio J, De Geest S, Dekeyser C, Quirynen M. Instrumental assessment of halitosis for the general dental practitioner. *Journal of Breath Research*. 2014;8.
71. Murata T, Yamaga T, Iida T, Miyazaki H, Yaegaki K. Classification and examination of halitosis. *International Dental Journal* 2002; 52: 181–186.
72. Furne J, Majerus G, Lenton P, Springfield J, Levitt DG, Levitt MD. Comparison of volatile sulfur compound concentrations measured with a sulfide detector vs. gas chromatography. *Journal of Dental Research*. 2002; 81: 140–143.
73. Iwanicka-Grzegorek E, Michalik J, Kepa J, Wierzbicka M, Aleksinski M, Pierzynowska E. Subjective patients' opinion and evaluation of halitosis using halimeter and organoleptic scores. *Oral Diseases*. 2005; 11: 86-88.
74. Seemann R, Duarte M, Filippi A, Greenman J, Lenton P, Nachnani S, Roldán S, Schulze H, Sterer N, Tangerman A, Winkel EG, Yaegaki K, Rosenberg M. Halitosis management by the general dental practitioner – results of an international consensus workshop. *Swiss Dent J* 2014; 124 (11): 1205-11.
75. Yaegaki K, Coil JM. Diagnosis of halitosis by utilizing questionnaire and organoleptic measurement. *Quintessence* 1999; 18: 745-53.
76. Ratkay JG. Stimulation of enzyme and cytokine production by methyl mercaptan in human gingival fibroblast and monocyte cell cultures. *Archives of Oral Biology*. 1995; 40: 337-344.
77. Ratcliff PA, Johnson PW. The relationship between oral malodor, gingivitis and periodontitis: a review. *Journal of Periodontology* 1999, 70: 485-489.
78. Torresyap G, Haffajee AD, Uzel NG, Sokransky SS. Relationship between periodontal pocket sulfide levels and subgingival species. *Journal of Clinical Periodontology* 2003; 30: 1003-10.
79. Kato H, Awano S, Yoshida A, Ansai T, Takehara T. The relationship between the relative amount of *Porphyromonas gingivalis* in saliva and halitosis. *Oral Diseases* 2005; 11: 115–116.
80. Loesche WJ, Bretz WA, Kerschensteiner D. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DLarginine-naphthylamide. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1551-1559
81. Kozlovsky A, Gordon D, Gelernter L, Loesche WJ, Rosenberg M. Correlation between the BANA test and oral malodor parameters. *J dent Res* 1994; 73: 1036-1042.

82. Coil JM, Tonzetich J. Characterization of volatile sulphur compounds production at individual gingival crevicular sites in humans. *J. Clin. Dent* 1992; 3: 97–103
83. Lu DP. Halitosis: an etiologic classification, a treatment approach and prevention. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 54: 521-526.
84. Yaegaki K, Coil JM. Examination, classification and treatment of halitosis: clinical perspectives. *J Can Dent Assoc* 2000; 66: 257-61.
85. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 6th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2013. Available at: http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf. Accessed 03 feb 2015.
86. Rhodes CJ. Type 2 diabetes – a matter of b-cell life and death? *Science* 2005; 307: 380–384.
87. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000* 2003; 32: 11-23.
88. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000* 2007; 44: 127-153
89. Orso V, Pangnoncelli RM. O perfil do paciente diabético e o tratamento odontológico. *Odonto Ciênc* 2002; 17: 206-213.
90. Kawamura JY. Avaliação clínica, radiográfica e imunohistoquímica da doença periodontal em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1. *RPG Pós Grad* 2005; 12: 301-307.
91. Lorenzo JL. *Microbiologia para o estudante de odontologia*. 1. ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 63-65.
92. Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yakamoto T. Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiases. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 1993 22: 229-234.
93. Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2010 Jan 15; 2: 3.
94. Atkinson JC. Salivary gland dysfunction: causes, symptoms, treatment. *J Am Dent Assoc*. 1994; 125: 409-16.
95. Von Bultzingslowen I, et al. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: S57.
96. Pihlstrom BL, Michalowicz BS. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366: 1809-920.

97. Kinane DF, Peterson M, Stathopoulou PG. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontology 2000* 2006; 40: 107-19.
98. Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1990; 121: 532–536.
99. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991; 62: 123–130.
100. Westfelt E, Rylander H, Blohme G, Joanasson P, Lindhe J. The effect of periodontal therapy in diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*. 1996; 23: 92-100.
101. Ervasti T, Knuuttila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. *J Periodontol* 1985; 56: 154–157.
102. Tervonen T, Oliver RC. Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 431–435.
103. Genco RJ, Löe H. The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol 2000* 1993; 2: 98-116.
104. Karjalainen KM, Knuuttila MLE. The onset of diabetes and poor metabolic control increases gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 1060–1067.
105. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case–control study. *J Periodontol* 2005; 76: 418–425.
106. Grossi SG, Skrepcinski, FB, DeCaro T, Zambon JJ, Cummin D, Genco RJ. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *Journal of Periodontology* 1996; 67: 1094-102.
107. Atkinson MA, Maclaren NK. What causes diabetes? *Scientific American*, 1990; 263: 62-63.
108. Ervasti L, Knuuttila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. *J Periodontol* 1985; 56: 154-7.
109. Soory M. Hormonal factors in periodontal disease. *Dental Update* 2000; 27: 380-3.
110. Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH. The effect of periodontal treatment on glyceimic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology*. 2001; 28: 306-310.
111. Kiran M, Arpak N, Unsal E. The effects of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32: 266-272.

112. Santos VR, Lima JA, Miranda TS, Gonçalves TE, Figueiredo LC, Faveri M, Duarte PM. Full-mouth disinfection as a therapeutic protocol for type-2 diabetic subject periodontitis: twelve-month clinical outcomes: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* 2013; 40: 155-162.
113. Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG, Shlossman M, Dunford R, Genco RJ. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1988; 59: 23–31.
114. Sbordone L, Ramaglia L, Barone A, Ciaglia RN, Tenore A, Iacono VJ. Periodontal status and selected cultivable anaerobic microflora of insulin-dependent juvenile diabetics. *J Periodontol* 1995; 66: 452-461.
115. da Cruz GA, de Toledo S, Sallum EA, Sallum AW, Ambrosano GM, de Cássia Orlandi Sardi J, da Cruz SE, Gonçalves RB. Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Periodontol* 2008; 79: 1150-7.
116. Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2008; 79: 637-46.
117. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Offenbacher S. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Journal of Periodontology* 1997; 68: 127-135.
118. Andriankaja OM, Barros SP, Moss K, Panagakos FS, DeVizio W, Beck J, Offenbacher S. Levels of serum interleukin (IL)-6 and gingival crevicular fluid of IL-1 β and prostaglandin E₂ among non-smoking subjects with gingivitis and type2 diabetes. *J Periodontol* 2009; 80: 307-316.
119. Nagata T. Relationship between diabetes and periodontal disease. *Clin Calcium* 2009; 19: 1291-1298.
120. Salvi GE, Collins JG, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, Offenbacher S. Monocytic TNF- α secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 8-16.
121. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Annals of Periodontology* 2001; 6: 125-127.
122. Brownlee M. A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 2003; 112: 1788-1790.
123. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994; 43: 836-841.
124. Iacopino AM. Diabetic periodontitis: possible lipid induced defect in tissue repair though alteration of macrophage phenotype function. *Oral diseases* 1995; 1, 214-229.

125. De Pommereau V, Dargent-Paré C, Robert JJ, Brion M. Periodontal status in insulin-dependent diabetic adolescents. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 628-632.
126. Mealey BL. Periodontal disease and diabetes: a two-way street. *Journal of American Dental Association* 2006; 137, 26S-31S
127. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, et al. The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2001; 72: 774-8.
128. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community, implications for health and disease. *BMC Oral Health* 2006; 6: 86-93.
129. Yang PS, Wang Y, Oi XM, Ren JM, Ge SH. The effect of initial periodontal therapy on circulating TNF- α and HbA1c in type 2 diabetes patients with periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2003; 38: 364-366.
130. Correa F, Gonçalves D, Figueiredo CMS, Bastos AS, Gustafsson A, Orrico SRP. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 53-8.
131. Rosalem JW, Rescala B, Teles RP, Fisher RG, Haffajee AD, Socransky SS, Gustafsson A, Figueiredo CM. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J Periodontol* 2011; 81: 1308-16
132. Page RC, Offenbacher S, et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997; 14: 216-248.
133. Goodson JM, Palys MD, Carpino E, Regan EO, Sweeney M, Socransky SS. Microbiological changes associated with dental prophylaxis. *J Am Dent Assoc* 2004; 135(11):1559-64
134. Westfelt E. Rationale of mechanical plaque control. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 263-7.
135. Costerton JW, Stewart PS. Battling biofilms. *Sci Am* 2001; 285: 74-81.
136. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, 2002; 28: 12-55.
137. Lee A, Ghaname CB, Braun TM, Sugai JV, Teles RP, Loesche WJ, et al. Bacterial and salivary biomarkers predict the gingival inflammatory profile. *J Periodontol* 2012; 83: 79-89.
138. Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol* 1996; 1: 443-490.

139. Kawashima H, Sato S, Kishida M, et al. A comparison of root surface instrumentation using two piezoelectric ultrasonic scalers and a hand scaler in vivo. *J Periodontal Res* 2007; 42(1): 90–5.
140. Baehni PC, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral disease. *Oral Dis.* 2003; 9: 23-29.
141. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 847-67
142. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 878-84.
143. Pilloni A, Pizzo G, Barlattani A, Di Lenarda R, Giannoni M, Guida L, Levrini L, Majorana A, Polimeni A. Perceived and measurable performance of daily brushing and rinsing with an essential oil mouthrinse. *Annali di Stomatologia* 2010;1: 29-32.
144. Fine DH, Furgang D, Sinatra K, Charles C, McGuire A, Kumar LD. In vivo antimicrobial effectiveness of the essential oil-containing mouth rinse 12h after a single use and 14 days use. *J Clin Periontol.* 2005; 32: 335-340.
145. Sharma NC, Araujo MW, Wu MM, Qagish J, Charles CH. Superiority of an essential oil mouthrinse when compared with a 0.05% cetylpyridinium chloride containing mouthrinse: a six-month study. *Int Dent J* 2010; 60: 175-80.
146. Cortelli SC, Cortelli JR, Shang H, McGuire JA, Charles CA. Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: A 6-month randomized clinical trial. *Am J Dent* 2013; 26: 149-55.
147. Mendes MMSG, Zenóbio EG, Pereira OL. Agentes químicos para controle de placa bacteriana. *Revista Periodontia.* 1995; 5: 253-256.
148. Sharma S, Saimbi CS, Koirala B, Shukla R. Effect of various mouthwashes on the levels of interleukin-2 and interferon-gamma in chronic gingivitis. *J Clin Pediatr Dent* 2008; 32: 111-114.
149. Magee L, James P, Scerri A. Measuring social sustainability: a community-centred approach. *Applied Research in the Quality of Life* 2012, 7 (3): 239–61.
150. McGrath C, Bedi R. Measuring the impact of oral health on quality of life in Britain using OHQoL-UK. *J Public Health Dent* 2003; 63: 73-77.
151. Dini E, McGrath C, Bedi R. An evaluation of the oral health quality of life (OHQoL) instrument in a Brazilian population. *Community Dent Health* 2003;20:40-4.
152. Webster K, Cella D, Yost K. The functional assessment of Chronic Illness Therapy (FACIT) measurement system: properties, applications, and interpretation. *Health Qual Life Outcomes* 2003; 1: 79.

153. Bajwa A, Watts TL, Newton JT. Health control beliefs and quality of life considerations before and during periodontal treatment. *Oral Health Prev Dent* 2007; 5: 101-4.
154. Hegarty AM, McGrath C, Hodgson TA, Porter SR. Patient-centred outcome measures in oral medicine: are they valid and reliable? *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 31: 670-4.
155. Stewart A, King A. Conceptualizing and measuring quality of life in older populations. In: Abeles R, et al (Eds). *Aging and the quality of life*. Springer Publishing Company; 1994.
156. Slade G, Strauss R, Atchison K, Kressin N, Locker D, Reisine S. Conference summary: assessing oral health outcomes- measuring health status and quality of life. *Community Dent Health* 1998; 15: 3-7.
157. McGrath C, Bedi R. An evaluation of a new measure of oral health related quality of life--OHQoL-UK(W). *Community Dent Health* 2001; 18: 138-43.
158. World Health Organization. *International classification of functioning, disability and health*. Geneva; 2001.
159. Krespin N. Conference summary: oral health-related quality of life (OHQOL). *Measuring oral health and quality of life* 1996; 11: 113-119.
160. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled Trial. *J Periodontol* 2002; 73: 911-24.
161. Souto GR, Segundo TK, Costa FO, Ferreira Aguiar MC, Mesquita RA. Effect of smoking langerhans and dendritic cells in patients with chronic gingivitis. *J Periodontol* 2011; 82: 619-25.
162. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; 22: 121-35.
163. Løe H, Silness, J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963; 21: 533-551.
164. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
165. Araujo MW, Honey KM, Benedec JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurements using a Constant – force electronic probe: analysis of inter and intraexaminer variability. *J Periodontol* 2003;74:1736-40.
166. Cortelli SC, Feres M, Rodrigues AAB, Aquino DR, Shibli JA, Cortelli JR. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2005; 76: 204-209.

167. Casarin RC, Ribeiro Edel P, Mariano FS, Nociti FH Jr, Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized and aggressive periodontitis. *J Periodontol Res* 2010; 45: 635-42.
168. Teles RP, Sakellari D, Konstantinidis A, Socransky SS, Hafajee AD. Application of the checkerboard immunoblotting technique to the quantification of host biomarkers in gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 2009; 80: 447-56.
169. Richter JT. Diagnosis and treatment of halitosis. *Compendium Cont Dent Edu* 1996; 17: 370-88.
170. Gjermo P, Rösing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000* 2002 Apr;29(1): 70-8.
171. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Pesquisa nacional de saúde bucal – SB Brasil 2010: resultados principais. Brasília, DF: MS; 2011. 92p.
172. D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, DOnos N, Hingorani A, Deanfield J. Association of the Metabolic Syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(10): 3989-94.
173. Pietropaoli D, Monaco A, Del Pinto R, Cifone M, Marzo G, Giannoni M. Advanced glycation and products: possible link between metabolic syndrome and periodontal diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2012; 25(1): 9-17.
174. American Academy of Periodontology. Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis and other clinical conditions. *J Periodontol* 2001; 72:1790-800.
175. Jacobson L, Blomlof J, Lidskorg S. Root surface texture after different scaling modalities. *Scand J Dent Res* 1994;102:156-60.
176. Van der Weijden F, Slot DE. Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. *Periodontol 2000* 2011 Feb;55(1):104-23.
177. Teles RP, Teles FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control. *Braz Oral Res*. 2009 Jun;23 Suppl 1:39-48.
178. Stoeken JE, Paraskevas S, Van der Weijden GA. The long term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. *J Periodontol* 2007 Jul;78(7):1218-28.
179. Van Leeuwen MP, Slot DE, Van der Weijden GA. Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *J Periodontol* 2011 Feb;82(2): 174-94.
180. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000*, 1997; 15: 55-62.

181. Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *Journal of Clinical Periodontology* 2008; 35: 398–409.
182. Offenbacher S, Barros S, Mendonza L, Mauriello S, Preisser J, Moss K, de Jager M, Aspiras M. Changes in gingival crevicular fluid inflammatory mediator levels during the induction and resolution of experimental gingivitis in humans. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 324-33.
183. Apatzidou, AD, Bakirtzoglou E, Vouros I, Karagiannis V, Papa A. Association between oral malodour and periodontal disease-related parameters in the general population. *Acta Odontol Scand* 2012; 71 (1): 189-95
184. Garcia M, Silveira J, Gargioni Filho A, Cortelli J, Costa F, Aquino D, Franco G, Cortelli S. Níveis comparativos pré e pós-tratamento de CSV, carga bacteriana total subgingival e sangramento gengival. *Braz J Periodontol* 2014; 24 (1): 24-9.
185. Minayo MC, Gomes, SF. *Pesquisa social: teoria, método e criatividade*. Petrópolis: Vozes; 2008.
186. Nagarajan S, Chandra R. Perception of oral health related quality of life (OHQoL-UK) among periodontal risk patients before and after periodontal therapy. *Community Dent Health* 2012; 29 (1): 90-4.
187. Busato I, Ignácio S, Brancher J, Moyses S, Azevedo-Alanis L. Impact of clinical status and salivary conditions on xerostomia and oral-related quality of life of adolescents with type-1 diabetes mellitus. *Community Dent Oral Epidemiol* 2012; 40 (1): 62-9.
188. De Pinho AM, Borges CM, Abreu MH, Ferreira EF, Vargas AM. Impact of periodontal disease on the quality of life of diabetics based on different clinical diagnostic criteria. *Int J Dent* 2012; 2012: 1-8.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Modelo de ficha clínica



Universidade de Taubaté
Clínica de Odontologia

Disciplina de Periodontia
Grad. () Pós ()

Paciente _____ PRU _____
 Nascimento ____/____/____ Idade _____ Gênero _____ Cor _____
 Endereço _____
 Cidade _____ CEP _____ Telefone _____
 Profissão _____ Estado Civil _____
 R.G.: _____ CPF (CIC) _____
 Aluno _____ Série _____
 Início do Tratamento ____/____/____ Término do Tratamento ____/____/____

[illegible]

De acordo:

____/____/____
Data

Paciente

APÊNDICE B - Ficha de anamnese

HISTÓRIA MÉDICA

Motivo da consulta _____

Há quanto tempo foi sua última consulta médica? _____

Qual o motivo? _____ Médico: _____

No momento está fazendo algum tratamento médico? _____

Está tomando algum medicamento? () sim () não

NOME	DOSAGEM	TEMPO DE USO

Tem sensibilidade a algum anestésico ou alergia a algum medicamento: _____

Já esteve hospitalizado alguma vez? _____ motivo? _____

Teve hemorragia? _____ Pressão arterial _____

Você consome bebida alcoólica? _____ Com que frequência? _____

Fuma? _____ Quantidade de cigarros/dia? _____ Ex-fumante? _____

Tempo que fumou: _____ A quanto tempo parou? _____

Já fez uso de drogas injetáveis ou outras? _____

Está grávida? _____ Quantos meses? _____ Toma anticoncepcional?: _____

Sua gengiva sangra com facilidade? _____ Sua gengiva parece inchar às vezes? _____

Seus dentes são moles? _____ Os alimentos se prendem entre seus dentes? _____

Tem hábito de ranger os dentes _____ Usa fio dental, fita ou palito? _____

Quantas vezes ao dia escova os dentes? _____ Qual o tipo de escova? _____

Respira pela boca? _____

Você já passou por tratamento periodontal? _____ Há quanto tempo? _____

Algum membro da família desenvolveu doença gengival? _____

Já usou aparelho ortodôntico? _____ () fixo () móvel () Por quanto tempo? _____

VOCÊ APRESENTOU ALGUM DOS SEGUINTE SINTOMAS?

