UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

**Administração tópica do probiótico *Bifidobacterium animalis*
subsp. lactis HN019 reduz a destruição tecidual periodontal em
ratos com periodontite experimental: estudo histológico,
microtomográfico, imunológico e microbiológico**

LUIZ FERNANDO FERREIRA DE OLIVEIRA

PG.PERIO
FOP- USP

Ribeirão Preto

2016

LUIZ FERNANDO FERREIRA DE OLIVEIRA

**Administração tópica do probiótico *Bifidobacterium animalis*
subsp. lactis HN019 reduz a destruição tecidual periodontal em
ratos com periodontite experimental: estudo histológico,
microtomográfico, imunológico e microbiológico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Odontologia
(Periodontia).

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Ribeirão Preto

2016

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

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Oliveira, Luiz Fernando Ferreira de,

Administração tópica do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 reduz a destruição tecidual periodontal em ratos com periodontite experimental: estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico. Ribeirão Preto, 2016.

116p.: il.; 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia). Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Michel Reis Messoria

1. Periodontite. 2. Probióticos. 3. Ratos. 4. *Bifidobacterium*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

OLIVEIRA, L. F. F. **Administração tópica do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 reduz a destruição tecidual periodontal em ratos com periodontite experimental: estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico.** 2016. 116f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Área de concentração: Periodontia

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatoria

A *Deus,*

“Se nada mudar, **invente**, e quando mudar, **entenda**.

Se ficar difícil, **enfrente**, e quando ficar fácil, **agradeça**.

Se a tristeza rondar, **alegre-se**, e quando ficar alegre, **contagie**.

E quando recomeçar, **acredite**. Você pode tudo.

Tudo consegue pelo amor, e pela fé que você tem em **Deus!**”

A minha esposa **Luiza**,

Amor, há tempos quero expressar a minha gratidão e alegria por estar ao seu lado. Você é uma pessoa maravilhosa, grande companheira, a mulher que eu amo. Passamos por momentos muito difíceis e você demonstrou ser capaz de ultrapassar qualquer obstáculo que surgir em nossas vidas, isso me enche de orgulho. Sem você nada disso seria possível e em nenhum momento a vejo fora do que faço.

*"De almas sinceras a união sincera
Nada há que impeça: amor não é amor
Se quando encontra obstáculos se altera,
Ou se vacila ao mínimo temor.
Amor é um marco eterno, dominante,
Que encara a tempestade com bravura;
É astro que norteia a vela errante,
Cujo valor se ignora, lá na altura."*

(William Shakespeare)

A meu filho **Samuel**,

Você é meu maior presente já recebido, encheu minha vida de alegrias. Com você me tornei uma pessoa melhor, aprendi a ser pai. Agradeço você que me mostrou o verdadeiro sentido da vida, o amor incondicional e verdadeiro.

"Nasceu-te um filho. Não conhecerás, jamais, a extrema solidão da vida."

(Jorge de Sena)

Aos meus pais **Carlos e Iraide,**

Pouco me restam palavras para agradecer tudo que fazem por mim, vocês foram meus primeiros professores, me ensinaram a andar, falar, atravessar uma rua, enfim me ensinaram o viver. Agradeço a vocês que nunca em momento algum deixaram de acreditar em mim, a vocês que sempre estiveram presentes em todos momentos da minha vida, momentos bons e até mesmo momentos ruins. Sou o que sou hoje graças a vocês que me ensinaram a ser uma pessoa de verdade e me mostraram que a maior virtude do ser humano é o caráter. Podem ter certeza de que o meu maior espelho sempre foi vocês. Serei eternamente grato a tudo que vocês sempre fizeram por mim. Muito obrigado meus pais.

Meu amor por vocês transcende qualquer medida...

Aos meus avós **Vanildo** e **Irinéia** (*in memoriam*),

Tamanha é a falta que vocês me fazem, dedico todas as minhas conquistas a vocês que quando presentes sempre demonstraram carinho e amor para comigo. Sei que vocês sempre estiveram perto de mim em todas as vezes que senti alegria e também em momentos de medo e tristeza, vocês são meus anjos da guarda. Muito obrigado vovô e vovó.

Aos meus avós **José** e **Nenis**,

Palavras me faltam para dizer a importância de vocês em minha vida. O amor que sinto por vocês é imensurável, sempre tive de vocês dois a maior força de todas. Muito obrigado por tudo vovô e vovó.

Amo vocês...

Aos meus irmãos **Ana Luiza e Leandro,**

A vocês dois agradeço pela verdadeira amizade, amizade essa que supera até mesmo momentos de discórdia, sempre demonstrando que o laço que temos é o maior de todos: o de sermos irmãos. Sempre serei grato por tudo que vocês fizeram por mim. Muito obrigado meus irmãos.

*"Ser irmão é ser o quê? Uma presença a decifrar mais tarde, com saudade?
Com saudade de quê? De uma pueril vontade de ser irmão futuro, antigo e sempre?"*

(Carlos Drummond de Andrade)

A meu amigo e orientador Prof. Dr. **Michel Reis Messor**,

A você, agradeço pelos momentos de ensinamentos e amizade.

Muitas vezes pensei em desistir, a jornada é longa e dura, e quem disse que seria fácil? Você meu amigo, sempre esteve ao meu lado sem medir esforços e com palavras de incentivo.

Professor não é apenas aquele que ensina os ensinamentos básicos de uma disciplina. Professor é aquele que ensina os ensinamentos de uma vida...

Você prof. Michel, esteve presente nos momentos de decisões mais importante de minha vida, saiba que você foi uma grande referência em todas estas decisões. É enorme a admiração que tenho por você.

*"Você que reconhece o professor de verdade,
eu conheço o mestre da verdade
que todo discípulo sonha acompanhar,
ouvir, conhecer, aprender e amar."*

(Carlos Estrela)

Agradecimientos

A caminhada foi longa e dura, se hoje estou aqui, foi porque me apoiei em ombros fortes. Desta forma, agradeço:

Ao professor **Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza,**

Seriedade, ética e competência...

Valores incorruptíveis que acompanham o Sr. como profissional...

Aprendi muito com o Sr. durante todos estes anos.

Cada conselho vindo do Sr. foi sempre recebido com muito carinho.

Ao professor Dr. **Márcio Grisi,**

Exemplo de profissional de profunda humanidade...

Agradeço pela oportunidade de convívio...

Grande mestre que acrescentou muito em minha formação nestes anos de pós-graduação.

Aos professores do programa de pós-graduação em Periodontia: Prof. Dr. **Mário Taba Júnior,** Prof^a. Dr^a. **Daniela Palioto e** Prof. Dr. **Arthur Belém Novaes Júnior,**

Obrigado por tudo que aprendi durante estes anos de convívio, me orgulho muito em ter feito parte da PG Perio FORP/USP, graças a todos vocês.

"As palavras são anões... Os exemplos são gigantes!!!"

(Provérbio suíço)

A todos professores colaboradores deste projeto registro aqui meus agradecimentos:

À professora Dr^a. **Flávia Chaves Furlaneto Messora,**

Obrigado por toda ajuda na eutanásia dos animais deste projeto e também na tradução para o inglês do artigo. Agradeço também por toda convivência em todos estes anos de pós-graduação e pela oportunidade de ter participado de trabalhos de sua orientação, tudo isso me enriqueceu muito.

Ao professor Dr. **Sérgio Luís Souza Salvador,**

Obrigado pela ajuda em toda parte microbiológica do projeto que foi desenvolvida na Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto-USP, não poderia nunca deixar de agradecer por todos estes anos de ótima convivência que tornaram etapas indispensáveis deste projeto possíveis de serem realizadas. Tenha certeza que aprendi muito com o Sr.

Ao professor Dr. **Edilson Ervolino,**

Obrigado por toda ajuda com as análises imunohistoquímicas que foram realizadas no Departamento de Ciências Básicas da UNESP campus de Araçatuba. Agradeço por toda atenção para comigo durante todos os dias que passei em Araçatuba para a realização das reações imuhistoquímicas. Agradeço, não só pela ajuda, mas também por toda preocupação sempre demonstrada.

Ao professor Dr. **Renato Casarin,**

Obrigado por toda ajuda e atenção com as análises imunoenzimáticas.

A professora Dra. **Luciene Figueiredo,**

Agradeço a Sra. e demais profissionais da Universidade de Guarulhos pela recepção e realização dos exames microbiológicos.

Sou muito grato a todos vocês...

A todos amigos e técnicos que de alguma forma colaboraram com etapas indispensáveis deste projeto, registro aqui meus agradecimentos:

À técnica **Marina Del Arco,**

Agradeço por toda ajuda com o preparo e cultivo do HN019 no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto.

À técnica **Izilvânia Barros,**

Agradeço pela recepção e realização dos exames microbiológicos na Universidade de Guarulhos.

Aos amigos pós-graduandos **Gustávo Henrique Apolinário, Marcos Invernici, Paula Pessôa, Milla Sprone Tavares Ricoldi e Pedro Henrique Felix,**

A meus amigos e amigas, que participaram de etapas indispensáveis para que todos os dados necessários pudessem ser obtidos. A competência, dedicação e carinho foram essenciais nesta etapa da minha vida e serei grato para sempre por isso. Muito obrigado.

As alunas de iniciação científica **Laura Caxeta, Marcela, Marina e Laura Novaes,**

Obrigado por todos os momentos de trabalho e por toda ajuda em todas etapas deste projeto. A ajuda de vocês foi indispensável para toda a conclusão do trabalho. Saibam que aprendi muito com vocês e sou muito grato por tudo.

Aos amigos e amigas das turmas de mestrado e doutorado **Gabriel Bastos, Felipe Dantas, Sergio Lago, Carla Silva, Milena Irie, Camila Costa, Jéssica Carvalho, Cristine D'Almeida, Mariana Salles, Kelly Vargas, Felipe Santos, Umberto Ramos e Carolina Rego,**

Companhias em todos os momentos... Amizades que ficarão distantes, mas serão reais. Obrigado pela troca de experiências, pelo convívio, pelas alegrias e incertezas. Obrigado por todos esses momentos vividos e partilhados juntos.

Aos amigos e amigas da UNESP campus Araçatuba **Luan Felipe Toro, Leticia Chaves Ferreira, Fernanda Furuse Ventura dos Santos, Cristian Statkiewicz, Tiago Esgalha da Rocha e Luy de Costa,**

Agradeço por toda ajuda na realização das reações de imunohistoquímica que foram realizadas no laboratório de ciências básicas da UNESP campus Araçatuba, agradeço principalmente pela calorosa e agradável recepção. Saibam que foram dias prazerosos de trabalho ao lado de vocês. Muito obrigado por tudo.

À todos os funcionários da FORP em especial à **Tatiana, Dulce, Daniela, Carla Daniela, Joana, Sebastião, Fabíola e Adriana,**

Obrigado por todo carinho e disponibilidade, vocês tornaram estes anos mais fácil e prazeroso.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP,** pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

Resumo

RESUMO

OLIVEIRA, L. F. F. **Administração tópica do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 reduz a destruição tecidual periodontal em ratos com periodontite experimental: estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico.** 2016. 116f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração tópica de bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium* na doença periodontal experimental em ratos. Foram utilizados 32 ratos divididos nos seguintes grupos: CT (controle), DPT (doença periodontal), CT-HN019 (controle + probiótico) e DPT-HN019 (doença periodontal + probiótico). No dia 0 do experimento, a doença periodontal foi induzida nos animais dos grupos DPT e DPT-HN019 por meio da colocação de ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores. Nos Grupos CT-HN019 e DPT-HN019, 2 mL de uma suspensão contendo 10^9 unidades formadoras de colônia/mL de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) HN019 foram administrados topicamente na região subgengival dos primeiros molares inferiores nos dias 0, 3 e 7 do experimento. Nos grupos CT e DPT, as administrações tópicas foram realizadas com uma suspensão *sham* (sem probiótico). Todos os animais foram submetidos à eutanásia 14 dias após o início do experimento. Foram coletados tecido gengival, hemi-mandíbulas e biofilme bucal para avaliação dos seguintes parâmetros: i) microbiota bacteriana (*checkerboard DNA-DNA hybridization*); ii) expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (análise Multiplex); iii) imunorreatividade de peptídeos antimicrobianos (reações imunohistoquímicas - estreptavidina-biotina-peroxidase); iv) níveis inserção conjuntiva (análise histomorfométrica) e v) microarquitetura e volume ósseos (microtomografia computadorizada por transmissão de raios X). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). O grupo DPT apresentou maiores valores de porosidade óssea, espaçamento de trabéculas ósseas e nível de inserção conjuntiva, bem como menor número de trabéculas e volume ósseos quando comparado a todos os outros grupos ($p < 0,05$). No Grupo DPT-HN019, foram observados maiores percentuais de bactérias dos complexos amarelo e azul, bem como maiores expressões de Osteoprotegerina (OPG), Beta-defensina (BD)-1, BD-2 e BD-3 quando comparados àqueles do Grupo DPT ($p < 0,05$). O Grupo DPT apresentou níveis de Interleucina (IL)-1 β e Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-beta (RANKL) maiores que aqueles do Grupo DPT-HN019 ($p < 0,05$). As razões RANKL/OPG e IL-1 β /IL-10 foram mais elevadas no grupo DPT do que no Grupo DPT-HN019 ($p < 0,05$). Dentro dos limites deste estudo pode-se concluir que o uso tópico de *B. lactis* HN019 promove um efeito protetor contra a perda óssea e de inserção conjuntiva decorrentes da periodontite experimental em ratos.

Palavras-chave: Periodontite; Probióticos; Ratos; *Bifidobacterium*.

Abstract

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. F. F. **Topical administration of the probiotic *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 reduces periodontal tissue destruction in rats with experimental periodontitis: a histologic, microtomographic, immunological and microbiological study.** 2016. 116f. Dissertation (Master's Degree) – School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Palo, Ribeirao Preto, 2016.

The purpose of this study was to evaluate the effects of topical administration of probiotic bacteria of the genus *Bifidobacterium* on experimental periodontal disease in rats. 32 rats were divided into groups C (control), EP (experimental periodontitis), C-HN019 (control + probiotic) and EP-HN019 (EP+ probiotic). On day 0 of the experiment, periodontitis was induced in the animals of groups EP and EP-HN019 through the placement of ligatures around mandibular first molars. In groups C-HN019 and EP-HN019, 2 mL of suspensions containing 10^9 colony-forming units/mL of *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (*B. lactis*) HN019 were topically administered in the subgingival region of mandibular first molars on days 0, 3 and 7 of the experiment. In groups C and EP, topical administrations were performed using a *sham* suspension (without probiotic). All animals were euthanized 14 days after the beginning of the experiment. Gingival tissue, hemi-mandibles and oral biofilm were collected for evaluation of the following parameters: i) bacterial microbiota (checkerboard DNA-DNA hybridization), ii) expression of pro- and anti-inflammatory cytokines (Multiplex analysis), iii) immunoreactivity of antimicrobial peptides (immunohistochemical reactions - streptavidin-biotin-peroxydase); iV) connective tissue attachment levels (histomorphometric analysis) and v) bone microarchitecture and volume (microtomographic analysis). Data were statistically analyzed ($p < 0.05$). Group EP presented greater values of bone porosity, trabecular separation and connective tissue attachment loss as well as reduced trabecular number and bone volume when compared with all the other groups ($p < 0.05$). In group EP-HN019, there were greater percentages of bacteria of the yellow and blue complexes and greater expressions of Osteoprotegerin (OPG) and beta-defensins (BD)-1, BD-2 and BD-3 when compared with group EP ($p < 0.05$). Group EP presented greater levels of Interleukin (IL)-1 β and Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B ligand (RANKL) than group EP-HN019 ($p < 0.05$). The increase in the ratios RANKL/OPG and IL-1 β /IL-10 was greater in group EP than in group EP-HN019 ($p < 0.05$). Within the limits of the present study, it can be concluded that the topical use of *B. lactis* HN019 promotes a protective effect against alveolar bone and connective tissue attachment losses attributable to experimental periodontitis in rats.

Keywords: Periodontitis; Probiotics; Rats; *Bifidobacterium*.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	(A) Animal posicionado para a colocação da ligadura; (B) Fio de seda em posição para indução da doença periodontal no 1º molar inferior.....	48
Figura 2 -	Análise Histomorfométrica - imagem ilustrativa dos tecidos periodontais da região interproximal entre o 1º e 2º molares inferiores de animais com doença periodontal. A linha vermelha representa a medida linear (mm) do nível de inserção conjuntiva (NIC). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x. JCE = junção cimento-esmalte; IC = inserção conjuntiva; PMI = primeiro molar inferior; SMI = segundo molar inferior.....	55
Figura 3 -	Medidas lineares das distâncias (μm) entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar realizadas nos cortes microtomográficos visualizados no eixo transaxial (A - vestibular; B - lingual; C - interproximal) e no eixo sagital (D - bifurcação).....	56
Figura 4 -	Medidas volumétricas (μm^3) realizadas na região de bifurcação do primeiro molar inferior em cortes microtomográficos visualizados no eixo coronal. (A) a região de interesse a ser analisada (ROI) foi delimitada por um retângulo que tangenciava as quatro raízes do primeiro molar inferior. (B) as imagens foram binarizadas para separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (<i>grayscale threshold</i> 0-255).....	57
Figura 5 -	Percentual dos complexos microbianos e de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> presentes nas amostras de biofilme subgingival dos animais dos grupos DPT e DPT-HN019. (A) complexo amarelo; (B) complexo vermelho; (C) complexo laranja; (D) complexo roxo; (E) complexo azul; (F) complexo cinza; (G) complexo verde; (H) <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> . As cores representam os diferentes complexos microbianos (azul : <i>Actinomyces</i> ; amarelo : <i>Streptococcus</i> ; verde : <i>E. corrodens</i> , <i>C. gingivalis</i> , <i>C. sputigena</i> , <i>C. ochracea</i> ; roxo : <i>V. parvula</i> , <i>A. odontolyticus</i> ; laranja : <i>S. constellatus</i> , <i>C. gracillis</i> , <i>C. rectus</i> , <i>C. showae</i> , <i>E. nodatum</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. micros</i> , <i>F. nuc. vincentii</i> , <i>F. nuc. nucleatum</i> , <i>F. nuc. polymorphum</i> , <i>F. periodonticum</i> ; vermelho : <i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>T. denticola</i> ; cinza : <i>E. saburreum</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>L. buccalis</i> , <i>P. acnes</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>N. mucosa</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. noxia</i> , <i>T. socranskii</i>). * diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p < 0,05$).....	62
Figura 6 -	Níveis médios (pg/mL) e desvios-padrão de (A) IL-1 β , (B) IL-10, (D) RANKL e (E) OPG para os grupos CT, CT-HN019, DPT e DPT-HN019. Em C e F podem ser observadas as razões IL-1 β /IL-10 e RANKL/OPG para todos os grupos experimentais. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).....	63
Figura 7 -	Padrão de imunomarcagem para BD-1, BD-2 e BD-3 no periodonto de proteção e no periodonto de inserção do 1º molar inferior dos animais. Fotomicrografias evidenciando a imunomarcagem para BD-1 (A-E), BD-2 (F-J) e BD-3 (K-O), com imunomarcações detectadas em: queratinócitos (A, F e K), vasos sanguíneos gengivais (C, G, L), fibroblastos do ligamento periodontal (B e N) osteoblastos (D, I e O), osteócitos (E, J e M) e osteoclastos (H). Abreviações e símbolos: setas = células imunomarcadas; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo; TE = tecido epitelial; VS = vaso sanguíneo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: A, F, H, K e L = 2000x; B, C, D, E, G, I, J, M, N e O = 4000x.....	64