	SIM	NÃO		SIM	NÃO
01. Problema Cardíaco			23. Parentes Diabéticos		
02. Angina			24. Problemas de Tireóide		
03. Pressão Alta			25. Problemas Sangüíneos		
04. Febre Reumática			26. Artrite		
05. Ataque Cardíaco			27. Transfusão Sangüínea		
06. Marca-passo Cardíaco			28. Hemofilia		
07. Problema Cardíaco Congênito			29. Problemas Nervosos		
08. Prolapso Nervoso			30. Epilepsia		
09. Problema Respiratório			31. Depressão		
10. Tuberculose			32. Tratamento Psiquiátrico		
11. Asma			33. Problemas de Vista		
12. Bronquite			34. Glaucoma		
13. Enfisema Pulmonar			35. Problema Nasal		
14. Problemas Renais / Diálise			36. Problema no Ouvido		
15. Problema Gastrointestinal			37. Dores de Cabeça Forte		
16. Hepatite			38. Câncer		
17. Anemia			39. Parentes com Câncer		
18. Úlcera			40. Quimioterapia		
19. AIDS			41. Doenças Venéreas(Sífilis, Gonorréia)		
20. HIV Positivo			42. Herpes		
21. Parentes ou próximos com AIDS			43. Uso de Cortisona		
22. Diabetes			44. Menopausa		

Observações: _____

	SIM	NÃO		SIM	NÃO
RADIOGRAFIAS			MICROBIOLÓGICO		
FOTOS			EXAME DE SANGUE		

APÊNDICE C - Ficha de avaliação periodontal

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27		
	MV	MEV	DV	L/P	MV	MEV	DV	L/P	MV	MEV	DV	L/P	MV	MEV	DV	L/P
MG-FB																
MG-JEC																
JEC-FB																
IP																
IG																
	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37		
	MV	MEV	DV	L/P	MV	MEV	DV	L/P	MV	MEV	DV	L/P	MV	MEV	DV	L/P
MG-FB																
MG-JEC																
JEC-FB																
IP																
IG																

MG-FB

MG-JEC

JEC-FB

IP

IG

TUBO 1 DENTE

TUBO 2 DENTE

TUBO 3 DENTE

TUBO 4 DENTE

TUBO 5 DENTE

MV

MEV

DV

L/P

FACE

FACE

FACE

FACE

FACE

VOLUNTÁRIO N:

APÊNDICE D - Ficha de avaliação Periotron e Halimeter

VOLUNTÁRIO	Nº :
-------------------	-------------

PERIOTRON		INICIAL	90 DIAS
	DATA		
	TUBO 1		
	TUBO 2		
	TUBO 3		
	TUBO 4		
	TUBO 5		

HALIMETER		INICIAL	90 DIAS
	DATA		
	Medida 1		
	Medida 2		
	Medida 3		
	Média		

APÊNDICE E - Índices periodontais

Índice de Placa Silness - Løe (1964)

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	Média
Vestibular															
Mesial															
Lingual															
Distal															
Média															

Mandíbula

	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	Média
Vestibular															
Mesial															
Lingual															
Distal															
Média															

0 = ausência de placa na área gengival
 1 = presença de uma fina camada de placa da margem gengival
 2 = moderado acúmulo de depósito moles na margem/sulco gengival
 3 = abundante acúmulo de depósito moles na margem/sulco gengival

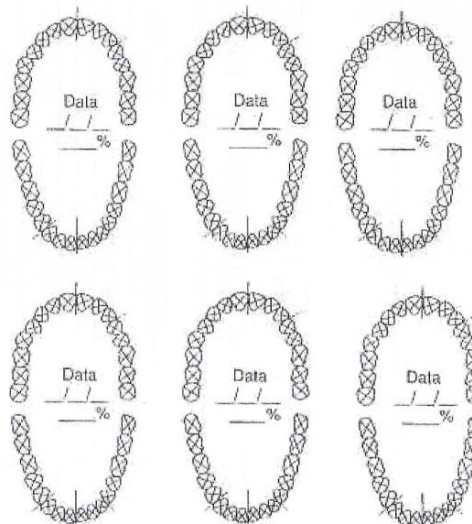
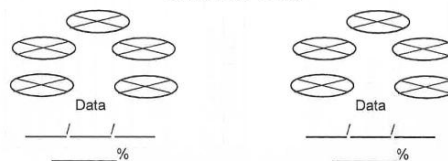
Índice Gengival Løe - Silness (1963)

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	Média
Vestibular															
Mesial															
Lingual															
Distal															
Média															

Mandíbula

	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	Média
Vestibular															
Mesial															
Lingual															
Distal															
Média															

0 = gengiva normal
 1 = inflamação branda - sem sangramento à sondagem
 2 = inflamação moderada - com sangramento à sondagem
 3 = inflamação avançada - tendência ao sangramento espontâneo

Índice de Higiene Oral
O' Leary (1974)Índice de Pass
Samuel Low (1998)

APÊNDICE F - Questionário de qualidade de vida – OHQoL

Por favor, responda as questões abaixo escolhendo uma das alternativas. Gostaria de salientar que não existem respostas certas ou erradas. A sua colaboração será muito importante para a melhoria dos serviços de odontologia deste Centro de Saúde. Obrigado.

1	Quando foi sua última visita ao dentista?	☐ nos últimos 12 meses ☐ entre 1 e 3 anos ☐ há mais de 3 anos ☐ nunca fui ao dentista
2	Qual o motivo de sua última visita ao dentista?	☐ check up (rotina) ☐ tratamento ☐ enviado (referenciado) por outro serviço de odontologia ☐ dor/emergência
3	Qual destas afirmativas melhor descrevem você? (pode escolher mais de uma alternativa)	☐ somente vou ao dentista quando preciso ☐ não tenho condições de pagar tratamento dentário. ☐ eu sei que tenho um problema dentário mas eu acho que isto pode esperar ☐ é difícil conseguir atendimento odontológico neste serviço de saúde
4	Se você tiver dor em um dente de trás você iria tentar:	☐ obturar ou tratar o canal se for o caso ☐ extrair
5	Se você tiver dor em um dente da frente você iria tentar :	☐ obturar ou tratar o canal se for o caso ☐ extrair
6	A dentição completa de um adulto é composta por 32 dentes. Quantos dentes naturais você tem?	☐ 20 ou mais ☐ entre 10 e 19 ☐ menos de 10 ☐ nenhum dos meus dentes naturais
7	Quais destas afirmativas melhor descreve você?	☐ uso prótese total (dentadura) ☐ uso prótese parcial removível (ponte móvel) ☐ não uso prótese de nenhum tipo
8	Se você tem alguns de seus dentes naturais, responda esta questão (pode escolher mais de uma alternativa)	☐ teve dor de dente no último ano? ☐ teve ou tem algum dente quebrado/perdido ou alguma restauração quebrada? ☐ tem dentadura que machuca ou que esteja quebrada? ☐ tem gengiva machucada ou que sangra? ☐ tem feridas na boca ou locais doloridos que não as gengivas?
9	Como você classificaria a sua saúde bucal em relação aos seus dentes, gengivas, boca, dentadura? (escolha apenas uma das alternativas)	☐ boa ☐ moderada ☐ ruim
10	De acordo com a seguinte afirmativa "Eu sempre sinto ansiedade quando vou ao dentista" você diria:	☐ Eu me sinto exatamente assim ☐ As vezes me sinto assim ☐ não me sinto assim
11	Qual a sua idade?	☐ 18 a 24 anos ☐ 55 a 64 anos ☐ 25 a 34 anos ☐ 65 a 74 anos ☐ 35 a 44 anos ☐ 75 ou mais ☐ 45 a 54 anos
11	Qual o seu grau de escolaridade?	☐ primário (primeira a oitava série) completo ou incompleto ☐ secundário (colegial ou técnico) completo ou incompleto ☐ universitário completo ou incompleto
11	Quantas vezes você escova os dentes por dia ?	☐ mais do que duas vezes por dia ☐ duas vezes por dia ☐ uma vez por dia ☐ menos do que uma vez por dia
12	Qual o seu sexo?	☐ feminino ☐ masculino
14	Qual o seu salário mensal?	☐ 1 - 4 ☐ desempregado atualmente ☐ 5 – 9 ☐ 10 ou mais

As questões abaixo descrevem o efeito que a sua saúde bucal (os seus dentes, gengivas, boca e próteses) tem na qualidade de sua vida.

Lembre-se de que não existem respostas certas ou erradas.

	MB	B	N	R	MR*
q) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua alimentação ou na satisfação alimentar?	☐	☐	☐	☐	☐
r) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua aparência?	☐	☐	☐	☐	☐
s) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua fala?	☐	☐	☐	☐	☐
t) Qual o efeito que a sua saúde bucal tem na sua saúde geral/ bem estar?	☐	☐	☐	☐	☐
u) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu sono ou na capacidade de relaxar?	☐	☐	☐	☐	☐
v) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua vida social?	☐	☐	☐	☐	☐
w) Qual o efeito de sua saúde bucal nas suas relações românticas?	☐	☐	☐	☐	☐
x) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu sorriso ou na sua risada?	☐	☐	☐	☐	☐
y) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua auto confiança (ausência de situações embaraçosas)?	☐	☐	☐	☐	☐
z) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua maneira de ser (ausência de preocupação)?	☐	☐	☐	☐	☐
aa) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu humor ou felicidade?	☐	☐	☐	☐	☐
bb) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu trabalho ou nas suas atividades usuais?	☐	☐	☐	☐	☐
cc) Qual o efeito de sua saúde bucal nas suas finanças?	☐	☐	☐	☐	☐
dd) Qual o efeito de sua saúde bucal na sua personalidade?	☐	☐	☐	☐	☐
ee) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu conforto (ausência de dor / desconforto)?	☐	☐	☐	☐	☐
ff) Qual o efeito de sua saúde bucal no seu hálito?	☐	☐	☐	☐	☐
Você tem problemas com seus dentes ou gengivas afetando nas suas atividades diárias como trabalho e hobbie (passatempo) ?	☐ Todo o tempo ☐ A maior parte do tempo ☐ Boa parte do tempo ☐ Alguma parte do tempo ☐ Pouco do tempo ☐ Nada do tempo				
Você tem problemas com seus dentes ou gengivas afetando nas suas atividades sociais junto a sua família, amigos ou colegas de trabalho?	☐ Todo o tempo ☐ A maior parte do tempo ☐ Boa parte do tempo ☐ Alguma parte do tempo ☐ Pouco do tempo ☐ Nada do tempo				
Os problemas com seus dentes ou gengivas fazem você ter que evitar conversas com as pessoas devido a sua aparência?	☐ Todo o tempo ☐ A maior parte do tempo ☐ Boa parte do tempo ☐ Pouco do tempo ☐ Nada do tempo				

* MB=Muito Bom B=Bom N=Nenhum R=Ruim MR= Muito Ruim

APÊNDICE G - Carta de Informação

Título: Avaliação da terapia gengival mecânico-química em indivíduos com diabetes, obesidade ou diabetes: análises quantitativas e qualitativas de aspectos locais e gerais

Pesquisadora: Antonio Carlos Gargioni Filho

Coordenador: Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino

Descrição:

Estou ciente de que a gengivite é uma doença que acontece na gengiva deixando-a inflamada (vermelha, inchada, com sangramento ao escovar, comer ou dormir), causando mau hálito (cheiro ruim na boca) e que se não for tratada poderá envolver as estruturas que suportam (seguram) o dente, podendo levar a perda de dentes. Fui esclarecido de que a placa bacteriana (massa branca e mole) e o tártaro (massa dura) que provocam a doença da gengiva são formados por muitas bactérias e que a gengivite pode ser associadas com problemas sistêmicos (da saúde geral), como por exemplo, o diabetes melito e obesidade. O diabetes melito é uma doença caracterizada pela desordem no metabolismo de açúcar, gordura, e proteína e função e estrutura de veias sanguíneas. A obesidade é uma condição de acúmulo aumentado de gordura no corpo, no qual a saúde e o bem-estar dos indivíduos pode ser prejudicialmente afetados. Essas duas situações contribuem para o agravamento da inflamação da gengiva e vice-versa.

Estou ciente de que participarei deste estudo recebendo escovas de dente, pasta de dente e líquidos (enxaguatório bucal) para fazer bochecho. O uso destes produtos deverá ser feito por um prazo de três meses. Sei também que os produtos serão fornecidos pelos pesquisadores e que eles explicarão para mim como devo proceder para limpar meus dentes da melhor maneira possível.

Estou ciente de que deverei participar deste estudo pelo período de três meses e me comprometo a atender às consultas quando for solicitada e de que serão realizados exames clínicos para avaliar como está minha gengiva, se tenho muitas bactérias em minha boca. Além destes exames receberei uma limpeza profissional (profilaxia e remoção de tártaro) dos meus dentes no início deste estudo.

Tempo envolvido e benefício:

Estou ciente que nenhum tempo adicional será requisitado além de quatro consultas que serão agendadas.

Estou ciente de que este estudo não me trará malefícios à saúde bucal ou geral

Custo e pagamentos:

Para participar deste estudo eu não terei nenhum custo.

Afirmo de que me foi garantido de que o pesquisador responsável pelo estudo ou os pesquisadores estarão sempre à minha disposição para tirar qualquer dúvida.

Sigilo:

Estou ciente de que qualquer informação a meu respeito obtida na pesquisa será confidencial. Foi para mim explicado que a minha identidade não será revelada em qualquer descrição ou publicação desta pesquisa.

Direito de se retirar da pesquisa:

Estou ciente de que posso me recusar a participar deste estudo a qualquer momento.

APÊNDICE H - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Consentimento voluntário:

Eu,.....
certifico ter lido (ou que o mesmo tenha sido lido para mim) e que compreendi as informações contidas na “Carta de Informação” referente ao estudo “Avaliação da terapia gengival mecânico-química em indivíduos com diabetes, obesidade ou diabetes: análises quantitativas de aspectos locais e gerais”.

Estou esclarecido de que quaisquer dúvidas que eu tenha pertinentes à pesquisa serão respondidas por um dos pesquisadores. Quaisquer perguntas que eu tenha com relação a meus direitos como indivíduo pesquisado serão respondidas. Uma cópia deste documento me será entregue. Minha assinatura abaixo significa que eu concordei em participar nesse estudo.

Assinatura do paciente

Testemunha

Data:...../...../ 201....

Eu declaro que expliquei ao sujeito acima citado a natureza e finalidade, benefícios potenciais à participação dele neste estudo. Eu respondi a todas as perguntas que me foram feitas e testemunhei as assinaturas acima.

Assinatura do pesquisador

Data:...../...../201....

ANEXOS

ANEXO A - Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa



PRPPG-Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação
Comitê de ética em Pesquisa
Rua Visconde do Rio Branco, 210 Centro Taubaté-SP 12020-040
Tel.: (12) 3625.4143 – 3635.1233 Fax: (12) 3632.2947
cepunitau@unitau.br

DECLARAÇÃO Nº 491/10

Protocolo CEP/UNITAU nº 522/10 (Esse número de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto)

Projeto de Pesquisa: *Avaliação da terapia gengival mecânico-química em indivíduos com diabetes, obesidade ou diabetes: análises quantitativas e qualitativas de aspectos locais e gerais*

Pesquisador(a) Responsável: Suzane A. Raslan

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião de **12/11/2010**, e no uso das competências definidas na Resolução CNS/MS 196/96, considerou o Projeto acima **Aprovado**.

Taubaté, 12 de novembro de 2010

Prof. Robison Baroni
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté

ANEXO B - Cronograma de Atividades

	2012		2013			2014	2015
	Mar/ Ago	Set/ Dez	Jan/ Abril	Maio/ Ago	Set/ Dez	Jan/ Abril	Jan/ Mar
Seleção de participantes							
Coletas iniciais de fluido gengival e de CSV e OHQoL							
Tratamento Periodontal							
Coletas finais de fluido gengival e de CSV e OHQoL							
Reações de PCR em Tempo Real							
Análise imunoenzimática							
Tabulação dos dados							
Análise estatística							
Elaboração do artigo e envio para publicação							
Defesa de tese							

ANEXO C - Custos e Fomento

O presente projeto recebeu auxílio à pesquisa na categoria Auxílio Pesquisa Regular à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) sob o nº 2010/20424-1.