Figura 8 -	Padrão de imunomarcção para BD-1 (A, D, G e J), BD-2 (B, E, H e K) e BD-3 (C, F, I e L) na região de bifurcação do 1º molar inferior nos grupos CT (A-C), CT-HN019 (D-F), DPT (G-I), DPT-HN019 (J-L). Abreviações e símbolos: LP = ligamento periodontal; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original = 1000x.....	65
Figura 9 -	Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos dos escores atribuídos aos grupos CT, CT-HN019, DPT e DPT-HN019 na análise do padrão de imunomarcção para BD-1 (A), BD-2 (B) e BD-3 (C). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (Kruskal-Wallis, Dumn, $p < 0,05$).....	66
Figura 10 -	Tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º molar inferior dos grupos CT (A, B), CT-HN019 (C, D), DPT (E, F) e DPT-HN019 (G, H). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x (A, C, G, F); 20x (B, D, F, H). OA = osso alveolar; TF = teto da bifurcação; setas pretas = vasos sanguíneos; cabeça de seta preta preenchida = osteoblastos; asterisco = fibras colágenas desconexas com a presença de edema intersticial; cabeça de seta branca preenchida = cementoclastos; cabeça de seta não preenchida = fibras colágenas interpostas entre o osso alveolar e o cimento radicular.....	68
Figura 11 -	Tecidos periodontais na região interproximal entre o 1º e 2º molares inferiores dos animais dos grupos CT (A), CT-HN019 (B), DPT (C), DPT-HN019 (D). Aumento original = 20x. PMI = primeiro molar inferior; SMM = segundo molar inferior; Seta preta = junção cimento-esmalte; Seta branca = inserção conjuntiva.....	69
Figura 12 -	Médias e desvios-padrão do nível de inserção conjuntiva (NIC) para os grupos DPT e DPT-HN019, com comparações entre os grupos. *diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p < 0,05$).....	70
Figura 13 -	Médias e desvios-padrão do nível ósseo alveolar (NOA), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).....	71
Figura 14 -	Médias e desvios-padrão do volume ósseo (A) porosidade óssea (B), espaçamento trabecular (C) e número de trabéculas (D), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). VO = volume ósseo; PO = porosidade óssea; Tb.Sp = espaçamento trabecular; Tb.N = número de trabéculas.....	71
Figura 15 -	Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais dos grupos CT (A, B), CT-HN019 (C, D), DPT (E, F) e DPT-HN019 (G, H). Vista da superfície vestibular externa (A, C, E e G). Secção sagital da superfície interna (B, D, F e H). CTVox® (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do pixel = 7,96 µm.....	72

Lista de Tabela

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Relação das cepas bacterianas avaliadas pela técnica DNA-DNA Checkerboard Hybridization.....	50
-------------------	--	-----------

Lista de **A**breviaturas e **S**iglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μA	Microampere
μl	Microlitro
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>B. lactis</i>	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
BD	Beta-defensina(s)
C₄H₄O₄	Ácido maleico
CCI	Coefficiente de correlação intraclass
CEUA	Comissão de ética no uso de animal
cm	Centímetro
CO	Crista óssea alveolar
CO₂	Dióxido de carbono
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DP	Doença periodontal
EDTA	Ácido etilenodiamínio tetra-acético
et al	<i>et alia</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCG	Fluido crevicular gengival
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Gramma
GL	°Gay Lussac
H&E	Hematoxilina e Eosina
H₂	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
IL	Interleucina
JCE	Junção cimento-esmalte
Kg	Quilograma
Kv	Quilovolt
M	Molaridade
mg	Miligrama
micro-CT	Microtomografia computadorizada
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MMP	Meltoproteinase da matriz
ms	Milissegundo

N₂	Nitrogênio
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NAM	N-acetil murâmico
NaOH	Hidróxido de sódio
Ng	Nanograma
NIC	Nível de inserção conjuntiva
Nm	Nanômetro
NOA	Nível ósseo alveolar
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogênico
PO	Porosidade óssea
RANKL	Fator nuclear kappa-beta
RAR	Raspagem e alisamento radicular
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SP	São Paulo
SSC	Solução salina citratada
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Espaço trabecular
TIMP	Inibidor de metaloproteinase tecidual
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidades formadoras de colônias
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UNG	Universidade de Guarulhos
USP	Universidade de São Paulo
VO	Volume Ósseo
VOI	Volume de Interesse
µg	Micrograma
µm	Micrômetro

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
α	Alfa
<i>p</i>	Probabilidade de significância
<	Menor
®	Marca registrada
=	Igual
±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
<i>g</i>	Unidade de aceleração
n	Tamanho da amostra
+	Mais
x	Vezes
-	Menos

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -	Comitê de Ética.....	91
Anexo B -	Artigo científico submetido para publicação no periódico <i>Journal of Periodontology</i>	93

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	36
2 PROPOSIÇÃO	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Apreciação ética	46
3.2 Cálculo do tamanho da amostra	46
3.3 Modelo experimental	46
3.4 Preparo das culturas probióticas e administração aos animais	47
3.5 Indução da DP com ligadura	47
3.6 Eutanásia e coleta de material para análises	48
3.7 Avaliação microbiológica	49
3.7.1 <i>Cepas bacterianas e condições de crescimento</i>	49
3.7.2 <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	51
3.8 Análise imunoenzimática	52
3.9 Processamento histológico	53
3.10 Análise imunohistoquímica	53
3.11 Análise histomorfométrica	54
3.12 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT)	55
3.13 Variáveis de resultado	57
3.14 Análise estatística	58
5 RESULTADOS	60
4.1 Avaliação microbiológica	61
4.2 Análise imunoenzimática	63
4.3 Análise imunohistoquímica	64
4.4 Análise histomorfométrica	66
4.4.1 <i>Análise histopatológica</i>	66
4.4.2 <i>Análise histométrica</i>	69
4.5 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT)	70
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	80
ANEXOS	90

Introdução

A Doença Periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte dos dentes e pode levar à perda dentária, afetando grande parte da população. Em um levantamento epidemiológico realizado nos Estados Unidos, foi demonstrado que um em cada dois americanos com 30 anos de idade ou mais possui DP (EKE et al., 2012). Neste estudo, 47% da amostra examinada, representando 64,7 milhões de adultos, apresentava periodontite nas formas leve (8,7%), moderada (30%) e severa (8,5%). Para adultos com 65 anos de idade ou mais, o percentual de ocorrência de periodontite moderada ou severa foi de 64% (EKE et al., 2012).

O biofilme bacteriano é o fator etiológico primário para o início da inflamação gengival e subsequente destruição dos tecidos periodontais (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994). Entretanto, a presença isolada do biofilme responde por uma pequena proporção (20%) de variações na expressão da DP (GROSSI et al., 1994). De acordo com um novo modelo de patogênese, o principal componente de destruição de tecidos duros e moles na DP é resultado da ativação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro às agressões bacterianas (SALVI & LANG, 2005). Fatores de risco adquiridos e ambientais (ex.: diabetes mellitus, fumo e estresse), bem como algumas características geneticamente transmitidas (ex.: polimorfismos gênicos para a Interleucina [IL]-1) podem acentuar a resposta inflamatória decorrente da agressão bacteriana e, eventualmente, a suscetibilidade à DP (SALVI & LANG, 2005).

Raspagem e alisamento radicular (RAR) é a terapia de escolha pela maioria dos clínicos e amplamente considerada o “padrão-ouro” para o tratamento da periodontite (BEREZOW & DARVEAU, 2011). Contudo, o uso isolado da RAR não produz os resultados clínicos desejados em alguns casos severos de DP. Nestas situações, ocorre recolonização de patógenos e a recorrência da doença (BEREZOW & DARVEAU, 2011), o que remete o clínico ao uso da terapia antimicrobiana associada à RAR para um tratamento efetivo dos pacientes/sítios não responsivos ao tratamento convencional. Além disso, devido ao fato da resposta do hospedeiro também desempenhar um importante papel na progressão da doença, tratamentos supressores da inflamação, os chamados moduladores da resposta do hospedeiro, têm sido investigados (BEREZOW & DARVEAU, 2011). A possibilidade de modular a resposta do hospedeiro interferindo na expressão de citocinas pró-inflamatórias foi demonstrada em um estudo realizado por Assuma et al. (1998). Neste estudo, a injeção local de antagonistas de algumas IL pró-inflamatórias em dentes de primatas com periodontite induzida pela colocação de ligaduras infectadas com *Porphyromonas gingivalis* reduziu em 80% o recrutamento de células inflamatórias, em 67% a formação de osteoclastos e em 60% a perda óssea quando comparados com dentes controles que não receberam a injeção local dos

antagonistas (ASSUMA et al., 1998). Em síntese, o uso de quimioterapias adjuvantes no tratamento periodontal tem como objetivo tratar sítios que não respondem ao tratamento convencional ou potencializar resultados normalmente obtidos com a instrumentação mecânica, evitando, assim, a necessidade de procedimentos adicionais para a redução de bolsas periodontais (GREENSTEIN, 2006).

Considerando as limitações da RAR no tratamento da DP (BEREZOW & DARVEAU, 2011), a recolonização de bolsas periodontais após realização da RAR (QUIRYNEN et al., 2001) e a participação de vários mecanismos referentes ao sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro na patogênese da doença, o uso de probióticos como uma nova terapia adjuvante para a periodontite tem despertado o interesse da comunidade científica odontológica, desde que os mesmos podem modular a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e modificar o ambiente bacteriano.

A terapia probiótica pode proporcionar vantagens que não são observadas quando antibióticos e/ou antissépticos são associados à RAR (BEREZOW & DARVEAU, 2011), pois não promove resistência bacteriana e pode interferir naturalmente na resposta imunoinflamatória local e sistêmica do hospedeiro. Um estudo de “prova de conceito” demonstrou que uma mistura de espécies de *Streptococcus* aplicada em dentes de cães com periodontite, como uma terapia adjuvante à RAR, atrasou a recolonização de patógenos periodontais e reduziu a inflamação (TEUGHELIS et al., 2007).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, principalmente bactérias, seguros para o consumo e capazes de produzirem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades suficientes (FAO/WHO, 2002). O consumo de probióticos pode potencializar o sistema imune do hospedeiro, bem como agir na prevenção/tratamento de certas doenças e/ou incômodos em humanos, tais como diarreia devido à infecção com *Helicobacter pylori*, má digestão de lactose e síndrome do intestino irritável. Além disso, atuam na prevenção do câncer de cólon e de bexiga, no controle dos níveis de colesterol e da hipertensão arterial, na proteção contra infecções do trato urinário e respiratório e na supressão de alergias (OUWEHAND et al., 2003; AMROUCHE, 2005; COMMANE et al., 2005). Os probióticos são geralmente regulamentados como suplementos dietéticos e comercializados para melhorar ou manter a saúde (TSUBURA et al., 2009). Os principais microrganismos utilizados para fins probióticos são bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (TEUGHELIS et al., 2008).