ANEXO D - Executores do Projeto

Coordenação

- Profa. Dra. Sheila Cavalcia Cortelli

Coordenação geral, diagnóstico periodontal e monitoramento dos parâmetros clínicos.

Co-orientadora do aluno doutorando.

Orientação do aluno doutorando

- Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino

Randomização, distribuição nos grupos e monitoramento do controle químico

Endocrinologia e metabologia

- Dra. Priscila Romeiro Aquino Pinho

Diagnóstico sistêmico (diabetes) e monitoramento dos indicadores sistêmicos

Professores colaboradores

- Prof. Dr. Fernando de Oliveira Costa

Delineamento e análise estatística dos dados.

- Prof. José Roberto Cortelli

Desenho do projeto e tratamento de pacientes

- Prof. Gilson Cesar Nobre Franco

Análises imunológicas e salivares:

- Prof. Dr. Edson Rodrigues

Análises microbiológicas

- Profa. Dra. Karina Cogo

Alunos

Doutorandos:

- Suzane A Raslan

- Antonio Carlos Gargioni Filho

- Camila Oliveira de Alencar

- Rodrigo Dalla Pria Balejo

- Marcos Vinícius Moreira de Castro

- Agente de Laboratório: Juliana Guimarães Santos

- Graduando bolsista: Maurício Dias Pereira da Silva

ANEXO E - Artigo aceito para publicação no *Journal of Periodontology*

QUERIES - jop140197q

- [AQ1] Please review the author byline and running heads to ensure that all author surnames are spelled correctly and that the author order is as meant.
- [AQ2] This article and the abstract have been edited for clarity and flow throughout with the intent to retain original meaning. This includes text body and headings, all footnotes (affiliation and otherwise), any figures and their legends, and any tables and their legends, and any acronyms that have been spelled out per journal style. Please read carefully for completeness and definition, and confirm or amend as needed.
- [AQ3] In Key words: Only those terms and phrases that match MeSH key words are allowed. Thus, some terms have been adjusted (see <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> for common MeSH terms and phrases).
- [AQ4] Per style, generic names/descriptions of the two TaqMan products, Milli-Q, and Tween 20 have been added in text. The brand names were moved to the manufacturers footnote. Please review the wording in text and read over the manufacturers footnotes carefully.
- [AQ5] Please identify the masked researcher. If an author, please use initials. If a non-author, please supply the first and last name, followed by the position, place, and location of employment.
- [AQ6] Correct as spelled out for USP at only use?
- [AQ7] Please identify the independent research assistant. If an author, please use initials. If a non-author, please supply the first and last name, followed by the position, place, and location of employment.
- [AQ8] Per style, the use of “we/our/us” is avoided in text. Please review the rewording carefully throughout.
- [AQ9] In supporting info: Please translate Centro de Pesquisa em Odontologia into English and spell out PROCAD into English.
- [AQ10] In Ref. 3: The URL is not valid. Please supply the correct link.
- [AQ11] In Tables 2 to 4, correct that bold indicates significance of *P* values?
- [AQ12] According to AMA style guidelines, <IP></I> values >0.01 have been rounded to two digits and those <0.01 have been rounded to three digits, with the lowest value being <0.001, unless doing so would affect significance.
- [AQ13] Please review and reconcile decimals and commas throughout Table 3 as needed. Ex. 799,87 should be 799.87?
- [AQ14] In Table 4, please provide units of measure for Mean IL-1 β and Mean GCF.

Clinical, Microbial, and Immune Responses Observed in Patients With Diabetes After Treatment for Gingivitis: A Three-Month Randomized Clinical Trial

Suzane A. Raslan,* Jose R. Cortelli,† Fernando O. Costa,‡ Davi R. Aquino,† Gilson Cesar Nobre Franco,§ Luis Otavio Miranda Cota,† Antonio Gargioni Filho,* and Sheila C. Cortelli†

Background: Although patients with diabetes are frequently affected by periodontitis, only a few investigations have focused on gingivitis in this at-risk population. This randomized placebo-controlled clinical trial compared the response to a gingivitis treatment protocol that combined mechanical procedures and daily use of an essential oil (EO) mouthrinse between patients with and without diabetes.

Methods: The whole-mouth periodontal probing depth (PD), gingival index (GI), and plaque index (PI) were monitored in gingivitis cases among systemically healthy patients (n = 60) or those with diabetes (n = 60) at baseline and 3 months after treatment. Levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and total bacterial load were determined by a real-time polymerase chain reaction in intrasulci plaque samples. The volume of gingival crevicular fluid (GCF) was quantified, and interleukin-1 β (IL-1 β) levels were determined in GCF samples. After a full-mouth ultrasonic debridement, patients were randomly assigned to an EO or a placebo rinse for 90 days (40 mL/day). The data were analyzed through repeated-measures analysis of variance and multiple comparisons Tukey tests ($P < 0.05$).

Results: GI was more severe in the diabetes group. Diabetes impaired GI and reduced GCF volume. PD, bacterial levels, and IL-1 β improved similarly in both systemic conditions. The adjunctive use of EO provided greater reductions of PI, GI, total bacterial load, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, and GCF volume.

Conclusions: Response to gingivitis treatment in patients with diabetes can slightly differ from that in patients without diabetes. Daily use of an EO mouthrinse after ultrasonic debridement benefited patients with and without diabetes. *J Periodontol* 2015;86:■■■■-■■■■.

KEY WORDS

Bacteria; diabetes mellitus; gingivitis; interleukin-1; oils; therapeutics.

In humans, dental biofilms accumulate on a daily basis, leading to different degrees of gingival inflammatory responses. Interestingly, different patients respond differently to the same bacterial challenge.¹ This fact is partially explained by the presence of certain systemic diseases, such as diabetes, that could modify gingival inflammatory response. Gingivitis is a highly prevalent disease worldwide.² The incidence of diabetes has been increasing in many countries, and >370 million people are believed to be affected worldwide.³ Currently, $\approx$ 14 million Brazilian people have diabetes, and this number is expected to reach 19 million by the year 2030.³ For this reason, it is important to understand the interaction between gingivitis and diabetes. Periodontitis is a more severe type of periodontal disease that follows gingivitis in the disease course. Interestingly, periodontitis has been shown to be the sixth most common comorbidity associated with diabetes.⁴ The relationship between periodontitis and diabetes has been well studied;^{5,6} however, less attention has been given to the gingivitis–diabetes relationship, which represents a lost opportunity to study preventive measures that could increase the quality of life for many patients with diabetes. In this context, a manifesto published this year, which was informed

* Dental School, University of Taubaté, Taubaté, São Paulo, Brazil.

† Center for Periodontal Research, University of Taubaté.

‡ Dental School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

§ Dental School, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

by the first joint European Federation of Periodontology and American Academy of Periodontology workshop on periodontitis and systemic health, highlighted the relevance of periodontal health to achieving general health in both systemically healthy and diseased individuals, such as those with diabetes.⁷ In addition, it is unclear whether gingivitis progresses to periodontitis more quickly in the presence of diabetes. In the population with diabetes, the nature of the response to gingivitis treatment remains unknown.

Although some authors have reported that the microbial profiles of periodontitis are similar between patients with well-controlled diabetes and patients without diabetes,⁸ diabetes seems to lead to differences in the periodontal microbiota.⁹⁻¹¹ In addition, periodontitis is more severe¹² and shows a faster rate of progression¹³ in patients with diabetes compared with their counterparts without diabetes. Poor metabolic control interferes directly with periodontitis.¹⁴ Ervasti et al.¹⁵ observed higher bleeding scores in patients with gingivitis and diabetes, whereas Aemaimanan et al.¹⁶ reported that glycemic control influences the severity of gingival inflammation and the presence of selected pathogens. Ebersole et al.¹⁷ reported a higher frequency of *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Campylobacter* spp. among patients with diabetes.

In addition to differences in the dental biofilm, differences in the genetic profile and immune response should also be considered. Human β -defensins have a strong antibacterial action against periodontal pathogens. Compared with patients without diabetes, patients with diabetes and also with periodontitis and gingivitis showed higher levels of β -defensins 2 and 3 in the gingival crevicular fluid (GCF).¹⁸ Moreover, uncontrolled type 2 diabetes is associated with high levels of proinflammatory cytokines in both periodontally healthy and diseased sites.¹⁹ This increase can contribute to the transition from gingivitis to periodontitis.²⁰ In patients with type 1 diabetes, Salvi et al.²¹ reported that the development of gingivitis was accompanied by higher levels of cytokines after controlling for differences in the mean plaque index (PI) and microbial composition.

In systemically healthy individuals, mouthwashes are helpful tools for gingivitis control.²² Among available antimicrobials for daily plaque control, a fixed combination of four essential oils (EO) (timol, menthol, eucalyptol, and methyl salicylate) has demonstrated good antiplaque and antigingivitis properties.²³ Its regular use is accompanied by a reduction in inflammatory levels comparable with those provided by chlorhexidine but with reduced

side effects.²⁴ However, there is no scientific support regarding the adjunctive use of EO among patients with diabetes.

Therefore, the aim of the present placebo-controlled clinical trial is to compare the response to a gingivitis treatment protocol that combined mechanical procedures and daily use of an EO mouthrinse between patients with and without diabetes.

MATERIALS AND METHODS

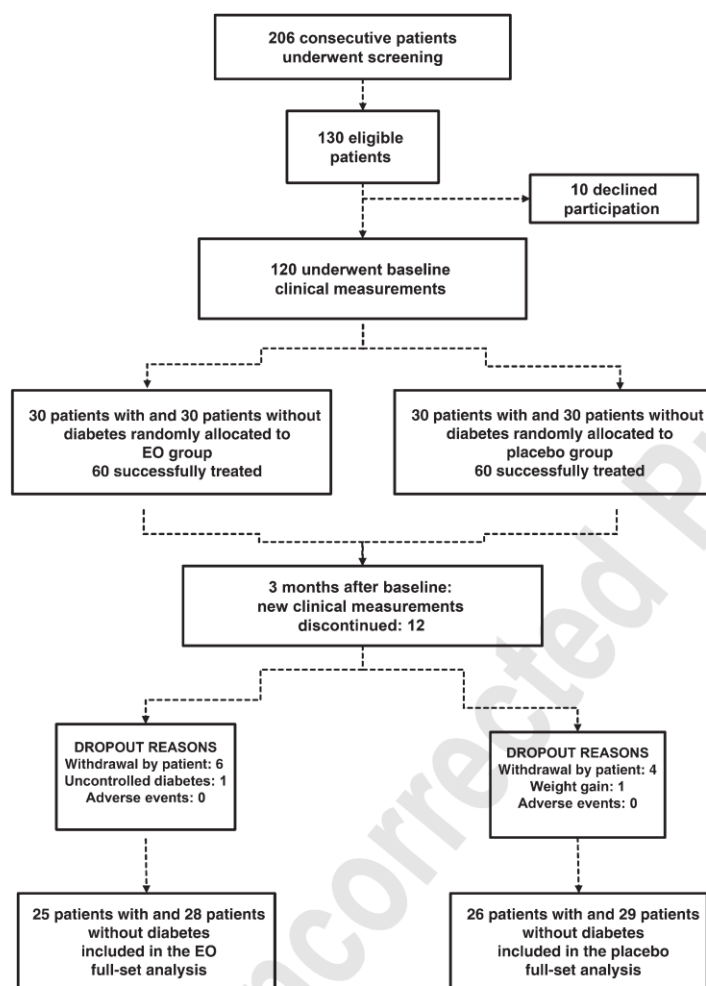
The present 3-month, double-masked, single-centered, parallel-group, placebo-controlled, randomized clinical trial (RCT) was registered at ClinicalTrials.gov as NCT02123563 and was approved by the Institutional Committee on Research of the University of Taubaté, Taubaté, São Paulo, Brazil (protocol no. 522/10) in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2000. Before selection, oral and written explanations regarding the research protocol were given to the eligible participants. All patients provided written informed consent before enrolling in the present study, which was composed of baseline and 90-day post-treatment appointments.

Study Population

A total of 120 eligible patients were recruited for the study, and 108 underwent the 3-month final examination (Fig. 1).²⁵ The 49 male and 71 female (aged 20 to 45 years; mean age: 32 ± 6 years) participants in this study were patients with gingivitis and in good general health (control group) or with diabetes (diabetes group) who sought dental care in the Dental Clinic of the University of Taubaté from June 2012 to December 2012. Data and personal information on the medical and dental histories of the patients were obtained by interview.

The initial sample size of 25 to 30 patients per group was chosen considering standard deviations from a previous study of gingivitis treatment,²⁶ an effect size (gingival index [GI], a minimum detectable change of 10%), a power of 80%, a significance level of 5%, and a loss to follow-up rate of up to 20% of patients.

Inclusion criteria. The inclusion criteria were as follows: 1) plaque-related gingivitis (with no radiographic evidence of periodontal bone resorption and a bleeding site rate of $>30\%$);^{27,28} 2) ≥ 20 natural teeth; 3) good general health or controlled type 2 diabetes (with a blood glycosylated hemoglobin level between 6.5% and 7%) that was diagnosed ≥ 3 years but no more than 5 years before the study; and 4) normal salivary flow. Although the medical records were checked, a physician monitored the diagnosis and the level of diabetes control for the duration of the study.

**Figure 1.**

Study design from screening to completion of the trial according to Consolidated Standards of Reporting Trials.

Exclusion criteria. The exclusion criteria included the following: 1) gingival overgrowth; 2) orthodontic devices, extended fixed prosthetic devices, removable partial dentures, or overhanging restorations; 3) systemic diseases or other conditions that could influence the periodontal status (other than diabetes within the diabetes group); 4) obesity; 5) alcohol abuse; 6) pregnancy or breastfeeding; 7) history of sensitivity or suspected allergies after the use of oral hygiene products; 8) any antibiotic prophylaxis; 9)

antibiotics and/or anti-inflammatory drug use in the 6 months before the beginning of the study; 10) regular use of chemotherapeutic antiplaque/antigingivitis products; 11) periodontal treatment performed within 6 months before study initiation; and 12) unwillingness to return for follow-up.

Clinical Examination

A single calibrated examiner (SAR) performed a complete periodontal examination during the screening phase. Initially, measurements of the periodontal probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), PI,²⁹ and GI³⁰ were obtained at four sites per tooth using a manual periodontal probe. A panoramic radiograph was obtained for each patient. Each patient with a periodontal diagnosis of plaque-related gingivitis was included. At baseline and at 3 months, the periodontal PD, PI, and GI were monitored as the clinical outcomes by a second masked and calibrated examiner (SCC). The agreement between examiners was high ($\kappa = 0.84$ for PD and 0.82 for CAL). At the same visits (baseline and 3 months), microbial and immune parameters were also evaluated.

Microbial Examination

Subgingival samples were obtained from four periodontal sites (one from each quadrant) that exhibited bleeding on probing, as described by Cortelli et al.³¹ Each selected tooth was isolated with sterile cotton rolls, and the supragingival plaque was removed with sterile curets. A sterilized no. 30 paper point was carefully inserted to the depth of the gingival pocket, maintained in position for 60 seconds, and later stored at -80°C in empty minitubes.

Bacteria from the sterile paper point were dispersed in Tris-EDTA solution (0.01 M, pH 8) using a vortex mixer at the maximal setting for 1 minute

|| PCP-UNC, Hu-Friedy, Chicago, IL.

and then maintained at -80°C until laboratory processing. A genomic DNA purification kit[¶] was used to extract the DNA from the samples following the instructions of the manufacturer.

To quantify the total bacteria load and the periodontopathogens *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *Tannerella forsythia*, the real-time quantitative polymerase chain reaction technique was performed in a 25- μL reaction volume containing 12.5 μL of 2 $\times$ master mix,[#] 300 nM forward and reverse primers, 250 nM hydrolysis probes,^{**} and 2.5 μL DNA sample in a thermal cycler. The cycling conditions were 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and at 60°C for 1 minute. In the negative control, the DNA sample was replaced by sterile ultrapure water.^{††} The primer/probe sequences were as follows: for *A. actinomycetemcomitans*, forward, CAAGTGTGATTAGGTAGTTGGTGGG and reverse, TTCATTACGCGGCATGGC (probe, ATCGCTAGCTGGTCTGAGAGGATGGCC; reference strain, American Type Culture Collection [ATCC] 33384); for *P. gingivalis*, forward, ACCTTACCCGGGATTGAAATG and reverse, CAACCATGCAGCACCTACATAGAA (probe, ATGACTGATGGTGAAAACCGTCTTCCCTTC; reference strain, W83); for *T. forsythia*, forward, AGCGATGGTAGCAATACCTGTC and reverse, TTCGCCGGGTTATCCCTC (probe, CACGGGTGAGTAACG; reference strain, ATCC 43037); and for total bacterial load (universal primer), forward, TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA and reverse, TGCGGGACTTAACCCAACA (probe, CACGAGCTGACGACA[AG]CCATGCA; reference strain, *Escherichia coli* ATCC 25922). Their specificity was checked using a basic local alignment search tool.^{‡‡}

For standard curves, known amounts of each bacterial species (10^1 to 10^8 cells) were used to convert cycle threshold values into the number of bacterial cells in the samples.

Immunoassay

GCF was collected from the same sites that were microbiologically sampled according to Casarin et al.³³ After an interval of 90 seconds after subgingival biofilm collection, the teeth were washed, isolated with sterile cotton rolls, and gently dried. GCF was collected by placing filter paper strips into the gingival pocket until slight resistance was felt and then leaving them there for 15 seconds. After filter paper removal, the volume of the sample was immediately measured with the aid of a calibrated electronic GCF measuring device.^{††} The strips were then placed in sterile tubes containing 400 μL phosphate-buffered saline with 0.05% polysorbate 20.^{§§} Strips visually contaminated with blood were discarded, and a new collection was performed after 30 seconds. During collection, the GCF samples were kept on ice and then stored at -80°C .

The laboratory aliquots of each GCF sample were combined, yielding a single observation per patient at each time point. These samples were assayed by an enzyme-linked immunosorbent assay using a commercially available kit^{|||} for interleukin- 1β (IL- 1β), according to the instructions of the manufacturer. Samples were diluted with the diluent included in the kit. This dilution step was used to calculate the concentration of IL- 1β in the GCF. The concentration was calculated with a standard curve, which was prepared using the standard proteins in the kit. The immune assays were run in duplicate, and the mean values were used to calculate the concentrations of each cytokine.

Gingivitis Treatment

According to their systemic condition, two blocks of patients were allocated randomly to one of two groups by a closed-envelope system. Previously, opaque envelopes containing identifications for either the EO or placebo groups were closed, mixed, and then numbered. Each selected participant took a single envelope, which was opened by a masked researcher who then assigned the patient to a specific group.

After baseline examinations, the EO group underwent a one-stage ultrasonic debridement to remove plaque, stain(s), and dental calculus. The EO group also received a 90-day supply of mouthrinse (twice daily use; 20 mL for 30 seconds) containing a fixed combination of four EO (0.092% eucalyptol, 0.042% menthol, 0.060% methyl salicylate, and 0.064% thymol), zinc chloride, and sodium fluoride (0.0221%).^{¶¶} After identical mechanical procedures, the placebo group followed the same rinsing regimen with a placebo solution (15% sorbitol solution; 21.6% ethanol, United States Pharmacopeia grade; 0.05% sodium saccharin; 0.1% benzoic acid; mint flavoring; sodium benzoate; purple dye; and water enough for 1 L).^{##} One independent research assistant dispensed 1,500 mL of either the EO or placebo in identical sets of three 500-mL bottles, labeled only with the randomization code on the label and no other identifying information. Researchers who had any contact with the study participants were masked to their treatment assignment for the duration of the study and the completion of statistical analysis. Each month, participants received a set of mouthrinse bottles and plastic cups marked to indicate a 20-mL volume. The

¶ Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA.

TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific.

** TaqMan probe, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific.

†† Milli-Q water, EMD Millipore, Billerica, MA.

‡‡ Oraflow, Plainview, NY.

§§ Tween 20, Thermo Fisher Scientific.

||| R&D Systems, Minneapolis, MN.

¶¶ Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

Byofórmula, Taubaté, São Paulo, Brazil.

first rinse was performed under supervision (SAR) at the study center, and the remaining rinses were performed unsupervised at home. Patients were instructed to rinse in both the morning and evening. In addition, the patients received fluoride dentifrice, toothbrush, and dental floss on a monthly basis.

Patients were encouraged to comply with the study protocol. The compliance, desirable effects, and undesirable side effects were assessed by a monthly interview.

Statistical Analyses

The primary outcomes were PI and GI improvements. For analytic purposes, PI and GI were reclassified as 0 (absence of plaque and bleeding) and 1 (presence of plaque and bleeding). All periodontal measurements were averaged for each participant.

To evaluate the effects of diabetes, treatment, and interactions between these two factors on monitored parameters over time, a two-factor repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was performed. A time $\times$ group interaction term was the primary test. Microbiologic parameters were log transformed, and a Q-Q plot (in which Q is quantile) of residual values showed acceptable levels of normality and a small range of variances. Based on a statistically significant effect of the independent variables, a multiple comparisons Tukey test was used. Dependent variables were periodontal measurements, whereas independent variables were time (with repeated measures) and its interaction with diabetes, treatment, and both. All tests considered a significance level of 5% ($P < 0.05$).

RESULTS

Baseline clinical data from all recruited volunteers are shown in Table 1. The final group with diabetes was composed of well-controlled patients (with glycated hemoglobin values from 6.5% to 7%) with gingivitis who were assigned randomly to either the EO ($n = 25$) or placebo ($n = 26$) group. The final control group was composed of systemically healthy patients with

gingivitis who were similarly randomized into the EO ($n = 28$) or placebo ($n = 29$) group. Tobacco use was not an exclusion criterion, but no more than 10% of patients per group were smokers. For this reason, patients who smoked were still included in the statistical analysis.

Independently of diabetes and the type of rinse, mean PD, PI, and GI were higher at baseline than at 3 months. PD was only affected by time. GI was more severe among patients with diabetes at the two evaluation times. Diabetes also negatively influenced GI reductions; at 3 months, the lowest values were found among systemically healthy individuals. Regarding treatment, EO provided the greatest PI and GI reductions. When all interactions were tested, results revealed that clinical improvements occurred in both groups of patients (those with and without diabetes) (Table 2).

Table 3 shows the microbial data. Independently of systemic status and type of rinse, time affected total bacterial load and levels of *A. actinomycetemcomitans* that were higher at baseline when compared with 3 months. Levels of *P. gingivalis* and *T. forsythia* were not significantly different between the times. In fact, *P. gingivalis* seemed to increase in all groups; however, this finding was not statistically significant. Diabetes did not affect bacterial reductions, but treatment did. At 3 months, patients who rinsed with EO demonstrated lower levels of total bacterial, *T. forsythia*, and *A. actinomycetemcomitans*. These last two bacterial species were also reduced in the group that rinsed with a placebo after ultrasonic debridement.

IL-1 β and GCF volume showed higher levels at baseline compared with 3 months. However, IL-1 β reductions were not influenced by systemic condition and type of rinse. On the contrary, diabetes affected GCF reductions, with the lowest levels after treatment being observed among systemically healthy controls. The placebo group exhibited a reduction in GCF volume. Although EO provided GCF improvements

Table 1.

Descriptive Periodontal Clinical Parameters at Baseline for the Whole Population (N = 120)

Rinse	Males/Females (n)	PD (mm)	PI (0/1)	GI (0/1)
Diabetes				
EO	12/19	1.74 $\pm$ 0.15	0.59 $\pm$ 0.30	0.72 $\pm$ 0.35
Placebo	11/18	1.73 $\pm$ 0.30	0.62 $\pm$ 0.27	0.68 $\pm$ 0.31
Non-diabetes				
EO	14/15	1.79 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.15	0.52 $\pm$ 0.39
Placebo	12/19	1.83 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.34	0.61 $\pm$ 0.32

Table 2.



Effects of Time (baseline/3 months), Diabetes (yes/no), Treatment (EO/placebo), and Their Interactions on Clinical Parameters



Variable	Mean PD (mm)		Mean PI (0/1)		Mean GI (0/1)	
	Baseline	3 Months	Baseline	3 Months	Baseline	3 Months
Diabetes	1.75 ± 0.71	1.64 ± 0.63	0.63 ± 0.36	0.39 ± 0.29	0.73 ± 0.18 ^{ab}	0.50 ± 0.22 ^{bb}
Non-diabetes	1.84 ± 0.61	1.59 ± 0.56	0.56 ± 0.38	0.38 ± 0.19	0.56 ± 0.31 ^{aA}	0.43 ± 0.32 ^{bA}
<i>p</i> *	0.14		0.42		<0.001	
EO	1.77 ± 0.70	1.55 ± 0.58	0.60 ± 0.37 ^{aA}	0.29 ± 0.19 ^{bb}	0.65 ± 0.21 ^{aA}	0.36 ± 0.20 ^{bA}
Placebo	1.82 ± 0.62	1.67 ± 0.60	0.60 ± 0.37 ^{aA}	0.48 ± 0.26 ^{aA}	0.64 ± 0.31 ^{aA}	0.57 ± 0.30 ^{ab}
<i>p</i> †	0.17		0.003		<0.001	
Diabetes						
EO	1.72 ± 0.75	1.58 ± 0.63	0.61 ± 0.34	0.29 ± 0.20	0.76 ± 0.18 ^{aA}	0.39 ± 0.21 ^{bb}
Placebo	1.78 ± 0.68	1.70 ± 0.63	0.66 ± 0.37	0.49 ± 0.33	0.70 ± 0.18 ^{aA}	0.62 ± 0.17 ^{aA}
Non-diabetes						
EO	1.83 ± 0.66	1.52 ± 0.54	0.58 ± 0.39	0.29 ± 0.18	0.54 ± 0.19 ^{aA}	0.33 ± 0.19 ^{bb}
Placebo	1.86 ± 0.57	1.65 ± 0.58	0.54 ± 0.36	0.47 ± 0.15	0.59 ± 0.40 ^{aA}	0.53 ± 0.39 ^{aA}
<i>p</i> ‡	0.92		0.69		0.007	
Time	1.80 ± 0.66	1.61 ± 0.59	0.60 ± 0.37	0.39 ± 0.24	0.64 ± 0.26	0.47 ± 0.27
<i>p</i> §	0.02		<0.001		<0.001	

Different lowercase letters (a, b) within rows indicate differences between times (baseline versus 3 months) by multiple comparisons Tukey tests. Different capital letters (A, B) within columns indicate differences between diabetes (yes/no) and treatment (EO/placebo) groups by multiple comparisons Tukey tests. *P* values set in boldface are significant (*P* < 0.05).

* Time × diabetes interactions by repeated-measures ANOVA.

† Time × treatment interactions by repeated-measures ANOVA.

‡ Time × diabetes × treatment interactions by repeated-measures ANOVA.

§ Effect of time by repeated-measures ANOVA.

for patients with and without diabetes, the greatest GCF improvements occurred in the absence of diabetes and after the use of EO (Table 4).

DISCUSSION

Both diabetes and gingivitis are highly prevalent diseases.^{2,3} Gingivitis is a risk factor for periodontitis,³⁴ which widely affects patients with diabetes.⁴ Therefore, the appropriate management of gingivitis is critical for the prevention of periodontitis in both systemically healthy patients and those with diabetes. A method for identifying patients with gingivitis who will experience periodontal breakdown has not yet been discovered. Unfortunately, the available literature regarding gingivitis and diabetes is scarce. Based on knowledge of diabetes and periodontal status, patients with diabetes have higher amounts of bacteria and more significant biofilm accumulation. They also have more severe inflammation, including higher levels of cytokines.^{9-11,15-17} Their poorer periodontal status

seems to be affected by their glycemic control.¹⁴ There are many gaps in the present knowledge that have yet to be investigated. For example, it is unknown whether gingivitis progresses to periodontitis faster in the presence of diabetes, which could partially explain, for example, the greater difficulty observed in the present study regarding GI reduction among patients with diabetes. Furthermore, the effects of gingivitis treatment have never been studied specifically in a diabetes population. Thus, the expectation that patients with diabetes will have a worse response to treatment is currently only speculation.

This 3-month RCT was designed to evaluate the response to gingivitis treatment in patients with diabetes by assessing several clinical, microbial, and immune indicators, using gingivitis patients without diabetes as the control group. In systemically healthy patients with mild to moderate gingivitis, a fixed combination of four EOs demonstrated clear antiplaque and antigingivitis effects.^{22-24,35,36} Because

Table 3.
Effects of Time (baseline/3 months), Diabetes (yes/no), Treatment (EO/placebo), and Their Interactions on Microbiologic Parameters

Variable	Mean Number of Bacteria					
	Total Bacterial Load		<i>P. gingivalis</i>		<i>T. forsythia</i>	
	Baseline	3 Months	Baseline	3 Months	Baseline	3 Months
Diabetes	762.18 ± 1,070,162.65	226.07 ± 415,485.74	212.35 ± 500.12	271.34 ± 613.16	199.27 ± 558,470.46	148.20 ± 415,361.60
Non-diabetes	799.87 ± 1,124,528.86	198.67 ± 371,975.91	150.23 ± 324.04	191.47 ± 407.77	230.75 ± 653,860.88	127.11 ± 418,987.63
<i>P</i> *	0.22		0.69		0.87	0.46
EO	743.85 ± 1,043,440.65 ^{aA}	80.50 ± 207,119.80 ^{bB}	298.98 ± 561.79	369.22 ± 691.56	199.26 ± 558,429.72 ^{aA}	91.63 ± 319,453.33 ^{bA}
Placebo	818.20 ± 1,148,459.17 ^{aA}	344.24 ± 482,833.52 ^{aA}	264.37 ± 116.46	293.76 ± 168.77	130.76 ± 653,894.96 ^{aA}	153.68 ± 493,571.77 ^{bB}
<i>P</i> †	<0.001		0.66		<0.001	<0.001
Diabetes						
EO	732.86 ± 1,036,380.14	105.00 ± 282,335.45	362.54 ± 670.19	443.53 ± 818.72	200.28 ± 565,926.75	150.21 ± 424,445.06
Placebo	791.49 ± 1,119,290.55	347.15 ± 490,920.83	262.19 ± 113.72	199.49 ± 181.57	198.27 ± 560,267.48	146.19 ± 413,085.21
Non-diabetes						
EO	754.85 ± 1,067,471.55	56.01 ± 79,206.38	235.64 ± 429.17	295.85 ± 539.21	198.24 ± 560,184.86	53.05 ± 149,905.46
Placebo	844.90 ± 1,194,820.90	341.34 ± 482,707.64	266.45 ± 120.99	286.78 ± 157.66	263.25 ± 743,860.92	201.17 ± 568,458.51
<i>P</i> ‡	0.20		0.75		0.63	0.33
Time	781.03 ± 1,093,374.97	212.37 ± 329,965.98	181.32 ± 420.81	231.35 ± 520.16	215.01 ± 605,768.50	137.65 ± 415,614.08
<i>P</i> §	<0.001		0.43		0.29	<0.001

Different lowercase letters (a, b) within rows indicate differences between times (baseline versus 3 months) by multiple comparisons Tukey tests. Different capital letters (A, B) within columns indicate differences between diabetes (yes/no) and treatment (EO/placebo) groups by multiple comparisons Tukey tests. *P* values set in boldface are significant (*P* < 0.05).

* Time × diabetes interactions by repeated-measures ANOVA.

† Time × treatment interactions by repeated-measures ANOVA.

‡ Time × diabetes × treatment interactions by repeated-measures ANOVA.

§ Effect of time by repeated-measures ANOVA.

Table 4.
Effects of Time (baseline/3 months), Diabetes (yes/no), Treatment (EO/placebo), and Their Interactions on Immunologic Parameters

Variable	Mean IL-1 β		Mean GCF	
	Baseline	3 Months	Baseline	3 Months
Diabetes	20.40 $\pm$ 5.16	16.66 $\pm$ 5.02	111.90 $\pm$ 21.80 ^{aA}	90.83 $\pm$ 21.73 ^{bA}
Non-diabetes	21.89 $\pm$ 6.66	17.67 $\pm$ 5.50	104.82 $\pm$ 20.45 ^{bA}	70.97 $\pm$ 13.75 ^{aB}
<i>p</i> *	0.36		<0.001	
EO	21.16 $\pm$ 5.32	16.25 $\pm$ 4.87	108.41 $\pm$ 21.02 ^{aA}	74.46 $\pm$ 14.99 ^{bB}
Placebo	21.13 $\pm$ 6.62	18.09 $\pm$ 5.52	108.31 $\pm$ 21.86 ^{aA}	87.33 $\pm$ 23.53 ^{bA}
<i>p</i> †	0.34		0.01	
Diabetes				
EO	21.47 $\pm$ 4.21	16.20 $\pm$ 4.92	109.50 $\pm$ 21.47 ^{aA}	78.44 $\pm$ 15.38 ^{bB}
Placebo	19.33 $\pm$ 5.88	17.13 $\pm$ 5.21	114.31 $\pm$ 22.42 ^{aA}	103.21 $\pm$ 20.24 ^{aA}
Non-diabetes				
EO	20.86 $\pm$ 6.34	16.30 $\pm$ 4.95	107.33 $\pm$ 21.05 ^{aA}	70.47 $\pm$ 13.82 ^{bB}
Placebo	22.93 $\pm$ 6.97	19.05 $\pm$ 5.79	102.31 $\pm$ 20.06 ^{aA}	71.46 $\pm$ 14.01 ^{bB}
<i>p</i> ‡	0.19		0.01	
Time	21.15 $\pm$ 5.97	17.17 $\pm$ 5.26	108.36 $\pm$ 21.31	80.90 $\pm$ 20.64
<i>p</i> §	<0.001		<0.001	

Different lowercase letters (a, b) within rows indicate differences between times (baseline versus 3 months) by multiple comparisons Tukey tests. Different capital letters (A, B) within columns indicate differences between diabetes (yes/no) and treatment (EO/placebo) groups by multiple comparisons Tukey test. *P* values set in boldface are significant (*P* < 0.05).

* Time $\times$ diabetes interactions by repeated-measures ANOVA.

† Time $\times$ treatment interactions by repeated-measures ANOVA.

‡ Time $\times$ diabetes $\times$ treatment interactions by repeated-measures ANOVA.

§ Effect of time by repeated-measures ANOVA.

ultrasonic debridement is believed to be an appropriate alternative to manual instrumentation,^{37,38} the therapeutic approach selected for the present study involved the daily use of EO after ultrasonic debridement in a group of patients with diabetes. To the best of the authors' knowledge, having a placebo as the comparator, the design of the present study also answered for the first time whether the adjunctive use of EO provides additional benefits based on different gingivitis indicators, even in the presence of diabetes.