A cavidade oral, apenas recentemente, tem sido sugerida como um alvo relevante para as aplicações dos probióticos (MEURMAN, 2005). Até agora, os probióticos foram

avaliados, principalmente, no controle da cárie dentária, podendo reduzir os níveis de *Streptococcus mutans* na saliva (AHOLA et al., 2002; CAGLAR et al., 2006; CAGLAR et al., 2008; NÄSE et al., 2001). Os mecanismos de ação dos probióticos na cavidade bucal parecem ser análogos àqueles descritos para o equilíbrio da microflora intestinal (HAUKIOJA, 2010). Estes mecanismos podem ser uma alternativa, não apenas para o controle da cárie dentária, mas também para o tratamento da DP. Os microrganismos utilizados para fins probióticos podem desencadear efeitos diretos sobre os patógenos periodontais, afetando seu crescimento, adesão e colonização (STAMATOVA & MEURMAN, 2009). Bactérias probióticas podem produzir diversos componentes que agem como agentes antimicrobianos, tais como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (GILLOR et al., 2008; GORDON, 2009; OELSCHLAEGGER, 2010). Sookkhee et al. (2001) isolaram bactérias produtoras de ácido láctico da cavidade oral de voluntários saudáveis tailandeses e demonstraram que as mesmas desenvolviam atividade antimicrobiana contra *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus mutans*. Van Hoogmoed et al. (2000) observaram que um biosurfactante produzido pelo *Streptococcus mitis* é capaz de diminuir a adesão de *Streptococcus mutans* e de vários periodontopatógenos.

Outro mecanismo sugerido para explicar a ação dos probióticos no tratamento da DP refere-se à modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro (STAMATOVA & MEURMAN, 2009). Alguns estudos têm demonstrado que algumas espécies probióticas podem atenuar a expressão de IL-8 induzida por periodontopatógenos nas células epiteliais orais (COSSEAU et al., 2008; ZHANG et al., 2008; SLIEPEN et al., 2009) e reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-1 β e Fator de Necrose Tumoral-alfa - TNF- α) no fluido crevicular gengival (FCG) (TWETMAN et al., 2009). Shimauchi et al. (2009) verificaram que o consumo de probióticos diminuiu significativamente os níveis de lactoferrina salivar, uma proteína indicativa de inflamação periodontal, em indivíduos altamente susceptíveis à periodontite. Staab et al. (2008) demonstraram que a ingestão de probióticos pode reduzir a atividade de elastase de polimorfonucleares, bem como os níveis de mieloperoxidase e metaloproteinase (MMP)-3 da matriz no FCG de indivíduos com gengivite. Szkaradkiewicz et al. (2014) verificaram que *Lactobacillus reuteri* pode reduzir os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-17 no FCG de pacientes com periodontite crônica. Novos estudos são fundamentais para investigar os efeitos imunoinflamatórios de probióticos nos tecidos periodontais. O estudo desses efeitos pode ser bastante útil para uma melhor compreensão da modulação da imunocompetência epitelial por bactérias não-patogênicas e seu papel na fisiologia de defesa da mucosa bucal. Talvez, em um futuro próximo, a terapia probiótica

possa ser utilizada com a finalidade de reduzir a suscetibilidade à periodontite por meio de uma programação seletiva do perfil imunoinflamatório do indivíduo ainda no ambiente intrauterino. Blumer et al. (2007) demonstraram que a suplementação probiótica durante o período pré-natal em camundongos pode interferir no desenvolvimento do sistema imune fetal, reduzindo, por exemplo, a ocorrência de alergias das vias aéreas após o nascimento.

Ainda há poucos estudos in vivo que avaliaram os efeitos de probióticos no controle da DP. De um modo geral, estes estudos, essencialmente clínicos, demonstraram que o uso de probióticos na perspectiva de prevenção, controle e tratamento da DP pode promover significativa redução de periodontopatógenos (TSUBURA et al., 2009; MAYANAGI et al., 2009; MAEKAWA et al., 2014), melhorar os parâmetros clínicos periodontais em indivíduos portadores de periodontite (RICCIA et al., 2007; SHIMAUCHI et al., 2008; TSUBURA et al., 2009; VICARIO et al., 2013, SZKARADKIEWICZ et al., 2014), reduzir os níveis salivares de prostaglandina E2 e MMP da matriz (RICCIA et al., 2007) e inibir o desenvolvimento da gengivite (KRASSE et al., 2006; STAAB et al., 2009).

Em cinco estudos clínicos foram relatados resultados positivos do efeito adjuvante da terapia probiótica à RAR no tratamento da DP (VIVEKANANDA et al., 2010; SHAH et al. 2013; TEUGHELIS et al., 2013; TEKCE et al., 2015; INCE et al. 2015). Vivekananda et al. (2010) avaliaram os efeitos de *Lactobacillus reuteri*, isoladamente e em combinação com RAR, em pacientes com periodontite crônica. Os autores concluíram que o uso de probióticos pode ser recomendado durante a terapia não-cirúrgica e na fase de manutenção do tratamento periodontal devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e inibitórios na formação da placa bacteriana. Esses resultados foram corroborados por Teughels et al. (2013), os quais demonstraram que o uso de *Lactobacillus reuteri* como adjuvante à RAR reduziu o risco de progressão da DP e o percentual de pacientes, dentes e sítios indicados para a terapia periodontal cirúrgica. Shah et al. (2013) avaliaram o efeito do probiótico *Lactobacillus brevis* e da doxiciclina, isoladamente ou em associação, no tratamento de pacientes com periodontite agressiva. Os autores concluíram que a terapia com probióticos pode ser uma boa alternativa para o uso de antibióticos no tratamento da periodontite agressiva. Ince et al. (2015) avaliaram os efeitos clínicos e bioquímicos resultantes do uso da terapia probiótica (*Lactobacillus reuteri*) adjuvante à RAR no tratamento de pacientes com periodontite crônica. A terapia combinada proporcionou maior redução de profundidade de sondagem e maior ganho de inserção clínica aos 12 meses pós-operatórios quando comparada ao uso da RAR apenas. Os pacientes tratados com a terapia combinada também apresentaram menores níveis de MMP-8 e aumento de inibidor de metaloproteinase tecidual (TIMP)-1 no FCG. Tekce et al. 2015

demonstraram que a utilização do *Lactobacillus reuteri* adjuvante à RAR pode retardar a recolonização de bolsas periodontais em pacientes com periodontite crônica.

Embora a literatura apresente resultados promissores, é importante considerar que os achados obtidos com probióticos não podem ser generalizados (TEUGHELIS et al., 2011), uma vez que eles são dependentes da cepa, dosagem, frequência e forma de administração usadas. Diferentemente dos resultados obtidos em estudos clínicos que utilizaram *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus brevis* (VIVEKANANDA et al., 2010; SHAH et al., 2013; TEUGHELIS et al., 2013; TEKCE et al., 2015; INCE et al., 2015), não foram observadas vantagens clínicas decorrentes do uso de *Lactobacillus rhamnosus* e bactérias do gênero *Streptococcus* como adjuvante à RAR no tratamento de pacientes com periodontite crônica (LALEMAN et al., 2015; MORALES et al., 2016).

Até o presente momento, os estudos que investigaram os efeitos de probióticos na DP usaram principalmente microrganismos do gênero *Lactobacillus*. Contudo, outros potenciais probióticos merecem ser investigados. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) possui diversos habitats, como o intestino humano, a cavidade bucal e o trato gastrointestinal animal (DONG et al., 2000). Esse microrganismo faz parte da microbiota humana e possui uma relação simbiótica com o hospedeiro, sendo capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*, *Escherichia coli* e outras bactérias patogênicas (BIAVATI et al., 2000). *B. lactis*, originado de lácteos, é considerado um probiótico em potencial e tem a capacidade de resistir à ação da bile e a pH bem ácidos (PRASAD et al., 1998). Essa estirpe também é capaz de aderir-se em quantidade elevada em diferentes tipos de células do epitélio intestinal (GOPAL et al., 2001) e apresenta propriedades imunomoduladoras (GILL et al., 2000). Estudos desenvolvidos em humanos mostraram que *B. lactis* foi capaz de melhorar a resposta imune inata de indivíduos idosos e de meia-idade (GILL et al., 2001), proporcionou um aumento na atividade citotóxica das células *Natural Killer* e na atividade fagocítica dos monócitos periféricos (ZHOU & GILL, 2005), diminuiu a deficiência em ferro em crianças pré-escolares (SAZAWAL et al., 2010) e promoveu a proteção dos enterócitos frente a uma infecção aguda (LIU et al., 2010). Shu et al. (2000) demonstraram que 80% dos ratos tratados com *B. lactis* diariamente durante uma semana permaneceram vivos por três semanas após serem infectados com *Salmonella typhimurium*. Nos animais que não consumiram o probiótico, a taxa de mortalidade foi de 93% (SHU et al., 2000).

Alguns estudos demonstraram também que *B. lactis* pode reduzir a quantidade de biofilme bacteriano nas superfícies dentárias e a inflamação gengival em indivíduos jovens saudáveis (TOIVIAINEN et al., 2014), bem como a quantidade de microrganismos associados

à cárie dentária em crianças (SINGH et al., 2011) e adultos jovens (ÇAGLAR et al., 2008). Haukioja et al. (2006) demonstraram, em um estudo in vitro, que *B. lactis* sobrevive na saliva e pode ligar-se ao *Fusobacterium nucleatum* em superfícies de hidroxiapatita. Bogsan et al. (2014) investigaram os efeitos da ingestão do probiótico *B. lactis* HN019 no perfil imunológico celular dos intestinos delgado e grosso de camundongos. As análises com citometria de fluxo demonstraram que a ingestão de *B. lactis* HN019 promove redução na quantidade de linfócitos B-1. Este fato sugere que esta cepa probiótica pode ser bastante útil na modulação da resposta do hospedeiro para o tratamento da DP. A presença aumentada de células B-1 em indivíduos com periodontite pode ser um dos fatores responsáveis pela maior destruição óssea (BERGLUNDH et al., 2002). Células B-1 podem se diferenciar em células semelhantes a osteoclastos, exercendo, portanto, um importante papel na osteoclastogênese e na reabsorção óssea (BOGSAN et al., 2005; PUGLIESE et al., 2012).

Estudos pré-clínicos validados, tais como o uso de modelos animais com periodontite experimental, podem proporcionar novos dados importantes sobre a segurança e eficácia de probióticos (HOFFMAN et al., 2008), especialmente quando novas cepas estão sendo investigadas para o tratamento periodontal. Até o presente momento, não há nenhum estudo na literatura que tenha avaliado os efeitos de bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium* na periodontite.

Proposição

Objetivo geral

- ✓ Avaliar os efeitos da administração tópica do probiótico *B. lactis* HN019 na DP induzida por ligadura em ratos.

Objetivos específicos

Avaliar em ratos, com ou sem DP induzida por ligadura, tratados ou não com *B. lactis* HN019:

- ✓ Microbiota presente em amostras de biofilme bucal por meio do método *checkerboard DNA-DNA hybridization*;
- ✓ Expressão de IL-1 β , IL-10, ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-beta (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG) por meio de imunoensaios enzimáticos (MAGPIX[®]);
- ✓ Expressão de Beta-defensina (BD)-1, BD-2 e BD-3 nos tecidos periodontais por meio de reações imunohistoquímicas;
- ✓ Perda óssea alveolar por meio de análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT);
- ✓ Nível de inserção conjuntiva na região interproximal entre o 1^o e 2^o molares inferiores por meio de análise histométrica;
- ✓ Conteúdo do infiltrado inflamatório periodontal, extensão da inflamação, padrão do tecido conjuntivo e perfil do osso alveolar presente na região de bifurcação do 1^o molar inferior por meio de análise histopatológica.

Materiais e Métodos

3.1 Apreciação ética

A pesquisa foi realizada respeitando-se os princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos (Lei 11.794/2008), a Declaração Universal dos Direitos dos Animais da UNESCO (Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e a legislação em vigor (Lei 9605/1998). Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo 2014.1.389.58.2).

3.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra foi determinado para assegurar poder estatístico de 80% no reconhecimento de diferenças significativas entre os grupos em torno de 20% e desvio-padrão de 15% com um intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), considerando as mudanças microtomográficas no volume ósseo (VO) da região de bifurcação do 1º molar inferior como variável primária de resultado. Dessa forma, chegou-se a um tamanho amostral adequado de 8 animais por grupo experimental.

3.3 Modelo experimental

Foram utilizados 32 ratos, machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), com idade entre 1 e 2 meses, pesando entre 250 e 300g (Biotério da FORP-USP). Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno autoclaváveis e submetidos a um período de 7 dias de aclimação com o ambiente e com equipe de execução do projeto. A sala foi climatizada a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Antes do estudo começar, os ratos foram identificados por um código numérico. De acordo com uma tabela numérica gerada com uso de um *software* em computador, cada rato foi alocado em um dos seguintes grupos (n=8): Grupo CT (controle); Grupo CT-HN019 (controle + *B. lactis* HN019); Grupo DPT (DP induzida por ligadura) e Grupo DPT-HN019 (DP induzida por ligadura + *B. lactis* HN019). A sequência de alocação foi mantida oculta para todos os investigadores do estudo (operadores, avaliadores de resultados e bioestatístico). Todas as análises foram então realizadas por examinadores calibrados que desconheciam os grupos experimentais do presente estudo.

3.4 Preparo das culturas probióticas e administração aos animais

B. lactis HN019 (HOWARUTM Bifido, E. I. Dupont® de Nemours and Company, Wilmington, DE, EUA) foi cultivado em meio MRS Agar (Man, Rogosa and Sharpe - Difco™ *Lactobacilli* MRS Broth, Sparks, MD, EUA) por 48 horas a 37°C sob condições de anaerobiose (GASPAK™ EZ Anaerobe Container System with indicator, Sparks, MD, EUA). A seguir, com auxílio de alça esterilizada, o inóculo bacteriano foi transferido para tubos de centrifugação tipo Falcon contendo pérolas de vidro e água destilada esterilizada. Após homogeneização em agitador de tubos (Phoenix AP 65, Araraquara, SP, Brasil), a suspensão foi submetida à diluição decimal seriada até 10^{-9} , em solução salina tamponada fosfatada (PBS), com pH 7,0 e acrescida de 2,0% de carboximetilcelulose (CHITPRASERT et al., 2012). Alíquotas de 100 µl foram depositadas em placas de Petri contendo MRS Agar e semeadas com auxílio de bastão de vidro esterilizado. Após a semeadura, as placas foram incubadas em anaerobiose, durante 48 horas a 37°C. A padronização quantitativa dos inóculos foi obtida pela determinação da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Micronal - AJX -1000, São Paulo, SP, Brasil), bem como por contagem, em duplicata, do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Desta forma, a DO de 2,898 correspondeu ao inóculo padronizado com $1,9 \times 10^9$ UFC/mL (BAUROEL et al., 2012).

Nos Grupos CT-HN019 e DPT-HN019, 2 mL da suspensão contendo $1,9 \times 10^9$ UFC/mL de *B. lactis* HN019 foram aplicados topicamente na região subgengival dos primeiros molares inferiores dos animais nos dias 0, 3 e 7 do experimento. Nos grupos CT e DPT, as aplicações tópicas foram realizadas com uma suspensão *sham* (sem *B. lactis* HN019).

3.5 Indução da DP com ligadura

No dia 0 do experimento, para a colocação da ligadura nos grupos DPT e DPT-HN019, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal, com solução de Cloridrato de Xilazina a 2% (2mg/mL) (Rompum® - Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Ketamina a 10% (10mg/mL) (Dopalen® - Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil) nas respectivas doses de 10 mg/Kg (Xilazina) e 80 mg/Kg (Ketamina). Após a anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos mesmos, facilitando o acesso aos dentes posteriores da mandíbula. Com o auxílio de porta agulha tipo castroviejo (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil) e sonda exploradora odontopediátrica (Golgran, São Paulo, SP, Brasil), foi colocado um fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) ao redor dos

primeiros molares inferiores esquerdo e direito de cada animal (Figura 1). A presença das ligaduras nos animais foi verificada periodicamente. Caso fosse observado perda da ligadura, um novo animal era preparado para o estudo.

Figura 1 - (A) Animal posicionado para a colocação da ligadura; (B) Fio de seda em posição para indução da doença periodontal no 1º molar inferior.

3.6 Eutanásia e coleta de material para análises

Todos os animais foram submetidos à eutanásia 14 dias após início do experimento. A eutanásia foi realizada pela administração de uma dose letal (150 mg/kg) de tiopentato de sódio (Thiopentax[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

O tecido gengival das hemi-mandíbulas direitas foi removido para realização de imunoenaios enzimáticos. Com bisturi estéril, a gengiva foi removida da região vestibular e lingual dos 1º molar inferior de cada animal. Os tecidos gengivais coletados foram lavados em solução PBS associada a um coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Em seguida, os tecidos foram imersos em nitrogênio líquido e macerados manualmente com gral e pistilo. Os tecidos macerados foram novamente colocados em solução PBS associada a inibidores de proteases e homogeneizados mecanicamente (Ultra-Stirrer ULTRA 80-II, Eikonal do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi coletado e armazenado a -80°C. Estas mesmas hemi-mandíbulas, cujo tecido gengival foi removido, foram analisadas por meio de micro-CT. As hemi-mandíbulas esquerdas, cujo tecido gengival não foi removido, foram submetidas às análises histomorfométrica e imunohistoquímica.

Logo após a eutanásia dos animais, foram coletadas, também, amostras de biofilme bacteriano. Nos grupos CT e CT-HN019, amostras de biofilme subgengival foram coletadas com uma cureta periodontal estéril (5-6, Mine-five - Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA). Nos

grupos DPT e DPT-HN019, o biofilme foi coletado juntamente com as ligaduras posicionadas ao redor dos 1^{os} molares inferiores. Todas as amostras coletadas foram imediatamente depositadas em frascos esterilizados do tipo *ependorf* contendo 150µL de solução tampão (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6 – solução TE). Foram adicionados a esta solução 100 µL de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Os *ependorfs*, previamente identificados com o código do animal, foram armazenados sob refrigeração a -20°C para posterior análise microbiológica.

3.7 Avaliação microbiológica

Contagens de 40 espécies bacterianas subgingivais foram determinadas em cada amostra usando o método *checkerboard DNA-DNA hybridization* no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da Universidade de Guarulhos (Universidade de Guarulhos – UNG, Guarulhos, SP, Brasil), conforme descrição de Sampaio et al. (2009):

3.7.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA) ou do *Forsyth Institute* (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *Tannerella forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrilado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). *Porphyromonas gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrilado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivadas em caldo para crescimento de *Mycoplasma* suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das duas espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias.

As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrífuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação na solução tampão de TE a 3500 g por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com dodecilsulfato de sódio (SDS - C₁₂H₂₅NaO₄S, Synth[®], Labsynth, Diadema, SP, Brasil) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150 µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *kit Random primer digoxigenin labeling* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA). As espécies avaliadas (Tabela 1) foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal.

Tabela 1 - Relação das cepas bacterianas avaliadas pela técnica DNA-DNA Checkerboard Hybridization.

Complexo Azul	Complexo Roxo	Complexo Amarelo	Complexo Verde
<i>A. gerencseriae</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>S. mitis</i>	<i>C. gingivalis</i>
<i>A. israelii</i>	<i>V. parvula</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>C. sputigena</i>
<i>A. naeslundii</i>		<i>S. sanguinis</i>	<i>C. ochracea</i>
<i>A. viscosus</i>		<i>S. gordonii</i>	<i>C. concisus</i>
		<i>S. oralis</i>	<i>E. corrodens</i>
			<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Complexo Laranja	Complexo Vermelho	Não orais	
<i>C. gracilis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>E. saburreum</i>	
<i>C. rectus</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>G. mobillorum</i>	
<i>C. showane</i>	<i>T. denticola</i>	<i>L. buccalis</i>	
<i>E. nodatum</i>		<i>P. acnes</i>	
<i>F. Nucleatum</i>		<i>P. melaninogenica</i>	
<i>F. nuc ss. polymorphun</i>		<i>N. mucosa</i>	
<i>F. nuc ss. vicentii</i>		<i>S. anginosus</i>	
<i>F. periodonticum</i>		<i>S. noxia</i>	
<i>P. micros</i>		<i>T. socranskii</i>	
<i>P. intermedia</i>			
<i>P. nigrescens</i>			
<i>S. constellatus</i>			

3.7.2 Checkerboard DNA-DNA Hybridization

As suspensões de biofilme subgingival foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônio a 5 M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1 g e 10 g de DNA de cada espécie, respectivamente. A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C , por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% de caseína (Vetec), 5 vezes de solução salina citratada (SSC) (1 vez de SSC = 150mM NaCl - Vetec), 15 M de citrato de sódio – pH 7,0 (J.T.Baker, Estado do México, México), 25 mM de fosfato de sódio – pH 6,5 (Na_2HPO_4 , Labsynth) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 g/mL, em 130 μL de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 vezes de SSC, 20 mM de Na_2HPO_4 (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% de caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C .