Investigating an antimicrobial that could be used on a daily basis seemed to be very helpful for patients with diabetes, considering their susceptibility to gingival inflammation. Although Novaes Júnior³⁷ reported that a single session of ultrasonic prophylaxis combined with oral hygiene instructions was sufficient to treat gingivitis in adolescents (as assessed 15 and 30 days after treatment), this result is not observed in the present study. At 3 months, no clinical improvements were detected in the patients with or without diabetes who only received ultrasonic debridement (placebo groups),

although it cannot be confirmed that improvements did not occur in the first month. In future studies, the present authors plan to evaluate the effect of multiple prophylaxis regimens or oral hygiene reinstructions, which seem to positively affect gingivitis.³⁹ The effects of manual instrumentation should also be tested. In a previous study, the present authors manually treated gingivitis diagnosed in systemically healthy patients and observed clinical and bacterial improvements.²⁶ Although a single session of ultrasonic debridement alone provided no clinical benefits, it was accompanied by some bacterial and GCF reductions (Tables 3 and 4, respectively).

Systemically healthy participants benefited from the daily use of EO. This group showed improvements in their PI and GI (Table 2), total and specific bacterial levels (Table 3), and IL-1 β and GCF (Table 4). The present findings are supported by previous studies. Cortelli et al.⁴⁰ and Goutham et al.⁴¹ also reported reductions in the PI and GI in systemically healthy gingivitis patients who rinsed with EO. In addition, Cortelli

et al.,⁴² Haffajee et al.,⁴³ and Fine et al.⁴⁴ observed a decrease in the bacterial load associated with the use of EO, whereas Sharma et al.⁴⁵ reported a decrease in the proinflammatory cytokines IL-2 and interferon- γ in patients with gingivitis.

Fortunately, patients with diabetes who rinsed with EO at 3 months also showed good clinical responses, as demonstrated by improvements in their PI, GI (Table 2), total load, and bacterial species (Table 3). In addition, the specific reduction in GI and GCF among EO users with diabetes should be mentioned. This is a particularly relevant finding, because patients with diabetes tend to exhibit more severe inflammation. In the present study, they showed higher GI levels compared with patients without diabetes. The ability of EO to penetrate the biofilm and promote anti-inflammatory effects^{46,47} can partially explain the ability of EO to promote beneficial effects in the diabetes group. Even when ultrasonic debridement alone produced improvements in the parameters assessed in both groups, the largest improvements tended to occur in the EO groups. This result indicates that rinsing with EO provides additional antimicrobial benefits beyond those provided by the mechanical procedures alone. However, inflammation was more difficult to control among patients with diabetes, who therefore finished the study with higher GI levels than patients without diabetes.

Regarding the PI, patients with and without diabetes who rinsed with EO completed the study with similar mean values (Table 2). In the present study, diabetes does not influence the magnitude of the measured bacterial changes. Therefore, under controlled conditions, diabetes would not represent a limitation in reducing the bacterial load in gingivitis cases. In addition, the tendency to increase demonstrated by *P. gingivalis* should be mentioned because it was suggested that the persistence of this pathogen could interfere with glycemic control in patients with diabetes.⁴⁸ Such interference is not observed in the present 3-month study based on glycemic levels. However, in future studies, other systemic parameters could be monitored between periodontal examinations to clarify some unanswered questions.

Changes in GCF volume also demonstrated a negative effect of diabetes (Table 4). The lowest GCF volumes were observed among patients without diabetes who rinsed with EO. However, it cannot be ensured that, over a longer period, the same level of benefit would not be reached, considering that EO rinse shows a cumulative beneficial effect over 6 months.^{35,40,49} Therefore, in the future, an additional 6-month study should be conducted with patients with gingivitis and diabetes.

Ultrasonic debridement alone did not provide 3 months of sustained clinical benefits. In general, the

benefits were caused by the daily use of the chemical agent. Diabetes influenced the clinical inflammatory status of gingival tissues and impaired improvements in searched inflammatory parameters. Both hypotheses—that diabetes could negatively affect the response to treatment and that EO would be superior to a placebo in the presence of diabetes—were confirmed.

CONCLUSIONS

After ultrasonic debridement, routine rinsing with EO provided a therapeutic benefit to patients with and without diabetes. Responses to gingivitis treatment are not completely similar between patients with well-controlled diabetes and systemically healthy controls.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Prof. Poliana Mendes Duarte from University of Guarulhos for her assistance with immunologic laboratorial processing and Juliana Guimarães dos Santos and other Centro de Pesquisa em Odontologia—University of Taubaté laboratory assistants. This research was supported by São Paulo Research Foundation Grant 2010/20424-1 and Scholarship 2011/02371-0, a National Council of Scientific and Technological Development Productivity Research Fellowship, and PROCAD Grant 552264/2011-3. The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Trombelli L, Farina R. A review of factors influencing the incidence and severity of plaque-induced gingivitis. *Minerva Stomatol* 2013;62:207-234.
2. Jin LJ, Armitage GC, Klinge B, Lang NP, Tonetti M, Williams RC. Global oral health inequalities: Task group — Periodontal disease. *Adv Dent Res* 2011;23:221-226.
3. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 5th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2012. Available at: http://www.idf.org/sites/default/files/5E_IDFAtlasPoster_2012_EN.pdf. Accessed February 14, 2013.
4. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000 2013;62:59-94.
5. Genco RJ, Genco FD. Common risk factors in the management of periodontal and associated systemic diseases: The dental setting and interprofessional collaboration. *J Evid Based Dent Pract* 2014;14(Suppl.):4-16.
6. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16:329-334.
7. Chapple IL, Wilson NH. Manifesto for a paradigm shift: Periodontal health for a better life. *Br Dent J* 2014;216:159-162.
8. Kumar VV, Kumar KP, Gafoor A, Santhosh VC. Evaluation of subgingival microflora in diabetic and nondiabetic patients. *J Contemp Dent Pract* 2012;13:157-162.
9. Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2

- diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 2013;48:30-36.
10. Castrillon CA, Hincapié JP, Yepes FL, et al. Occurrence of red complex microorganisms and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with diabetes [published online ahead of print July 16, 2013]. *J Invest Clin Dent*. doi:10.1111/jicd.12051.
 11. Zhou M, Rong R, Munro D, et al. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One* 2013;8:e61516.
 12. Chapple IL, Genco R; Working Group 2 of the Joint EFP/AAP Workshop. Diabetes and periodontal diseases: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol* 2013;84(Suppl. 4):S106-S112.
 13. Costa FO, Miranda Cota LO, Pereira Lages EJ, et al. Progression of periodontitis and tooth loss associated with glycemic control in individuals undergoing periodontal maintenance therapy: A 5-year follow-up study. *J Periodontol* 2013;84:595-605.
 14. Stanko P, Izakovicova Holla L. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2014;158:35-38.
 15. Ervasti T, Knuuttila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. *J Periodontol* 1985;56:154-157.
 16. Aemaimanan P, Amimanan P, Taweechaisupapong S. Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis. *Anaerobe* 2013;22:64-68.
 17. Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2008;79:637-646.
 18. Ertugrul AS, Dikilitas A, Sahin H, Alpaslan N, Bozoglan A, Tekin Y. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensins 1 and 3 in subjects with periodontitis and/or type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional study. *J Periodontol Res* 2013;48:475-482.
 19. Duarte PM, Bezerra JP, Miranda TS, Feres M, Chambrone L, Shaddox LM. Local levels of inflammatory mediators in uncontrolled type 2 diabetic subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2014;41:11-18.
 20. Andriankaja OM, Barros SP, Moss K, et al. Levels of serum interleukin (IL)-6 and gingival crevicular fluid of IL-1beta and prostaglandin E(2) among non-smoking subjects with gingivitis and type 2 diabetes. *J Periodontol* 2009;80:307-316.
 21. Salvi GE, Franco LM, Braun TM, et al. Pro-inflammatory biomarkers during experimental gingivitis in patients with type 1 diabetes mellitus: A proof-of-concept study. *J Clin Periodontol* 2010;37:9-16.
 22. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc* 2006;137:1649-1657.
 23. Stoeken JE, Paraskevas S, van der Weijden GA. The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: A systematic review. *J Periodontol* 2007;78:1218-1228.
 24. Van Leeuwen MP, Slot DE, Van der Weijden GA. Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: A systematic review. *J Periodontol* 2011;82:174-194.
 25. Schulz KF, Altman DG, Moher D; for the CONSORT Group. CONSORT 2010 statement: Updated guideline for reporting parallel group randomised trials. [http://www.consort-statement.org/Media/Default/Downloads/CONSORT%202010%20Statement/CONSORT%202010%20Statement%20\(BMJ\).pdf](http://www.consort-statement.org/Media/Default/Downloads/CONSORT%202010%20Statement/CONSORT%202010%20Statement%20(BMJ).pdf). Accessed September 12, 2010.
 26. Pereira AL, Cortelli SC, Aquino DR, et al. Reduction of salivary arginine catabolic activity through periodontal therapy. *Quintessence Int* 2012;43:777-787.
 27. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
 28. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: A randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002;73:911-924.
 29. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:121-135.
 30. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963;21:533-551.
 31. Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, et al. Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *J Clin Microbiol* 2008;46:1322-1329.
 32. NCBI/Primer-BLAST. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. Accessed January 12, 2013.
 33. Casarin RC, Ribeiro Edel P, Mariano FS, Nociti FH Jr., Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 2010;45:635-642.
 34. Lang NP, Schätzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2009;36 (Suppl. 10):3-8.
 35. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent* 2010;38(Suppl. 1):S6-S10.
 36. Neely AL. Essential oil mouthwash (EOMW) may be equivalent to chlorhexidine (CHX) for long-term control of gingival inflammation but CHX appears to perform better than EOMW in plaque control. *J Evid Based Dent Pract* 2012;12(Suppl. 3):69-72.
 37. Novaes Júnior AB, de Souza SL, Taba M Jr., Grisi MF, Suzigan LC, Tunes RS. Control of gingival inflammation in a teenager population using ultrasonic prophylaxis. *Braz Dent J* 2004;15:41-45.
 38. Mishra MK, Prakash S. A comparative scanning electron microscopy study between hand instrument, ultrasonic scaling and erbium doped:yttrium aluminum garnet laser on root surface: A morphological and thermal analysis. *Contemp Clin Dent* 2013;4:198-205.
 39. Worthington HV, Clarkson JE, Bryan G, Beime PV. Routine scale and polish for periodontal health in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;11:CD004625.
 40. Cortelli SC, Cortelli JR, Wu MM, Simmons K, Charles CA. Comparative antiplaque and antigingivitis efficacy of a multipurpose essential oil-containing mouthrinse and a cetylpyridinium chloride-containing mouthrinse: A 6-month randomized clinical trial. *Quintessence Int* 2012;43:e82-e94.
 41. Goutham BS, Manchanda K, Sarkar AD, Prakash R, Jha K, Mohammed S. Efficacy of two commercially available oral rinses — Chlorohexidine and Listerine on plaque and gingivitis — A comparative study. *J Int Oral Health* 2013;5:56-61.
 42. Cortelli SC, Cortelli JR, Holzhausen M, et al. Essential oils in one-stage full-mouth disinfection: Double-blind,

- randomized clinical trial of long-term clinical, microbial and salivary effects. *J Clin Periodontol* 2009;36:333-342.
43. Haffajee AD, Roberts C, Murray L, et al. Effect of herbal, essential oil, and chlorhexidine mouthrinses on the composition of the subgingival microbiota and clinical periodontal parameters. *J Clin Dent* 2009;20:211-217.
44. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, et al. Effect of an essential oil-containing antimicrobial mouthrinse on specific plaque bacteria in vivo. *J Clin Periodontol* 2007;34:652-657.
45. Sharma S, Saimbi CS, Koirala B, Shukla R. Effect of various mouthwashes on the levels of interleukin-2 and interferon-gamma in chronic gingivitis. *J Clin Pediatr Dent* 2008;32:111-114.
46. Ouhayoun JP. Penetrating the plaque biofilm: Impact of essential oil mouthwash. *J Clin Periodontol* 2003;30 (Suppl. 5):10-12.
47. Pan P, Barnett ML, Coelho J, Brogdon C, Finnegan MB. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol* 2000;27:256-261.
48. Makiura N, Ojima M, Kou Y, et al. Relationship of *Porphyromonas gingivalis* with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:348-351.
49. Charles CA, Lisante TA, Revankar R, et al. Early benefits with daily rinsing on gingival health improvements with an essential oil mouthrinse — Post-hoc analysis of 5 clinical trials. *J Dent Hyg* 2014;88 (Suppl. 1):40-50.
- Correspondence: Dr. Sheila Cavalcá Cortelli, Rua Expedicionário Ernesto Pereira, 110 Taubaté, São Paulo, Brazil, 12020-330. E-mail: cavalcacortelli@uol.com.br.
- Submitted April 25, 2014; accepted for publication December 1, 2014.

ANEXO F – Artigo em fase final de elaboração

Impact of Gingivitis Treatment on Oral Health-Related Quality of Life for Patients with Diabetes: a Randomized Controlled Clinical Trial

Correspondence: Sheila Cavalca Cortelli Rua Expedicionário Ernesto Pereira, 110 – Centro, Taubaté – SP, Brazil Zip code 12020-330 +551230250058 (phone) +551236324968 (fax) cavalcacortelli@uol.com.br

Total Word count: XXX number of tables: 04 Number of figures: 01

Running title: Gingivitis, Diabetes and Quality of Life

One-sentence summary: Even in the presence of a chronic systemic disease, an effective gingivitis treatment protocol could provide benefits to patients' overall health, which should be considered when making clinical therapeutic decisions.

Abstract

Background: Patients with diabetes have a poorer oral health-related quality of life (OHRQoL). It is not clear if this scenario could be changed with effective periodontal treatment. This study verified in patients with diabetes and systemically health individuals the impact of a gingivitis treatment protocol on OHRQoL and its relation to objective parameters.

Methods: After ultrasonic debridement, patients were randomly assigned to an essential-oils (EO) or placebo rinse for 90 days (40 ml/day). At baseline and 3-months, OHRQoL was assessed with the UK questionnaire (OHQoL-UK) in addition to the following objective parameters: full-mouth pocket depth, plaque index (PI), gingival index (GI), volatile sulfur compounds (VSC), subgingival levels of total bacteria including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*, gingival crevicular fluid volume, and concentrations of interleukin 1-beta. The primary outcome was a change in OHRQoL scores. A factor analysis was performed and the impact of the extracted factor (quality of life – QL factor) as well its interactions with diabetes, treatment, and time within subjective parameters were tested by multiple linear regression models ($p < 0.05$).

Results: Treatment with EO provided OHRQoL improvements in both systemic conditions. Diabetics whose OHRQoL improved showed lower PI and total bacterial load at 3-months. Similar findings were observed regarding PI, GI, total bacterial load, and VSC for both systemic conditions but only after EO rinsing.

Conclusions: Ultrasonic debridement associated with daily use an EO rinse provided improvements in OHRQoL. There was a relationship between self-reported quality of life and objective measures.

Key-words: Gingivitis; Diabetes Mellitus; Quality of Life; Therapeutics

Introduction

Oral and periodontal statuses impact how individuals perceive their quality of life. Although clinical conditions have improved, a significant portion of the adult population (even in developed countries) frequently suffers negative effects in their daily lives as a result of oral health issues (White et al., 2012). Most periodontal studies on adults have focused on periodontitis, while the relationship between gingivitis and quality of life has received less attention. Bleeding and bad breath are major complaints of gingivitis patients, although they are not always self-perceived (Kallio et al., 1994; Eli et al., 2001). Halitosis is more likely to be detected in patients with gingivitis than in periodontally healthy patients (Apatzidou et al., 2013). This is due to higher VSC (Volatile Sulfur Compounds) levels in inflamed gingiva than in healthy gingiva (Yaegaki & Coil, 1999). In addition, an increase in the levels of gingival bleeding can be observed when patients with gingivitis are compared to those with good periodontal health (Pereira et al., 2012). Although gingivitis is not always self-perceived it can affect quality of life, at least in children (Tomazoni et al., (2014). Unfortunately, diabetics have risk factors for oral disorders. Reduced salivary flow and altered glycemic control are related to halitosis (Negrato & Tarzia, 2010), gingival bleeding, and higher dental biofilm levels (Ervasti et al., 1985; Gursoy et al., 2014). Nikbin et al. (2014) conducted a study to evaluate how type II diabetes affects oral health and oral health-related quality of life. The authors did not observe good oral health among diabetic patients. This poor oral health status was related to a poorer quality of life.

Dental procedures can positively affect one's quality of life. In comparison to people who do not receive dental care on a regular basis, those who do are found to have a better dental status and better quality of life (Montero et al., 2014). Conventional non-surgical periodontal therapy for periodontitis patients can improve quality of life (Sundaram et al., 2013; Jönsson & Öhrn, 2014). However, no clear consensus has been achieved regarding how gingivitis

treatment affects the quality of life either in patients with or without diabetes. Moreover, it is not completely understood how clinical and laboratorial monitored parameters are related to self-reported quality of life. Recently, our group verified that a protocol which combined ultrasonic debridement with the regular use of an essential oils-containing mouth rinse was effective in treating gingivitis in patients with or without diabetes. Although promising results were observed in relation to traditional objective parameters, other relevant patient-centered variables were not evaluated (Raslan et al., 2015).

This study aims to verify the impact of this specific gingivitis treatment protocol on the OHRQoL for patients with diabetes and systemically health individuals. In addition, the relationship between quality of life and clinical, micro, immune, and halitometric parameters was evaluated. It was hypothesized that gingivitis treatment in diabetic patients would have a positive impact on the self-reported quality of life related to oral health status.

Methods

Materials and Methods

The present 3-month, double-blind, single-centered, randomized, parallel group, placebo-controlled clinical trial was registered at ClinicalTrials.gov (NCT 02123563) and was approved by the Institutional Committee on Research of the University of Taubate (protocol #522/10), São Paulo, Brazil, in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Prior to selection, oral and written explanations regarding the research protocol were given to the eligible participants. All patients provided written informed consent before enrolling in the present study, which included baseline and 3-month post-treatment appointments.