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1 mM de EDTA e 20 mM de Na_2HPO_4 , a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, Vetec), 3 M NaCl, 0,2 M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína - pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada duas vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20 - pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl, pH 9,5.

Para a detecção dos sinais, a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection Reagent (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado e calibrado (Izilvânia Barros, Universidade de Guarulhos – UNG) que desconhecia os grupos experimentais e terapias utilizadas no presente estudo. A leitura foi realizada duas vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas duas linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias (duas últimas das 30 canaletas do *Minislot*). Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a 10^5 células; 3 entre 10^5 e 10^6 células; 4 a aproximadamente 10^6 células; e 5 equivaleu a mais de 10^6 células. Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas. Um total de 32 amostras foi analisado.

3.8 Análise imunoenzimática

Foi determinado o valor de proteína total de cada amostra por meio de imunoenaios enzimáticos convencionais (ELISA), utilizando-se *kits* comercialmente disponíveis (DC™ Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A leitura colorimétrica foi realizada através de um espectrofotômetro a 650 nm (TP-Reader, ThermoPlate®, São Paulo, SP, Brasil) e os valores foram expressos em ng/dL.

Para quantificação de citocinas (IL-1β, IL-10, RANKL e OPG), utilizou-se *kits* disponíveis comercialmente (RECYTMAG-65K-05, RBN-31K-1RANKL, RBN-31K-1OPG – Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em um analisador MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a placa filtro foi umedecida com o *washing buffer* e, em seguida, a solução foi aspirada dos poços. *Beads* magnéticos revestidos com os anticorpos monoclonais para os quatro analitos (IL-1β, IL-10, RANKL e OPG) foram adicionados aos poços. As amostras e padrões (variando de 0,13 a 2000 pg/mL para cada analito) foram transferidas para os poços e incubadas *overnight* 4°C. Os poços foram lavados novamente e uma mistura de anticorpos secundários biotinizados foi adicionada. Após a incubação por uma hora, adicionou-se aos poços a Estreptavidina R-

ficoeritrina, sendo este conjunto incubado por mais uma hora. Após lavagem para a remoção de reagentes não-ligados, foi acionado *sheath fluid* (Luminexs, MiraiBio, Alameda, CA, EUA) aos poços. As placas foram, então, analisadas pelo MAGPIX[®], obtendo-se a intensidade de fluorescência média. Amostras abaixo do limite de detecção foram registradas como zero. Todas as amostras foram analisadas individualmente e os níveis de citocinas foram estimados a partir de uma curva polinomial de quinto grau utilizando-se o software xPONENT[®] (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). Um total de 128 amostras foi analisado.

3.9 Processamento histológico

As hemi-mandíbulas esquerdas foram dissecadas, fixadas em formol neutro a 10% por 48 horas e descalcificadas por meio de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético a 4% durante 90 dias. Após este período, as peças foram desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados, então, cortes seriados com 4 µm de espessura, no plano méso-distal. Os cortes obtidos foram destinados às análises imunohistoquímica e histomorfométrica.

3.10 Análise imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato, pH 6 (Spring Bioscience[®], Pleasanton, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber[®], Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunohistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em três lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-BD-1 de rato gerado em coelho (1:200; SC-25573, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-BD-2 do rato gerado em coelho (1:200; orb-10531, Biorbyt, Cambridge, Cambs, Reino Unido) e anti-BD-3 do rato gerado em cabra (1:100; SC-10860, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2 horas e, subsequentemente, tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit[®], Dako Laboratories,

CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Em seguida, foi efetuada desidratação em etanol, diafanização em xilol e recobrimento com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, EUA) e lâminulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (AxioLab, Carl Zeiss, Germany). A imunomarcção foi definida como coloração acastanhada confinada ao compartimento citossólico das células imunorreativas. A matriz extracelular também exibiu discreta imunomarcção. Um examinador calibrado (Edilson Ervolino, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP) que desconhecia os grupos experimentais do estudo executou a análise imunoistoquímica empregando uma secção histológica de cada espécime. Foram analisadas três regiões: região mesial do 1º molar inferior, região interproximal entre o 1º e 2º molares inferiores e região de bifurcação do 1º molar inferior. Nas três regiões, em um aumento de 400x, foram analisadas áreas de 600 x 800 µm, cujo limite coronal era o tecido epitelial (regiões mesial e interproximal) ou o teto da bifurcação (região de bifurcação). Foi realizada uma análise semi-quantitativa do padrão de imunomarcção conforme os seguintes escores: ESCORE 0 - padrão nulo de imunomarcção nas três regiões; ESCORE 1 - baixo padrão de imunomarcção (até um terço das áreas analisadas apresentando imunorreatividade); ESCORE 2 - moderado padrão de imunomarcção (aproximadamente dois terços das áreas analisadas apresentando imunorreatividade) e ESCORE 3 - alto padrão de imunomarcção (quase toda a extensão das áreas analisadas apresentando imunorreatividade). O grupo controle foi empregado como ponto de referência para se definir o padrão basal de imunorreatividade, a partir do qual os escores foram atribuídos aos demais grupos experimentais.

3.11 Análise histomorfométrica

Dois cortes histológicos de cada espécime, representando a porção vestibulo-lingual central da hemi-mandíbula, foram corados utilizando a técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E). Com auxílio de microscopia de luz, foram analisadas as condições histopatológicas dos tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º molar inferior, considerando: conteúdo do infiltrado inflamatório periodontal, extensão da inflamação, padrão do tecido conjuntivo e perfil do osso alveolar presente.

Para análise histométrica, as imagens dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz. Mensurações padronizadas foram

determinadas com o auxílio de um sistema de análise de imagens digitalizadas e *software* específico (ImageLab 2000, Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) por um examinador calibrado (Luiz Fernando Oliveira, FORP, USP) sem identificação dos grupos experimentais avaliados. Foram realizadas, na raiz distal do 1º molar inferior, medidas lineares para avaliar o nível de inserção conjuntiva (NIC), o qual foi calculado mensurando-se em mm a distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a inserção conjuntiva (Figura 2). Para cada animal, foi obtida uma média dos valores dos dois cortes analisados.

Figura 2 - Análise Histomorfométrica - imagem ilustrativa dos tecidos periodontais da região interproximal entre o 1º e 2º molares inferiores de animais com doença periodontal. A linha vermelha representa a medida linear (mm) do nível de inserção conjuntiva (NIC). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x. JCE = junção cimento-esmalte; IC = inserção conjuntiva; PMI = primeiro molar inferior; SMI = segundo molar inferior.

3.12 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT)

Espécimes não desmineralizadas foram escaneados por um sistema de micro-CT de feixe cônico (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raio-X foi operado com um potencial de aceleração de 60 kV, corrente de 165 µA e tempo de exposição de 650 ms por projeção. As imagens foram produzidas com um tamanho de *voxel* de 6x6x6 µm.

Usando um *software* apropriado (Data Viewer®, versão 1.5.0, Bruker, Kontich, Bélgica), os 3 modelos tridimensionais gerados foram rotacionados em uma posição padrão, com os seguintes critérios: (1) no plano transaxial, o 1º molar inferior teve o seu eixo em

posição vertical, (2) no plano coronal, o osso mandibular foi verticalmente orientado, com a raiz mesial do 1º molar inferior na posição superior da imagem e (3) no plano sagital, a superfície oclusal do 1º molar inferior foi horizontalmente posicionada. Medidas lineares foram realizadas em quatro locais diferentes por um examinador calibrado (Laura Novaes, FORP, USP) sem identificação dos grupos experimentais avaliados: vestibular, lingual, interproximais e bifurcação. Para sítios vestibulares, linguais e interproximais, foram mensuradas as distâncias lineares (μm) da JCE à crista óssea alveolar (CO) (LISBOA et al. 2015). Para os sítios interproximais, os dados foram analisados utilizando *software* CT-Analyser® (CT-Analyser®, versão 1.13.5.1+, Bruker, Kontich, Bélgica). Na região de bifurcação, foi mensurada a distância (μm) entre o centro do teto da bifurcação e a CO. As quatro medidas lineares obtidas em cada animal foram somadas para expressar o valor do nível ósseo alveolar (NOA) (Figura 3).

Figura 3 - Medidas lineares das distâncias (μm) entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar realizadas nos cortes microtomográficos visualizados no eixo transaxial (A - vestibular; B - lingual; C - interproximal) e no eixo sagital (D - bifurcação).

As análises volumétricas foram realizadas com o *software* CT-Analyser® na região de bifurcação do 1º molar inferior. As imagens foram visualizadas no eixo coronal e o intervalo de cortes analisados seguiu os seguintes parâmetros: i) utilizou-se como ponto de

partida para a análise o corte microtomográfico no qual as quatro raízes do 1º molar inferior estavam completamente separadas; ii) o corte microtomográfico final foi determinado como aquele em que não era possível visualizar mais o osso inter-radicular na região de bifurcação do 1º molar inferior. O retângulo foi a figura geométrica escolhida para representar a região de interesse a ser analisada. Esta forma geométrica foi adequada por interpolação à área a ser medida e posterior determinação do volume de interesse (VOI) (Figura 4). Em seguida, procedeu-se a binarização da imagem para a separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (limite inferior - 65 e limite superior - 255; *grayscale threshold* 0-255). Este padrão de binarização foi usado para todas as amostras. Os seguintes parâmetros foram determinados na análise volumétrica: a) VO: percentual do VOI preenchido com tecido ósseo; b) Porosidade Óssea (PO): percentual de porosidades presentes no tecido ósseo determinado no VOI; c) Número de trabéculas (Tb.N): número (mm^{-1}) de trabéculas ósseas presentes no VOI; d) Espaçamento trabecular (Tb.Sp): total de espaços (mm) entre as trabéculas ósseas presentes no VOI.

Reconstruções renderizadas das secções microtomográficas foram também obtidas para os grupos CT, CT-HN019, DPT e DPT-HN019 utilizando o *software* CTVox® (CTVox®, versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica).

Figura 4 - Medidas volumétricas (μm^3) realizadas na região de bifurcação do primeiro molar inferior em cortes microtomográficos visualizados no eixo coronal. (A) a região de interesse a ser analisada (ROI) foi delimitada por um retângulo que tangenciava as quatro raízes do primeiro molar inferior. (B) as imagens foram binarizadas para separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (*grayscale threshold* 0-255).

3.13 Variáveis de resultado

Foi definida como variável primária deste estudo as diferenças entre os grupos obtidas na análise microtomográfica de VO. Os demais parâmetros microtomográficos (NOA,

PO, Tb.N, Tb.Sp), histomorfométrico, microbiológicos, imunoenzimáticos e imunohistoquímicos analisados foram definidos como variáveis secundárias.

3.14 Análise estatística

As análises foram realizadas com o *software* Bioestat (BioEstat, Versão 5.3. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brazil). O animal foi considerado como a unidade estatística ($n = 32$). Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram agrupados e apresentados como médias e desvios-padrão (variáveis contínuas) ou medianas, desvios interquartílicos e valores máximos e mínimos (variáveis ordinais). A distribuição dos dados foi verificada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos para análises das diferenças intergrupos. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados com distribuição não normal.

Todas as avaliações histométricas, imunohistoquímicas, microbiológicas e microtomográficas foram realizadas por examinadores calibrados. Para calibração dos examinadores um terço da amostra foi avaliada em dois períodos de tempo com um intervalo de 48 horas. O coeficiente de correlação intraclassa (CCI) foi utilizado para determinar a reprodutibilidade dos examinadores nas duas avaliações realizadas. Valores de CCI maiores que 90% foram considerados para assegurar a calibração dos examinadores.

A significância das diferenças entre os grupos para NIC, NOA, VO, PO, Tb.N, Tb.Sp foi determinada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Para análise dos dados imunohistoquímicos referentes ao padrão de imunomarcagem para BD-1, BD-2 e BD-3, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn.

Na análise dos dados obtidos na avaliação imunoenzimática, os valores de proteína total foram convertidos em pg/mL. Os níveis finais das citocinas analisadas foram obtidos pela razão entre os valores inicialmente obtidos com sistema MAGPIX® e os valores de proteína total convertidos em pg/mL. Em cada animal, foi calculada a média e o desvio-padrão dos níveis de IL-1 β , IL-10, RANKL e OPG (pg/mL) nos diferentes grupos (CT, CT-HN019, DPT e DPT-HN019). Foram calculadas também as razões IL-1 β /IL-10 e RANKL/OPG para cada grupo experimental. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada pela ANOVA seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Na análise dos dados obtidos na avaliação microbiológica, os níveis de cada espécie bacteriana testada foram calculados pela transformação dos escores obtidos na leitura dos

filmes radiográficos após a realização do *checkerboard DNA-DNA hybridization* em valores absolutos: escore 1 = 10.000 células; escore 2 = 100.000 células; escore 3 = 500.000 células; escore 4 = 1.000.000 células e escore 5 = 10.000.000 células. Em cada animal, foi calculada a média das contagens bacterianas ($\times 10^5$). Foi calculada, então, a contagem média de cada espécie nos diferentes grupos (CT, CT-HN019, DPT e DPT-HN019). Os dados foram, posteriormente, agrupados em complexos, os quais foram descritos por Socransky et al. (1998), sendo calculadas as frequências relativas médias dos complexos bacterianos presentes em cada grupo experimental. As diferenças intergrupos foram avaliadas pelo Teste t.

Resultados

4.1 Avaliação microbiológica

Nos grupos CT e CT-HN019, não foi possível nenhuma detecção bacteriana utilizando o *checkerboard DNA-DNA hybridization*. A explicação para isso está na sensibilidade do método utilizado frente à baixa quantidade de biofilme presente nesses animais sem ligadura. O nível mínimo de detecção do *checkerboard DNA-DNA hybridization* é 10^4 células.

A Figura 5 apresenta os percentuais das contagens totais de espécies bacterianas agrupadas em complexos e de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* para os grupos DPT e DPT-HN019. Considerando os percentuais dos complexos bacterianos laranja, vermelho, verde, roxo e de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos DPT e DPT-HN019. No Grupo DPT-HN019, foram observados percentuais dos complexos amarelo, azul e cinza significativamente maiores quando comparados àqueles do Grupo DPT.

Figura 5 - Percentual dos complexos microbianos e de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* presentes nas amostras de biofilme subgengival dos animais dos grupos DPT e DPT-HN019. (A) complexo amarelo; (B) complexo vermelho; (C) complexo laranja; (D) complexo roxo; (E) complexo azul; (F) complexo cinza; (G) complexo verde; (H) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. As cores representam os diferentes complexos microbianos (azul: *Actinomyces*; amarelo: *Streptococcus*; verde: *E. corrodens*, *C. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. ochracea*; roxo: *V. parvula*, *A. odontolyticus*; laranja: *S. constellatus*, *C. gracillis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. micros*, *F. nuc. vincentii*, *F. nuc. nucleatum*, *F. nuc. polymorphum*, *F. periodonticum*; vermelho: *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*; cinza: *E. saburreum*, *G. morbillorum*, *L. buccalis*, *P. acnes*, *P. melaninogenica*, *N. mucosa*, *S. anginosus*, *S. noxia*, *T. socranskii*). * diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p < 0,05$).

4.2 Análise imunoenzimática

Os níveis de IL-1 β , IL-10, RANKL, OPG, razão IL-1 β /IL-10 e razão RANKL/OPG estão apresentados na Figura 6, bem como os resultados das comparações entre os grupos.

O Grupo DPT apresentou níveis de IL-1 β (Figura 6; A) e RANKL (Figura 6; D) significativamente maiores que aqueles dos grupos CT, CT-HN019 e DPT-HN019 ($p < 0,05$). Em relação aos níveis de IL-10 (Figura 6; B), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos DPT-HN019 e DPT. Os níveis de OPG mantiveram-se significativamente maiores no grupo DPT-HN019 quando comparado aos grupos CT, CT-HN019 e DPT ($p < 0,05$) (Figura 6; E).

Considerando as razões IL-1 β /IL-10 (Figura 6; C) e RANKL/OPG (Figura 6; F), o Grupo DPT-HN019 apresentou valores significativamente menores quando comparado ao Grupo DPT ($p < 0,05$).

Figura 6 - Níveis médios (pg/mL) e desvios-padrão de (A) IL-1 β , (B) IL-10, (D) RANKL e (E) OPG para os grupos CT, CT-HN019, DPT e DPT-HN019. Em C e F podem ser observadas as razões IL-1 β /IL-10 e RANKL/OPG para todos os grupos experimentais. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.3 Análise imunohistoquímica

As BD foram detectadas em células do periodonto de proteção e do periodonto de inserção. Houve variação qualitativa e quantitativa na imunorreatividade para BD-1 (Figura 7; A-E), BD-2 (Figura 7; F-J) e BD-3 (Figura 7; K-O) nos diferentes grupos experimentais. De forma geral, a imunorreatividade para BD-1, BD-2 e BD-3 foi detectada em queratinócitos (Figura 7; A, F e K), fibroblastos gengivais, vasos sanguíneos gengivais (Figura 7; C, G e L), osteoblastos (Figura 7; D, I e O) e osteócitos (Figura 7; E, J e M). Imunorreatividade foi também detectada em fibroblastos do ligamento periodontal para BD-1 e BD-3 (Figura 7; B e N) e em osteoclastos para BD-2 (Figura 7; H).

Figura 7 - Padrão de imunomarcção para BD-1, BD-2 e BD-3 no periodonto de proteção e no periodonto de inserção do 1º molar inferior dos animais. Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção para BD-1 (A-E), BD-2 (F-J) e BD-3 (K-O), com imunomarcações detectadas em: queratinócitos (A, F e K), vasos sanguíneos gengivais (C, G, L), fibroblastos do ligamento periodontal (B e N) osteoblastos (D, I e O), osteócitos (E, J e M) e osteoclastos (H). Abreviações e símbolos: setas = células imunomarcadas; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo; TE = tecido epitelial; VS = vaso sanguíneo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: A, F, H, K e L = 2000x; B, C, D, E, G, I, J, M, N e O = 4000x.

Na figura 8, pode ser observado o padrão de imunomarcção para BD-1 (A, D, G e J), BD-2 (B, E, H e K) e BD-3 (C, F, I e L) no periodonto de inserção do primeiro molar inferior para os grupos CT (A-C), CT-HN019 (D-F), DPT (G-I) e DPT-HN019 (J-L). O Grupo DPT apresentou padrão de imunomarcção significativamente menor para BD-1, BD-2 e BD-3 quando comparado ao grupo DPT-HN019 (Figura 9).

Figura 8 - Padrão de imunomarcção para BD-1 (A, D, G e J), BD-2 (B, E, H e K) e BD-3 (C, F, I e L) na região de bifurcação do 1º molar inferior nos grupos CT (A-C), CT-HN019 (D-F), DPT (G-I), DPT-HN019 (J-L). Abreviações e símbolos: LP = ligamento periodontal; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original = 1000x.

Figura 9 - Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos dos escores atribuídos aos grupos CT, CT-HN019, DPT e DPT-HN019 na análise do padrão de imunomarcção para BD-1 (A), BD-2 (B) e BD-3 (C). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0,05$).

4.4 Análise histomorfométrica

4.4.1 Análise histopatológica

Os grupos CT e CT-HN019 apresentaram ligamento periodontal dentro dos padrões de normalidade, com grande quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e discreto infiltrado inflamatório. As fibras colágenas encontravam-se interpostas e estavam inseridas no cimento e osso alveolar (Figura 10; A-D). O tecido ósseo na região de bifurcação, rico em osteócitos, apresentou crista regular com aposição de osteoblastos (Figura 10; A-D). Na região interproximal, entre o 1º e 2º molar, foram observados epitélios juncional e sulcular íntegros (Figura 11; A e B).