Study Population

Participants in this study were male and female gingivitis patients who were in good general health (control group) or had controlled diabetes (diabetes group), who were between

20 and 45 years of age (32 ± 6 years) and who sought dental care in the Dental Clinic of the University of Taubate, SP, Brazil between December, 2012 and December, 2013. Data and personal information regarding the medical and dental histories of the patients were obtained by interview.

Inclusion criteria: plaque-related gingivitis (with no radiographic evidence of periodontal bone resorption and a bleeding site rate of more than 30%) (Armitage, 1999; Lopez, 2002); at least 20 natural teeth; good general health or controlled type II diabetes (with a blood glycated hemoglobin level between 6.5 and 7%) that was diagnosed at least 3 years but no more than 5 years prior to the study; and normal salivary flow. Although the participants' past medical records were checked, a physician monitored the diagnosis and the level of diabetes control for the duration of the study.

Exclusion criteria: gingival overgrowth; tongue coating $\geq 10\%$ (Dupim et al., 2013); orthodontic devices, extended prosthetic fixed devices, removable partial dentures or overhanging restorations; systemic diseases or other conditions that could influence the periodontal status (other than diabetes within the diabetes group); obesity; alcohol abuse; pregnancy or breast-feeding; history of sensitivity or suspected allergies following the use of oral hygiene products; the need for antibiotic prophylaxis; antibiotics and/or anti-inflammatory drug use in the six months prior to the beginning of the study; regular use of chemotherapeutic antiplaque/antigingivitis products; periodontal treatment performed within six months prior to study initiation; and unwillingness to return for follow-up.

Oral Health and Quality of Life - UK (OHQoL - UK)

The OHRQoL was evaluated using the OHQoL – UK questionnaire, which consists of 16 key issues that evaluate the effect that the teeth, mouth, gums, and dentures can have in different situations related to the following main aspects of quality of life: functional limitations,

pain or discomfort, and psychological, social, and behavioral impacts. Response options ranged from “very bad” (score 1) to “very good” (score 5) and results varied between 16 (worst quality of life) to 80 (best quality of life) (McGrath & Bedi, 2002, 2003). The Portuguese version was validated by Dini, McGrath, & Bedi (2003).

Two trained examiners administered the questionnaire. In order to increase the reliability of the results, the questionnaire was administered again to 20 subjects of the pilot study, 7 days after the initial results, and the test-retest reliability was assessed using Spearman's correlation coefficient (0.89, $p < 0.001$). The quality of life data were obtained at baseline and at 3 months and the total number of completed questionnaires revealed a Cronbach's alpha of 0.97, indicating satisfactory consistency and internal validity of the OHQoL instrument.

Clinical Examination

A single calibrated examiner performed complete periodontal clinical and radiographic examinations to determine the diagnosis of plaque-related gingivitis, according to Armitage's 1999 criteria. At baseline and 3 months, a second examiner monitored the clinical outcomes of periodontal pocket depth (PD), plaque index (PI) (Silness & L  e, 1964), and gingival index GI (L  e & Silness, 1963). There was a high level of agreement between examiners ($\kappa = 0.84$ for PD). Microbial and immune parameters were also evaluated at baseline and 3 months.

Volatile Sulfur Compounds (VSC)

VSC concentrations were measured using a portable sulfide monitor (Halimeter  , Interscan, USA) as previously done by our group (Dupim et al., 2013). The participants were instructed to keep their mouths closed and only breathe through their noses for 3 minutes before measurement. Next, the pipe connected to the disposable Halimeter was inserted about 5cm into the mouth of the patient and placed on the back of their tongue. The subjects remained with their lips open, without breathing, while the unit was reading. The greatest value from the

display, in parts per billion (ppb), was noted on the clinical data sheet. This measurement was taken three consecutive times in order to generate an average reading.

Biofilm Examination

Biofilm was sampled (Cortelli et al., 2008) and bacteria from the sterile paper point were dispersed in Tris-EDTA solution (TE solution, 0.01M, pH 8) using a vortex mixer at maximal setting for 1 min and then maintained at -80°C until laboratorial processing. A genomic DNA purification kit (Life Technology, Carlsbad, CA, USA) was used to extract the DNA from the samples, according to the manufacturer's instructions.

To quantify the total bacteria load and the periodontopathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythia*, the Real-Time quantitative PCR (qPCR) technique was carried out in a 25 μL reaction volume containing 12.5 μL of 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technology), 300 nM of forward and reverse primers, 250 nM of TaqMan probe, and 2.5 μL of DNA sample in a thermal cycler. The cycling conditions were: 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and at 60°C for 1 minute. In the negative control, the DNA sample was replaced by sterile milli-Q water. The primer/probe sequences were *A. actinomycetemcomitans* (Forward: CAAGTGTGATTAGGTAGTTGGTGGG; Reverse: TTCATTACGCGGCATGGC; Probe: ATCGCTAGCTGGTCTGAGAGGATGGCC; Reference strain: ATCC: 33384), *P. gingivalis* (Forward: ACCTTACCCGGGATTGAAATG; Reverse: CAACCATGCAGCACCTACATAGAA; Probe: ATGACTGATGGTGAAAACCGTCTTCCCTTC; Reference strain: W83), *T. forsythia* (Forward: AGCGATGGTAGCAATACCTGTC; Reverse: TTCGCCGGGTTATCCCTC; Probe: CACGGGTGAGTAACG; Reference strain: ATCC: 43037), *T. denticola* (forward: CCG AAT GTG CTC ATT TAC ATA AAG GT; reverse: GAT ACC CAT CGT TGC CTT GGT; probe: 6FAMATG GGC CCG CGT CCC ATT AGC TAMRA); and total bacterial load – universal primer

(Forward: TGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA; Reverse: TGCGGGACTTAACCCAACA; Probe: CACGAGCTGACGACA(AG)CCATGCA; Reference strain: *E. coli* ATCC: 25922). Their specificity was checked using NCBI/Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Standard curves – with known amounts of each bacterial species (10^1 - 10^8 cells) – were used to convert cycle threshold values into the number of bacterial cells in the samples.

Immunoassay

Gingival crevicular fluid (GCF) was collected with filter paper strips, according to the protocol used by Casarin et al. (2010). After filter paper removal, the volume of the sample was immediately measured (Periotron®) and then placed in sterile tubes containing 400 µL of phosphate-buffered saline (PBS) with 0.05% Tween®-20.

The lab aliquots of each GCF sample were combined, yielding a single observation per patient at each time point. These samples were assayed by an enzyme-linked immunosorbent assay using a commercially available kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) for interleukin 1 beta (IL1-beta), according to the manufacturer's instructions. Samples were diluted with the diluent included in the kit. This dilution step was used to calculate the concentration of IL1-beta in the GCF. The concentration was calculated with a standard curve which was prepared using the standard proteins in the kit. The immune assays were run in duplicate and the mean values were used to calculate the concentrations of the cytokine.

Gingivitis Treatment Protocol

According to their systemic condition, two blocks of patients were randomly allocated to one of two groups (Figure 1) by a closed envelope system. Prior to the allocation process, opaque envelopes containing identifications for either the essential oils or placebo groups were closed, mixed, and then numbered. Each selected participant took a single envelope, which was opened by a blinded researcher who then assigned the patient to a specific treatment group

(Raslan et al., 2015). In short, the essential oils group underwent a one-stage ultrasonic debridement and a 90-day supply of mouth rinse (twice daily use; 20 ml/30 s) which contained a fixed combination of four EO (eucalyptol 0.092%, menthol 0.042%, methyl salicylate 0.060%, and thymol 0.064%), zinc chloride, and sodium fluoride (0.0221%) (Listerine Total Care, Johnson and Johnson, SP, Brazil) while after identical mechanical procedures, the placebo group followed the same rinsing regime with a placebo solution (sorbitol solution 15%; ethanol USP 21.6%; sodium saccharin 0.05%; benzoic acid 0.1%; mint flavoring; sodium benzoate; purple dye; and enough water for 1L) (Byofórmula, Taubaté, SP, Brazil). Researchers who had any contact with the study participants were blinded to their treatment assignment for the duration of the study and the completion of a statistical analysis.

Statistical Analysis

OHQoL answers were categorized on a Likert scale ranging from 1 (worst influence) to 5 (best influence). For the calculation of the OHQoL score, the points were summed from each of the 16 questions, producing a total OHQoL score ranging from 16 to 80. The primary outcome was change in quality of life scores. For analytical purposes, PI and GI were reclassified as 0 (absence of plaque and bleeding) and 1 (presence of plaque and bleeding). All periodontal measurements were averaged for each subject. Intra-group comparisons between times regarding PI, GI, VSC, total bacterial load, and OHRQoL were performed using Student's t-tests, paired t-tests, and Mann-Whitney tests.

A factor analysis was performed to reduce OHRQoL data to a smaller set of key variables. Factorability – i.e., correlations amongst the variables which allowed the identification of coherent factors – was examined via measures of sampling adequacy (MSA) that require a Kaiser-Myer-Olkin (KMO) > 0.5 and a significant Bartlett's test of sphericity. The observed Bartlett's test p value < 0.0001 confirmed correlations among OHRQoL instrument variables,

while the KMO value of 0.935 demonstrated that a factor statistical analysis would be appropriate for the present sample size population. A factor analysis extracted one factor that was named the quality of life (QL) factor.

To investigate the impact of the QL factor on clinical, microbial, immune, and VSC parameters, multiple linear regression models were used. The QL factor's isolated impact as well as the impact of its interaction with diabetes (diabetic or non-diabetic), treatment (essential oils or placebo), and time (baseline and 3 months) were investigated. In these multiple linear regression models, the QL factor and its interactions were the independent variables. Dependent variables (clinical, microbial, immune, and VSC parameters) were transformed and residual analysis (QQ-Plots) showed acceptable values validating regression models. An oral bacterial levels analysis took into consideration the total bacterial load, isolated pathogenic species, and the bacterial consortium of *P. gingivalis*, *T. forsythia*, and *T. denticola* (red complex bacterial species).

Results

Among all monitored parameters, Table 1 shows those that were related to quality of life when the multiple linear regression models were used. Gingival treatment provided a beneficial effect on quality of life as demonstrated by OHRQoL scores (Table 2), except in diabetic patients who rinsed with a placebo.

A factor analysis (Table 3) determined one factor – the QL factor – related to underlying information (a latent unobserved variable), interpreted as the effect of oral health on quality of life. Question I (related to patients' self-confidence) showed the greatest factorial weight, while question A (related to patients' food intake) showed the lowest factorial weight.

Results from multiple linear regression models are shown in Table 4. Regarding clinical parameters, the interaction between the QL factor and diabetes on the plaque index had a

statistically significant impact. Diabetic patients that experienced quality of life improvements after treatment showed lower plaque index values at 3 months. In addition, treatment and the QL factor positively impacted the plaque index and gingival index. All patients who showed quality of life improvements and used the essential oils rinse showed the lowest plaque and gingival indices reductions at 3 months. For pocket depth, there was no statistically significant impact related to quality of life.

When microbiological parameters were investigated, the total bacterial load was significantly impacted by two interactions: 1) diabetes and the QL factor and 2) treatment and the QL factor. Again, patients with diabetes who showed improvements in quality of life showed lower subgingival bacterial levels after treatment. In addition, patients who rinsed with essential oils and experienced improvements in their quality of life related to oral status demonstrated a lower total bacterial load.

Among immunological and halitometric parameters, the unique significant impact was observed when treatment, the QL factor, and VSC levels were considered. Both patients with diabetes and those who were systemically healthy who rinsed with the essential oils and experienced improvements in their quality of life showed better oral odor, revealed by lower VSC values.

Discussion

Oral health-related quality of life (OHRQoL) characterizes a person's perception of how his or her oral health influences the quality of his or her life. Different authors applying many questionnaires such as the Oral Health Impact Profile (OHIP), General Oral Health Assessment Index (GOHAI), Oral Impact on Daily Performances index (OHIP), and United Kingdom Oral Health-Related Quality-of-Life measure (OHRQoL-UK) have investigated this relationship (Ozcelik et al., 2007; Aslund et al., 2008; Tsakos et al., 2010; Castro et al., 2011). Most of

these studies employed a cross-sectional design. Unfortunately, patient-centered outcomes have not been properly investigated through randomized clinical trials, even though, since 1948, the World Health Organization has been advocating for an emphasis on the well-being of the patient, rather than just an absence of disease, in their definition of health (WHO, 1948). In addition, the quality of life factor could represent a relevant aspect when patients and clinicians are selecting treatment protocols, although it is not completely understood how close or how far traditional outcomes are from quality of life outcomes. A systematic review indicated that patient-centered outcomes are more relevant to patients' daily lives because, as opposed to objective measurements (which use surrogate markers such as PD), they capture patients' perspectives (Shanbhag et al., 2012).

Therefore, based on the clinical, microbial, and immune improvements observed in patients with and without diabetes after a mechanical-chemical gingivitis treatment, this study verified this protocol's ability to positively impact the OHRQoL. In addition, this study investigated how objective parameters (such as gingival index and total bacterial load) correlate to self-reported quality of life.

Overall, diabetes has a negative impact on quality of life that, systemically, can be associated with higher levels of glycated hemoglobin (Kuznetsov et al., 2014). It is important to keep in mind that in the present study only, well-controlled diabetic patients were selected. Unfortunately, patients with diabetes in the placebo group did not experience OHQoL improvements. On the other hand, OHQoL improvements found in groups who rinsed with essential oils after mechanical treatment indicated that in addition to traditional outcomes, the applied therapeutic protocol could benefit patients in a deeper manner.

In regards to oral parameters, bleeding gums and bad breath are associated with the worst quality of life scores (Castro et al., 2011). This relationship makes sense when considering systemically healthy individuals; however, gingival bleeding was found to negatively

impact quality of life scores even in patients with severe medical conditions such as Alzheimer's disease (Cicciu et al. 2013). In addition, haemodialysis patients showed poorer gingivitis index, plaque index, and OHQoL scores (Pakpour et al., 2014). In the present study, prior to gingivitis treatment, well-controlled diabetic patients showed mean OHQoL scores of 50.94 (essential oils group) and 46.3 (placebo group) in comparison to scores of 40.23 (essential oils group) and 39.73 (placebo group) in the non-diabetes group. Based on the lowest possible score (= 16), these observed baseline values indicated a negative impact of gingivitis status on quality of life for both patients with and without diabetes. However, Sadeghi et al. (2014) did not find that diabetes had an influence on quality of life. Fortunately, the final values of the present study revealed a positive effect of gingivitis treatment on quality of life in both groups. Moreover, in the presence of diabetes, these improvements were dependent on the type of rinse. Similarly, Aslund et al. (2008) reported that OHQoL scores improved from an initially negative effect on quality of life to a level of no effect in a group with a worse periodontal condition, according to periodontitis diagnosis. Tsakos et al. (2010) assessed the minimally important difference regarding quality of life related to oral status, again in periodontitis treatment. They used OIPD in addition to two subjective global transition scales, one in relation to periodontal health and the other covering oral health in general. A five-point Likert scale ranging from "worsened a lot" to "improved a lot" was used. These authors concluded that the minimally important difference was around five scale points and corresponded to a moderate effect size. Interestingly, the type of periodontal treatment influences how individuals perceive OHRQoL. In comparison to surgical procedures, non-surgical treatment – such as that tested in the present study – had a better influence on patients' perceptions during the immediate post-operative period (Ozcelik et al., 2007). In the treatment of moderate-to-advanced periodontitis, a quadrant-wise non-surgical approach was accompanied by improvements in subdomains of physical pain, psychological discomfort, and psychological disability of the OHIP short-form (Wong et al., 2012).

Although patients from different geographic areas, ethnic backgrounds, and socio-economic status might perceive OHQoL questions differently, consistency of this instrument has not been investigated in periodontics research. In the present study, factor analysis has not yielded conflicting results for the OHQoL questionnaire as only one factor was identified. However, we are not sure that this would not happen, for example, in other periodontal statuses or in different locations. John et al. (2014) performed an exploratory factor analysis of the OHIP after detecting conflicting results in the literature and reported four correlated dimensions. Later, a confirmatory factor analysis of the OHIP conducted by these same authors (John et al., 2014) suggested that OHRQoL could be sufficiently identified with one score.

Multiple linear regression models were used to evaluate the isolated impact of the QL factor as well as the impact of its interaction with objective measured parameters. In the present study, plaque index, gingival index, total bacterial load, and volatile sulfur compounds showed significant improvements. Patients with diabetes have large amounts of dental biofilm (Gursoy et al., 2014) but in the present study, those who experienced improvement in quality of life showed a decrease in PI and in subgingival bacterial levels.

Patients with or without diabetes who showed quality of life improvements and rinsed with the essential oils as part of the gingivitis treatment showed reductions in the amount of plaque and gingival inflammation in addition to improvements in oral odor. The literature shows essential oils' beneficial effects on plaque index, gingival index (Van Leeuwen et al., 2011; Cortelli et al. 2012), and volatile sulfur compounds which produce bacteria (Fine et al., 2005); however, the findings of the present study show, for the first time, that essential oils-related improvements positively impact self-perceived quality of life. Interestingly, Pakpour et al. (2014), based on a case-control study, suggested that self-reported measures can be used to predict treatment need since in their study, clinical variables were related to quality of life.

Conclusions

Ultrasonic debridement associated with daily use of essential oils provided improvements in OHRQoL. There were relationships between self-reported quality of life and objective gingival and halitometric measures.

Acknowledgments

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo state, Brazil - grant 2010/20424-1. Also by Productivity Research fellows (PQ), the National Program of Academic Cooperation (PROCAD) grant 552264/2011-3 and scholarship ODO063/2013 from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Brasília, Brazil.

The authors are grateful to the PhD periodontics student Suzane A Raslan for her clinical assistance and for the laboratorial assistance from the University of Taubaté team.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interests related to the present study.

References

1. Jönsson B, Öhrn K. Evaluation of the effect of non-surgical periodontal treatment on oral health-related quality of life: estimation of minimal important differences 1 year after treatment. *J Clin Periodontol*. 2014 Mar;41(3):275-82.
2. Apatzidou AD, Bakirtzoglou E, Vouros I, Karagiannis V, Papa A, Konstantinidis A. Association between oral malodour and periodontal disease-related parameters in the general population. *Acta Odontol Scand*. 2013 Jan;71(1):189-95. doi: 10.3109/00016357.2011.654259.
3. Yaegaki K1, Coil JM. Clinical application of a questionnaire for diagnosis and treatment of halitosis. *Quintessence Int*. 1999 May;30(5):302-6.
4. Drumond-Santana T1, Costa FO, Zenóbio EG, Soares RV, Santana TD. Impact of periodontal disease on quality of life for dentate diabetics. *Cad Saude Publica*. 2007 Mar;23(3):637-44.
5. Pavolotskaya A, McCombs G, Darby M, Marinak K, Dayanand NN. Sulcular sulfide monitoring: an indicator of early dental plaque-induced gingival disease. *J Dent Hyg*. 2006;80(1):11.
6. Pereira AL, Cortelli SC, Aquino DR, Franco GC, Cogo K, Rodrigues E, Costa FO, Holzhausen M, Cortelli JR. Reduction of salivary arginine catabolic activity through periodontal therapy. *Quintessence Int*. 2012 Oct;43(9):777-87.
7. Dupim Souza AC, Franco CF, Pataro AL, Guerra T, de Oliveira Costa F, da Costa JE. Halitosis in obese patients and those undergoing bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2013 Mar-Apr;9(2):315-21.
8. Eli I, Baht R, Koriati H, Rosenberg M: Self-perception of breath odor. *Journal of the American Dental Association* 2001, 132(5):621-6.

9. Kallio P, Nordblad A, Croucher R, Ainamo J. Self-reported gingivitis and bleeding gums among adolescents in Helsinki. *Community Dent Oral Epidemiol* 1994; 22: 277-282.
10. Ervasti L, Knuuttila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. *J Periodontol* 1985; 56(3):154-7.
11. Gürsoy UK1, Yildiz Çiftlikli S, Könönen E, Gürsoy M, Doğan B. Salivary interleukin-17 and tumor necrosis factor- α in relation to periodontitis and glycemic status in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes*. 2014 Oct 18. doi: 10.1111/1753-0407.12228.
12. Montero J, Albaladejo A, Zalba JI. Influence of the usual motivation for dental attendance on dental status and oral health-related quality of life. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014 May 1;19(3):e225-31.
13. Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2010 Jan 15;2:3.
14. Nikbin A, Bayani M, Jenabian N, Khafri S, Motalebnejad M. Oral health-related quality of life in diabetic patients: comparison of the Persian version of Geriatric Oral Health Assessment Index and Oral Health Impact Profile: A descriptive-analytic study. *J Diabetes Metab Disord*. 2014 Feb 4;13(1):32. doi: 10.1186/2251-6581-13-32.
15. Sundaram NS1, Narendar R, Dineshkumar P, Ramesh SB, Gokulanathan S. Evaluation of oral health related quality of life in patient with mild periodontitis among young male population of Namakkal district. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013 Jun;5(Suppl 1):S30-2. doi: 10.4103/0975-7406.113289.
16. Tomazoni F1, Zanatta FB, Tuchtenhagen S, da Rosa GN, Del Fabro JP, Ardenghi TM. Association of Gingivitis With Child Oral Health-Related Quality of Life. *J Periodontol*. 2014 Nov;85(11):1557-1565.

17. White DA1, Tsakos G, Pitts NB, Fuller E, Douglas GV, Murray JJ, Steele JG. Adult Dental Health Survey 2009: common oral health conditions and their impact on the population. *Br Dent J*. 2012 Dec;213(11):567-72. doi: 10.1038/sj.bdj.2012.1088.
18. Consolidated standards of reporting trials. [http://www.consort-statement.org/Media/Default/Downloads/CONSORT%202010%20Statement/CONSORT%202010%20Statement%20\(BMJ\).pdf](http://www.consort-statement.org/Media/Default/Downloads/CONSORT%202010%20Statement/CONSORT%202010%20Statement%20(BMJ).pdf) . Date of access 12 September 2010.
19. Raslan et al. 2015
20. McGrath C, Bedi R. Population based norming of the UK oral health related quality of life measure (OHQoL-UK). *Br Dent J*. 2002 Nov 9;193(9):521-4;
21. McGrath C, Bedi R. Measuring the impact of oral health on quality of life in Britain using OHQoL-UK(W). *J Public Health Dent*. 2003 Spring;63(2):73-7.
22. Dini EL, McGrath C, Bedi R. An evaluation of the oral health quality of life (OHQoL) instrument in a Brazilian population. *Community Dent Health*. 2003 Mar;20(1):40-4
23. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
24. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled Trial. *J Periodontol* 2002;73:911-924.
25. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:121-135.
26. Loe H, Silness, J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963;21:533-551.
27. Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC et al. Etiological analysis of initial colonization of

periodontal pathogens in oral cavity. *J Clin Microbiol* 2008;46:1322-1329.

28. NCBI/Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Date of access 12 January 2013.

29. Casarin RC, Ribeiro Edel P, Mariano FS, Nociti FH Jr, Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2010;45:635-642.

30. World Health Organization (1948) Preamble to the Constitution of the World Health Organization as adopted by the International Health Conference, New York, 19–22 June, 1946. Official Records of the World Health Organization, no. 2, p. 100. Available at <http://www.who.int/about/definition/en/print.html>

31. Kuznetsov L, Griffin SJ, Davies MJ, Lauritzen T, Khunti K, Rutten GE, Simmons RK Diabetes-specific quality of life but not health status is independently associated with glycaemic control among patients with type 2 diabetes: a cross-sectional analysis of the ADDITION-Europe trial cohort. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 May;104(2):281-7. doi: 10.1016/j.diabres.2013.12.029.

32. Castro Rde A, Portela MC, Leão AT, de Vasconcellos MT. Oral health-related quality of life of 11- and 12-year-old public school children in Rio de Janeiro. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2011 Aug;39(4):336-44.

33. Cicciù M, Matakana G, Signorino F, Brugaletta A, Cicciù A, Bramanti E. Relationship between oral health and its impact on the quality life of Alzheimer's disease patients: a supportive care trial. *Int J Clin Exp Med*. 2013 25;6(9):766-72.

34. Amir H. Pakpour & Santhosh Kumar & Bengt Fridlund & Stefan Zimmer. A case-control study on oral health-related quality of life in kidney disease patients undergoing haemodialysis. Clin Oral Invest DOI 10.1007/s00784-014-1355-6
35. Rokhsareh Sadeghi, Ferial Taleghani¹, Sareh Farhadi. Oral Health Related Quality of Life in Diabetic Patients. Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects
36. Aslund M, Suvan J, Moles DR, D'Aiuto F, Tonetti MS. Effects of two different methods of non-surgical periodontal therapy on patient perception of pain and quality of life: a randomized controlled clinical trial. J Periodontol. 2008 Jun;79(6):1031-40. doi: 10.1902/jop.2008.070394 .
37. Tsakos G, Bernabe´ E, D'Aiuto F, Pikhart H, Tonetti M, Sheiham A, Donos N. Assessing the minimally important difference in the Oral Impact on Daily Performances index in patients treated for periodontitis. J Clin Periodontol 2010; 37: 903–909. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01583.x.
38. Ozcelik O, Haytac MC, Seydaoglu G. Immediate post-operative effects of different periodontal treatment modalities on oral health-related quality of life: a randomized clinical trial. J Clin Periodontol. 2007 Sep;34(9):788-96.
39. Wong RMS, Ng SKS, Corbet EF, Leung WK. Non-surgical periodontal therapy improves oral health-related quality of life. J Clin Periodontol 2012; 39: 53–61. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01797.x.
40. John MT, Reissmann DR, Feuerstahler L, Waller N, Baba K, Larsson P, Celebić A, Szabo G, Rener-Sitar K. Exploratory factor analysis of the Oral Health Impact Profile J Oral Rehabil. 2014 Sep;41(9):635-43. doi: 10.1111/joor.12192.

41. John MT, Feuerstahler L, Waller N, Baba K, Larsson P, Celebić A, Kende D, Rener-Sitar K, Reissmann DR. Confirmatory factor analysis of the Oral Health Impact Profile. *J Oral Rehabil.* 2014 Sep;41(9):644-52. doi: 10.1111/joor.12191.
42. Van Leeuwen MP, Slot DE, Van der Weijden GA. Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *J Periodontol* 2011;82:174-194.
43. Fine DH1, Furgang D, Sinatra K, Charles C, McGuire A, Kumar LD. In vivo antimicrobial effectiveness of an essential oil-containing mouth rinse 12 h after a single use and 14 days' use *J Clin Periodontol.* 2005 Apr;32(4):335-40.
44. Cortelli SC, Cortelli JR, Wu MM, Simmons K, Charles CA. Comparative antiplaque and antigingivitis efficacy of a multipurpose essential oil-containing mouthrinse and a cetylpyridinium chloride-containing mouthrinse: A 6-month randomized clinical trial. *Quintessence Int* 2012;43:e82-94
45. Pakpour AH, Kumar S, Fridlund B, Zimmer S. A case-control study on oral health-related quality of life in kidney disease patients undergoing haemodialysis. *Clin Oral Investig.* 2014 Nov 15.

Figure legend

Figure 1 - Study design from screening to completion of the trial according to consolidated standards of reporting trials (CONSORT).

ANEXO G – Artigo aceito para publicação no *Brazilian Journal of Periodontology*

Braz J Periodontol - March 2014 - volume 24 - issue 01

REVISTA
PERIODONTIA

NÍVEIS COMPARATIVOS PRÉ- E PÓS-TRATAMENTO DE CSV, CARGA BACTERIANA TOTAL SUBGENGIVAL E SANGRAMENTO GENGIVAL

Pre-and post-treatment comparative levels of VSC, subgingival total bacterial load and gingival bleeding

Maíra Terra Garcia¹, Juliana Oliveira Silveira², Antonio Gargioni Filho³, José Roberto Cortelli⁴, Fernando Oliveira Costa⁵, Davi Romeiro Aquino⁴, Gilson Cesar Nobre Franco⁶, Sheila Cavalca Cortelli⁴

¹ Bolsista PIBIC CNPq-UNITAU

² Mestranda em Periodontia – FO, UFMG

³ Doutorando em Periodontia – FO, UNITAU

⁴ Professor Assistente, NUPER – UNITAU

⁵ Professor Associado, Departamento de Periodontia, UFMG

⁶ Professor Adjunto, UPPG

Recebimento: 14/01/14 - Correção: 04/02/14 - Aceite: 20/02/14

RESUMO

O objetivo deste ensaio clínico randomizado de 3 meses de duração foi avaliar os efeitos da combinação de procedimentos mecânicos e químicos sobre os níveis de sangramento gengival, Compostos Sulfurados Voláteis (CSV) e carga total bacteriana de pacientes com gengivite. Sessenta voluntários sistemicamente saudáveis com gengivite foram divididos em dois grupos: raspagem profissional associada ao uso diário de óleos essenciais (20ml/2x/dia) ou solução placebo (20ml/2x/dia). Todos os participantes receberam instruções de higiene bucal. Índice de sangramento gengival, carga bacteriana total subgengival (PCR em tempo real) e concentrações de CSV (dosador portátil Halimeter) foram mensurados antes e 90 dias após o tratamento gengival. Os dados foram comparados estatisticamente pelos teste t-Student e teste t-pareado ($p < 0,05$). Resultados: Finalizaram o estudo 27 indivíduos no grupo teste e 25 no grupo placebo. A carga bacteriana total e o IG reduziram mais evidentemente no grupo teste do que no grupo placebo. No grupo teste os valores médios de CSV reduziram de 94,62ppb (inicial) para 62,19ppb (3 meses) enquanto no grupo placebo eles se mantiveram estáveis entre as mensurações inicial (93,46ppb) e de 3 meses (95,00ppb). Conclusões: o tratamento gengival seguido de 90 dias de uso de solução de óleos essenciais acarretou melhora dos parâmetros monitorados, IG, carga total bacteriana e CSV.

UNITERMOS: Composto Orgânicos Voláteis, Halitose, Gengivite, Bactéria. R Periodontia 2014; 24:24-29.

INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira de Pesquisa dos Odores Bucais (ABPO), no Brasil, 40% da população possui halitose crônica. E, dentre as consequências da halitose o impacto social é o principal motivo pela procura de tratamento (Moreno *et al.*, 2005). Muitas vezes a percepção pelo portador é ausente pois o olfato se adapta rapidamente ao odor (Carvalho *et al.*, 2011). Assim, a identificação é feita em muitos casos por pessoas próximas, como cônjuges e familiares. Adicionalmente, o afastamento social decorrente

da halitose tende a causar depressão ou estresse (Domingos *et al.*, 2011).

A halitose é um achado frequente em pacientes periodontais. Apatzidou *et al.* (2013) reportaram que a halitose é mais facilmente detectável em pacientes com gengivite do que naqueles com periodonto saudável. Além disso, indivíduos acometidos por doença periodontal tendem a exibir sangramento gengival espontâneo ou provocado. Assim, clinicamente níveis aumentados de sangramento gengival podem ser mensurados em pacientes com gengivite quando comparados a saúde gengival (Pereira *et al.*, 2012).



Algumas espécies patogênicas que colonizam o ambiente subgengival de pacientes com gengivite (Pereira *et al.*, 2012; Eicke *et al.*, 2013) são produtoras de Compostos Sulfurados Voláteis (CSV), principais substâncias causadoras de halitose. Os CSV – mais especificamente, sulfeto de hidrogênio (H_2S), metilmercaptana (CH_3SH), e em menor importância, dimetilsulfeto [$(CH_3)_2S$] – são comumente identificados como importantes contribuintes para o mau odor bucal, resultante da decomposição anaeróbia de cisteína, cistina e metionina (Tonzetich, 1977). Os níveis bacterianos totais tendem a aumentar com o desenvolvimento do processo inflamatório e aprofundamento do sulco gengival. E, esse aumento global do componente microbiano é acompanhado por aumento nas proporções de patógenos periodontais inclusive os produtores de CSV (Ge *et al.*, 2013). Adicionalmente, o perfil global bacteriano parece se relacionar com o aparecimento e a gravidade da halitose (Takeshita *et al.*, 2010). O objetivo deste ensaio clínico randomizado de 3 meses de duração foi avaliar os efeitos do tratamento gengival profissional combinado com o uso caseiro diário de solução contendo óleos essenciais sobre a carga bacteriana total subgengival, bem como os níveis de sangramento gengival e CSV de pacientes com gengivite.

MATERIAIS E MÉTODOS

População do estudo

O presente ensaio clínico paralelo duplo-cego randomizado e controlado por placebo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté (Protocolo 522/10) e dentre os indivíduos elegíveis participaram do estudo aqueles que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Com base em estudo piloto os grupos teste e controle foram compostos por no mínimo 20 indivíduos/grupo. Foram incluídos indivíduos com gengivite exibindo no mínimo 30% dos sítios com sangramento (Lopez *et al.*, 2002), sem evidência radiográfica de reabsorção óssea alveolar, de ambos os gêneros, apresentando no mínimo 20 dentes, boa saúde sistêmica e fluxo salivar normal (1,5 ml – 2 ml/min) e ausência de saburra lingual clinicamente evidente.

Parâmetros clínicos periodontais

Para estabelecimento do diagnóstico e monitoramento clínico, os participantes foram submetidos a exame periodontal completo, sendo as mensurações obtidas em quatro pontos para cada dente presente excetuando-se os terceiros molares, com auxílio de uma sonda periodontal manual (Hu-Friedy). Os parâmetros clínicos avaliados foram: profundidade de sondagem (PS); índice de placa (Silness & Loe, 1964) e índice

gengival (Loe & Silness, 1963). Adicionalmente, realizou-se exame radiográfico panorâmico para determinação da altura da crista óssea alveolar. Como desfecho clínico, foi monitorado no início e no final do estudo (90 dias pós-tratamento) apenas o índice gengival. Os exames periodontais foram realizados por um examinador treinado e calibrado.

Mensuração de CSV

A halitometria (Halimeter®, Interscan corporation) foi realizada por um examinador treinado e calibrado introduzindo-se o canudo descartável conectado ao dispositivo de leitura cerca de 4 cm no interior da cavidade bucal. O participante foi instruído a permanecer com os lábios entreabertos, sem respirar por 15 segundos e foi registrado o pico máximo de leitura indicativo da concentração de CSV bucais. Os resultados de CSV foram interpretados como se segue: 80 = sem odor perceptível; 80 a 100 = odor perceptível; 100 a 120 = halitose moderada; 120 a 150 = halitose pronunciada e > 150 = halitose grave. Essa medição foi repetida três vezes consecutivas gerando um CSV médio.

Os participantes receberam instruções específicas sobre a restrição de uso de cosméticos e/ou outras substâncias odoríferas bem como sobre o tipo de alimentação e hidratação nos dias anterior e de realização dos exames. As mensurações foram efetuadas no período da manhã com os indivíduos em jejum. As soluções para bochecho foram utilizadas apenas na noite que antecedeu às consultas e as demais medidas de higiene bucal também foram suspensas nas manhãs de avaliação (Dupim *et al.*, 2011; Ehizle & Akhionbare, 2013).

Análise microbiológica

As amostras intra-sulculares foram coletadas de todos os indivíduos, dos sítios mesio-vestibulares dos dentes 16, 11, 26, 36, 31 e 46 (Cortelli *et al.*, 2008) (ou na ausência desses, dos dentes 17, 21, 27, 37, 41 e 47), no início e aos 90 dias. Inicialmente o biofilme supragengival foi removido com gaze estéril e os sítios então isolados com roletes de algodão e secos delicadamente com jato de ar. Cones de papel absorvente estéril (nº 30, marca Tanari®) foram introduzidos na bolsa/sulco gengival e mantidos em posição por 60 segundos. Os cones foram colocados no mesmo minitubo seco (pool) e congelados a -80°C. Posteriormente as amostras foram ressuspensas em tampão TE. A extração do DNA genômico das amostras foi realizada através do kit PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação da carga total bacteriana subgengival foi realizada utilizando-se PCR em tempo real, primers especificamente desenhados (NCBI Nucleotide Search - <http://>



www.ncbi.nlm.nih.gov/; software Primer3 - <http://frodo.wi.mit.edu/>) e testados quanto à especificidade (NCBI BLAST - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e sistema de detecção SYBR Green®. A quantificação absoluta foi realizada através da comparação do Ct [ciclo no qual a fluorescência se torna detectável acima da fluorescência de fundo (background)], que é inversamente proporcional ao logaritmo do número de moléculas iniciais alvo obtido das amostras com os valores de Ct determinados de uma curva padrão [$10^1 - 10^8$ ufc/ml, a partir de cepas ATCC fornecidas gentilmente pelo Instituto Fio Cruz - RJ (INCQS)].

Grupos experimentais e tratamentos

Os indivíduos selecionados foram divididos aleatoriamente em dois grupos: teste ou placebo. Posteriormente à orientação sobre os procedimentos mecânicos de higiene bucal, o grupo teste recebeu em uma única sessão raspagem profissional ultrassônica (Cavitron Select - Densply) seguida de profilaxia com taça de borracha e pasta profilática. Em seguida, esse grupo foi instruído a utilizar solução contendo óleos essenciais, cloreto de zinco e flúor (Listerine®, cuidado total) - (bochechos 20ml/2x/dia/30seg) durante 90 dias. O primeiro bochecho foi realizado de forma supervisionada e os demais nos próprios lares dos participantes de forma não supervisionada sendo os horários anotados diariamente. Os participantes receberam kits de higiene bucal mensalmente. Por sua vez, o grupo placebo recebeu os mesmos procedimentos e instruções, todavia, o bochecho realizado em regime similar foi com solução placebo (Byofórmula, Taubaté - SP, Brasil).

Análise estatística

Para determinação da reprodutibilidade intraexaminador 10 exames foram repetidos num intervalo de 30 dias, antes dos exames inicial e final, e os examinadores foram considerados calibrados pois obtiveram erro padrão da medida - EPM = 0,65 e 0,72 e kappa - K = 0,87 e 0,90 para os dados clínicos e de CSV, respectivamente.

Os valores médios de índice gengival, concentrações de CSV e carga total bacteriana subgengival foram comparados intragrupo (inicial vs. final) e intergrupos (teste vs. placebo). Os testes estatísticos utilizados foram teste t Student e teste t pareado, e o nível de significância adotado foi 5% ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

Cada um dos dois grupos foi composto por 20 indivíduos adultos sistemicamente saudáveis com gengivite. Embora o grupo placebo tenha exibido uma tendência numérica de redução no parâmetro IG, essa foi significativa apenas

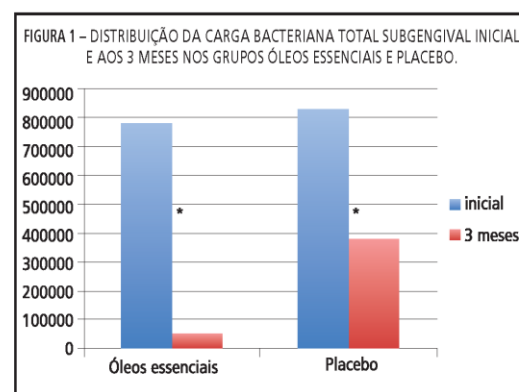
no grupo teste (Tabela 1). A figura 1 mostra pela análise intragrupo os dados comparativos subgengivais de carga bacteriana total. A análise intergrupos revelou redução mais evidente no grupo teste (inicial 785408,19 $\pm$ 1341518,13 vs. final 52906,17 $\pm$ 172643,36) do que no grupo placebo (inicial 826721,27 $\pm$ 2242179,63 vs. final 379437,21 $\pm$ 396758,45).

		Índice gengival
Grupo óleos essenciais	inicial	0,54 $\pm$ 0,31
	final	0,33 $\pm$ 0,28
<i>p</i> valor		0,02*
Grupo placebo	inicial	0,59 $\pm$ 0,33
	final	0,53 $\pm$ 0,17
<i>p</i> valor		0,09
Evolução	teste	0,21 $\pm$ 0,16
	placebo	0,06 $\pm$ 0,31
<i>p</i> valor		0,03*

Teste t de Student e t pareado.

*Diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Evolução indica as variações identificadas pela análise evolutiva (follow-up).



No grupo teste os valores médios de CSV reduziram de 94,62ppb (inicial) para 62,19ppb (3 meses). Já no grupo placebo não foram observadas reduções entre as mensurações inicial (93,46ppb) e de 3 meses (95,00ppb) (Figura 2).

A tabela 2 mostra as proporções de indivíduos nos grupos teste e placebo por categoria de CSV ao longo do estudo. Nas categorias de maior gravidade as taxas sofreram reduções no grupo teste.

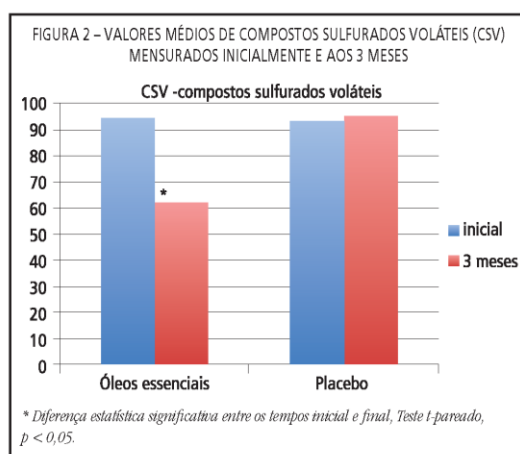


TABELA 2 – PERCENTUAL DE INDIVÍDUOS NO GRUPO TESTE E PLACEBO NO INÍCIO E AO FIM DO PERÍODO EXPERIMENTAL DE ACORDO COM OS NÍVEIS MÉDIOS DE CSV.

CSV ppb	Grupo óleos essenciais		Grupo placebo	
	Inicial	3 meses	Inicial	3 meses
<80	44,44%	76,92%	39,28%	38,09%
80-100	14,81%	11,53%	32,14%	38,09%
100-120	11,11%	11,53%	7,14%	9,52%
120-150	14,81%	0%	7,14%	9,52%
> 150	14,81%	0%	14,28%	4,76%

CSV – compostos sulfurados voláteis.

Ppb – parte por bilhão.



DISCUSSÃO

A halitose representa hoje um problema social que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. Na maioria dos casos a causa tem origem bucal como, por exemplo, saburra lingual, pobre higiene bucal e presença de doenças periodontais (Faber, 2009). Na patogênese das doenças periodontais alguns patógenos são relevantes e dentre eles pode-se mencionar espécies como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*. Essas espécies possuem enzimas que contribuem para a produção de CSV que por sua vez impactam o hálito negativamente. Com o progresso e o agravamento da doença periodontal ocorre tanto um aumento na carga bacteriana total quanto nas proporções de patógenos específicos (Ge *et al.*, 2013). Por isso foi previamente sugerido uma associação entre a carga bacteriana total na saliva com halitose (Takeshita) embora

essa relação tenha sido pouco explorada até o momento. No presente estudo a carga bacteriana total quantificada não foi salivar e sim a do ambiente subgingival. E, a comparação dos níveis bacterianos totais entre pré- e pós-tratamento revelou reduções dos valores médios em ambos os grupos. Em pacientes com gengivite Pereira *et al.* (2012) já haviam demonstrado reduções microbiológicas em amostras subgingivais após instrumentação mecânica manual. Assim, no presente estudo a instrumentação mecânica combinada a orientação de higiene bucal acarretou um efeito microbiológico positivo, entretanto a combinação desses procedimentos mecânicos com o uso regular do agente químico provocou melhoras superiores. O uso de óleos essenciais na forma de colutório já havia sido associado a reduções microbiológicas no ambiente subgingival. Na ausência de instrumentação mecânica Fine *et al.* (2007) relataram reduções significativas de patógenos subgingivais após 14 dias de uso do produto. Reduções também foram observadas em pacientes com periodontite quando os óleos essenciais foram utilizados em um modelo de desinfecção em estágio único (Cortelli *et al.*, 2009) ou associado a raspagem ultrassônica (Morozumi *et al.*, 2013).

Em uma população de adolescentes a instrumentação ultrassônica combinada à orientação de higiene bucal foi clinicamente capaz de reverter o quadro clínico de gengivite (Novaes Júnior *et al.*, 2004). Contudo, no presente estudo aos três meses não foi observada redução do índice gengival no grupo que recebeu apenas tratamento mecânico. Essa redução foi significativa apenas no grupo que fez uso caseiro de óleos essenciais. Estudos prévios também demonstraram resultados semelhantes (Patel & Malaki, 2008; Cortelli *et al.*, 2012). Ao se comparar a eficácia clínica da clorexidina com os óleos essenciais revisões sistemáticas como a de Van Leeuwen *et al.* (2011) têm apontado um efeito antigengivite semelhante



apesar de um menor efeito antiplaca dos óleos essenciais.

Especificamente em relação aos níveis de CSV o grupo que fez uso de óleos essenciais apresentou um comportamento mais favorável. Saad *et al.* (2011) já haviam observado utilizando diferentes métodos efeitos positivos sobre o controle de CSV e halitose associada ao uso de óleos essenciais o que segundo Fine *et al.* (2005) pode estar associado a redução específica das bactérias produtoras de CSV. Alterações bacterianas semelhantes foram também mencionadas por Thaweboon & Thaweboon (2011). Em síntese os enxaguatórios contendo esses princípios ativos tem representado um forte aliado na prevenção e tratamento da gengivite e controle de outras condições que afetam a cavidade bucal e isso se deve sobretudo às suas propriedades antimicrobiana e anti-inflamatória.

CONCLUSÃO

Além da redução do parâmetro clínico IG frequentemente observada na literatura, o tratamento profissional complementado pelo uso diário de solução contendo óleos essenciais foi acompanhado de reduções superiores na carga bacteriana total subgengival e nos níveis de CSV.

AGRADECIMENTOS

Fapesp auxílio pesquisa 2010/20424-1 e bolsa de iniciação científica PIBIC ODO063/2013.

ABSTRACT

The aim of this 3-month randomized clinical study was to evaluate the effects of the combination of mechanical and chemical procedures over the levels of gingival bleeding, VSC and total bacterial load in patients with gingivitis. Sixty systemically healthy individuals with gingivitis were randomized in two groups: professional debridement along with the daily use of essential oils (20ml/2x/day) or of a placebo solution (20ml/2x/day). All participants received oral hygiene instructions. Gingival Index, total bacterial load (real time PCR) and VSC concentration (portable Halimeter) were measured at baseline and at 90 days after gingival treatment. Data were statistically compared by Student-t test and paired-t test ($p < 0.05$). Results: Twenty-seven individuals finished the study in the test group and 25 in the placebo group. Total bacterial load and GI were greatest reduced in the test group than in the placebo group. Mean VSC values in the test group were reduced from 94,62ppb (at baseline) to 62,19ppb (3 months) while in the placebo group measures continued stable between baseline (93,46ppb) and (95,00ppb) 3-month examinations. Conclusions: Gingival treatment followed by the use of essential oils for 90 days lead to an improvement in the monitored parameters, GI, total bacterial load and VSC.

UNITERMS: Volatile Organic Compounds. Halitosis. Gingiviti. Bacteria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Moreno T, Haas AN, Castro GD, Winter R, Oppermann RV, Rösing CK. Tratamento da periodontite agressiva e alterações nos compostos sulfurados voláteis. Rev Odonto Ciênc 2005 jul/set;20(49):217-21.
- 2- Carvalho YJP, Barreto FX, Queiroz CS, Ramalho ALJ, Rêgo RD, Lima DLF. Escovação lingual e percepção subjetiva da halitose em pacientes atendidos no curso de odontologia da universidade de Fortaleza. Rev Periodont 2011 Sept;21(3):81-5.
- 3- Domingos PAS, Abreu AC, Dantas AAR, Oliveira ALBM. Halitose: limitando qualidade de vida. Rev Odontol USP 2011 maio/ago;23(2):171-81.
- 4- Apatzidou AD, Bakirtzoglou E, Vouros I, Karagiannis V, Papa A, Konstantinidis A. Association between oral malodour and periodontal disease-related parameters in the general population. Acta Odontol Scand. 2013 Jan;71(1):189-95.
- 5- Pereira AL, Cortelli SC, Aquino DR, Franco GC, Cogo K, Rodrigues E *et al.* Reduction of salivary arginine catabolic activity through periodontal therapy. Quintessence Int 2012 Oct;43(9):777-87.
- 6- Eick S, Pietkiewicz M, Sculean A. Oral microbiota in Swiss adolescents. Clin Oral Investig. 2013 Jan;17(1):79-86.
- 7- Tonzetich J. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. J Periodontol 1977;48:13.
- 8- Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. PLoS One 2013 June;8(6):e65520.
- 9- Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Shimazaki Y, Yoneda M, Hirofuji T *et al.* Relationship between oral malodor and the global composition of indigenous bacterial populations in saliva. Appl Environ Microbiol 2010 May;76(9):2806-14.
- 10- López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled Trial. J Periodontol 2002; 73: 911-924.
- 11- Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol Scand



- 1964;22:121-35.
- 12- Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963;21:533-551.
- 13- Dupim Souza AC, Franco CF, Pataro AL, Guerra T, de Oliveira Costa F, Costa JE. Halitosis in obese patients and those undergoing bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2011 Nov 25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soard.2011.10.020>.
- 14- Ehizele AO, Akhionbare O. Effect of Non-Surgical Periodontal Therapy on the Concentration of Volatile Sulfur Compound in Mouth Air of a Group of Nigerian Young Adults. *Ann Med Health Sci Res*. 2013 Jul-Sep; 3(3): 433-437.
- 15- Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Fernandes CB, Carvalho-Filho J, Franco GCN *et al*. Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *J Clin Microbiol* 2008;46:1322-1329.
- 16- Faber J. Halitose. *Rev Dent Press Ortodont Ortop Fac* 2009 maio/jun;14(3):14-15.
- 17- Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Goldsmith D, Ricci-Nittel D, Charles CH *et al*. Effect of rinsing with an essential oil-containing mouthrinse on subgingival periodontopathogens. *J Periodontol* 2007 Oct;78(10):1935-42.
- 18- Cortelli SC, Cortelli JR, Holzhausen M, Franco GC, Rebelo RZ, Sonagere AS *et al*. Essential oils in one-stage full-mouth disinfection: double-blind, randomized clinical trial of long-term clinical, microbial and salivary effects. *J Clin Periodontol* 2009 Apr;36(4):333-42.
- 19- Morozumi T, Kubota T, Abe D, Shimizu T, Nohno K, Yoshie H. Microbiological effect of essential oils in combination with subgingival ultrasonic instrumentation and mouth rinsing in chronic periodontitis patients. *Int J Dent* 2013;2013:146479.
- 20- Novaes Júnior AB, Souza SL, Taba Jr M, Grisi MF, Suzigan LC, Tunes RS. Control of gingival inflammation in a teenager population using ultrasonic prophylaxis. *Braz Dent J* 2004;15(1):41-5.
- 21- Patel RM, Malaki Z. The effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis. *Evid Based Dent* 2008;9(1):18-9.
- 22- Cortelli SC, Cortelli JR, Wu MM, Simmons K, Charles CA. Comparative antiplaque and antigingivitis efficacy of a multipurpose essential oil-containing mouthrinse and a cetylpyridinium chloride-containing mouthrinse: A 6-month randomized clinical trial. *Quintessence Int* 2012 July/Aug;43(7):e82-94.
- 23- Van Leeuwen MP, Slot DE, Van Der Weijden GA. Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *J Periodontol* 2011 Feb;82(2):174-94.
- 24- Saad S, Greenman J, Shaw H. Comparative effects of various commercially available mouthrinse formulations on oral malodor. *Oral Dis* 2011 Mar;17(2):180-6.
- 25- Fine DH, Furgang D, Sinatra K, Charles C, McGuire A, Kumar LD. *In vivo* antimicrobial effectiveness of an essential oil-containing mouthrinse 12 h after a single use and 14 days' use. *J Clin Periodontol* 2005 Apr;32(4):335-40.
- 26- Thaweboon S, Thaweboon B. Effect of an essential oil-containing mouthrinse on VSC-producing bacteria on the tongue. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011 Mar;42(2):456-62.

Endereço para correspondência:
Rua Expedicionário Ernesto Pereira, 110 – Centro
CEP: 12020-330 – Taubaté – SP
E-mail: maa.terra@hotmail.com

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

Antonio Carlos Gargioni Filho

Taubaté/SP, Abril de 2015.