O grupo DPT apresentou tecido conjuntivo com poucos fibroblastos, fibras colágenas desorganizadas e desconexas com a presença de edema intersticial e moderado infiltrado inflamatório crônico (Figura 10; E e F). Em algumas regiões, o tecido conjuntivo apresentou intenso infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos. O tecido ósseo e cimento

radicular na região de bifurcação apresentaram contorno irregular e áreas de reabsorção (Figura 10; E e F). Na região interproximal, entre o 1º e 2º molares, foram observados danos estruturais no epitélio sulcular e migração apical do epitélio juncional (Figura 11; C).

O grupo DPT-HN019, quando comparado ao Grupo DPT, apresentou tecido conjuntivo com maior quantidade de fibroblastos, menor presença de edema intersticial, menor infiltrado inflamatório e fibras colágenas mais organizadas e interpostas entre o osso alveolar e o cimento (Figura 10; G e H). O tecido ósseo na região de bifurcação apresentou contorno regular e arquitetura em platô decorrente do processo de reabsorção óssea (Figura 10; G e H). O cimento radicular apresentou contorno regular e ausência de áreas de reabsorção. Na região interproximal, entre o 1º e 2º molares, foram observados menores danos estruturais no epitélio sulcular e menor deslocamento apical do epitélio juncional quando comparados aos resultados observados no Grupo DPT (Figura 11; D).

Figura 10 - Tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º molar inferior dos grupos CT (A, B), CT-HN019 (C, D), DPT (E, F) e DPT-HN019 (G, H). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x (A, C, G, F); 20x (B, D, F, H). OA = osso alveolar; TF = teto da bifurcação; setas pretas = vasos sanguíneos; cabeça de seta preta preenchida = osteoblastos; asterisco = fibras colágenas desconexas com a presença de edema intersticial; cabeça de seta branca preenchida = cementoclastos; cabeça de seta não preenchida = fibras colágenas interpostas entre o osso alveolar e o cimento radicular.

Figura 11 - Tecidos periodontais na região interproximal entre o 1º e 2º molares inferiores dos animais dos grupos CT (A), CT-HN019 (B), DPT (C), DPT-HN019 (D). Aumento original = 20x. PMI = primeiro molar inferior; SMM = segundo molar inferior; Seta preta = junção cimento-esmalte; Seta branca = inserção conjuntiva.

4.4.2 Análise histométrica

As médias e os desvios-padrão do NIC para todos os grupos experimentais, bem como o resultado das comparações intergrupos estão representados na Figura 12. Os grupos CT e CT-HN019 apresentaram NIC = 0mm. O grupo DPT apresentou NIC significativamente maior que o Grupo DPT-HN019 ($p < 0,05$).

Figura 12 - Médias e desvios-padrão do nível de inserção conjuntiva (NIC) para os grupos DPT e DPT-HN019, com comparações entre os grupos. *diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p < 0,05$).

4.5 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT)

O Grupo DPT apresentou NOA significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado a todos os outros grupos experimentais (Figura 13). Na análise de VO, o grupo DPT apresentou valores significativamente menores em relação aos grupos CT, CT-HN019 e DPT-HN019 (Figura 14; A). Considerando a microarquitetura óssea na região de bifurcação do primeiro molar inferior, o grupo DPT apresentou maiores valores de PO (Figura 14; B) e de Tb.Sp (Figura 14; C), bem como menores valores de Tb.N (Figura 14; D) quando comparado aos grupos CT, CT-HN019 e DPT-HN019 ($p < 0,05$). Na figura 15, podem ser observadas reconstruções tridimensionais renderizadas elaboradas a partir das secções microtomográficas para os grupos CT (A e B), CT-HN019 (C e D), DPT (E e F) e DPT-HN019 (G e H).

Figura 13 - Médias e desvios-padrão do nível ósseo alveolar (NOA), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 14 - Médias e desvios-padrão do volume ósseo (A) porosidade óssea (B), espaçamento trabecular (C) e número de trabéculas (D), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). VO = volume ósseo; PO = porosidade óssea; Tb.Sp = espaçamento trabecular; Tb.N = número de trabéculas.

Figura 15 - Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais dos grupos CT (A, B), CT-HN019 (C, D), DPT (E, F) e DPT-HN019 (G, H). Vista da superfície vestibular externa (A, C, E e G). Secção sagital da superfície interna (B, D, F e H). CTVox[®] (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do *pixel* = 7,96 μm.

Discussão

Recentes dados epidemiológicos mostram que as doenças bucais afetam aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas globalmente (KASSEBAUM et al., 2014). Neste contexto, a possibilidade de tratar doenças bucais com um método natural, não invasivo e não estressante é particularmente atraente e pode prevenir problemas relacionados aos tratamentos farmacológicos, principalmente aqueles relacionados ao uso de antibióticos (NISSEN et al., 2014). Neste estudo, o uso tópico de bactérias probióticas reduziu a perda óssea alveolar e de inserção conjuntiva decorrentes da periodontite experimental em ratos, aumentou a expressão de BD nos tecidos periodontais, favoreceu a expressão de citocinas anti-inflamatórias e interferiu na proporção de complexos microbianos presentes no biofilme bucal.

O presente estudo é o primeiro a avaliar a influência de *B. lactis* HN019 na composição do biofilme subgengival. A aplicação tópica de *B. lactis* HN019 nos sítios periodontais parece ter favorecido o crescimento de bactérias comensais. De fato, a racionalidade para o uso de probióticos está baseada, principalmente, na sua habilidade em remodelar comunidades microbianas e, assim, promover o crescimento e sobrevivência de bactérias comensais (WEICHERT et al., 2012). O Grupo DPT-HN019 apresentou maiores percentuais de bactérias dos complexos amarelo e azul no biofilme subgengival quando comparado ao Grupo DPT. As bactérias desses complexos (*Actinomyces* e *Streptococcus*) são frequentemente associadas com saúde periodontal (AAS et al., 2005; LUCAS et al., 2000; HAJISHENGALLIS et al., 2012; ABUSLEME et al., 2013; ARUNI et al., 2015) e podem auxiliar no controle da inflamação dos tecidos periodontais (DEVINE et al., 2015; KUMAR & MASON, 2015). Espécies bacterianas comensais orais, como *Streptococcus*, podem suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias epiteliais (HASEGAWA et al., 2007; COSSEAU et al., 2008; SLIEPEN et al., 2009; KASSI et al., 2011; KACI et al., 2014). Além disso, esses microrganismos podem potencializar a produção de mucina, melhorar a barreira epitelial, induzir a expressão de peptídeos de defesa antimicrobianos do hospedeiro, promover a angiogênese e acelerar a cicatrização de feridas (DEVINE et al., 2015). Portanto, um apropriado balanço de microrganismos comensais imunomodulatórios parece ser essencial para a saúde bucal (DEVINE et al., 2015). Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos DPT e DPT-HN019 no que se refere aos percentuais dos complexos microbianos verde, roxo, laranja e vermelho presentes no biofilme subgengival dos animais. Considerando que as bactérias desses complexos estão envolvidas na patogênese da DP (TELES et al., 2006), bem como a menor gravidade da doença observada no Grupo DPT-HN019 por meio de análises microtomográficas e histomorfométrica, pode-se aventar a hipótese de uma redução da patogenicidade do biofilme em decorrência da administração

probiótica. Nissen et al. (2014) demonstraram que bactérias produtoras de ácido lático podem afetar a virulência de patógenos periodontais, reduzindo a expressão de algumas exotoxinas (NISSEN et al., 2014). É importante ainda considerar que a transição de saúde para doença, em um conceito de disbiose, não é influenciada apenas por alterações quantitativas bacterianas, mas sim pela atividade sinérgica que ocorre com a combinação das atividades metabólicas dos diversos microrganismos no ambiente periodontal. Uma mesma espécie bacteriana pode apresentar um grande espectro de ações entre comensalismo e patogenicidade dependendo da composição da comunidade no biofilme (HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2016).

Os resultados microbiológicos do presente estudo devem ser interpretados com cautela devido às limitações do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para o modelo animal utilizado. Nos grupos CT e CT-HN019, não foi possível nenhuma detecção bacteriana. Provavelmente, uma ou mais das espécies testadas poderiam estar presentes no biofilme subgengival dos animais desses grupos, mas em níveis abaixo do limite de detecção do *checkerboard DNA-DNA hybridization* (10^4 células). Avaliações adicionais usando técnicas mais sensíveis, tais como cultura e sequenciamento gênico do RNA ribossomal 16S, podem ser ferramentas úteis para superar esta limitação (DUARTE et al., 2010), permitindo também a identificação da microbiota subgengival dos animais dos grupos DPT e DPT-HN019 antes da colocação das ligaduras. Os dados microbiológicos do presente estudo também representam resultados de hibridização de DNA de espécies bacterianas de ratos com sondas de DNA preparadas usando DNA de espécies bacterianas orais humanas. As 40 espécies bacterianas examinadas são bem reconhecidas como importantes espécies relacionadas às condições de saúde ou DP em humanos. Contudo, outras espécies envolvidas na destruição dos tecidos periodontais em ratos podem estar presentes (DUARTE et al. 2010).

O Grupo DPT-HN019 apresentou níveis de IL-1 β e razão IL-1 β /IL-10 significativamente menores quando comparado ao Grupo DPT, o que mostra um possível efeito da terapia probiótica na modulação do processo imunoinflamatório periodontal. Em um estudo clínico recente, a administração de bactérias probióticas produtoras de ácido lático para pacientes com periodontite crônica reduziu os níveis de IL-1 β no FCG (SZKARADKIEWICZ et al., 2014). Outros estudos também demonstraram que bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium*, em sítios não periodontais, podem promover um aumento nos níveis de IL-10 (MARTINS et al., 2010, CITAR et al., 2015). IL-10 exerce efeitos inibitórios sobre IL-1 β e TNF- α , os quais desempenham ações sinérgicas no processo inflamatório, amplificando a

resposta do hospedeiro (MOORE et al., 2001). Uma elevada razão IL-1 β /IL-10 no FGF pode estar relacionada à progressão da periodontite agressiva (TELES et al., 2010).

O Grupo DPT-HN019 apresentou níveis de RANKL e razão RANKL/OPG significativamente menores quando comparado ao Grupo DPT. Esse resultado indica um efeito modulador da terapia probiótica nos processos de reabsorção e formação ósseas. Um aumento da razão RANKL/OPG favorece a reabsorção óssea por meio da osteoclastogênese e ativação de osteoclastos (KAJIYA et al., 2010). Alguns estudos realizados em ratas ovariectomizadas, um modelo experimental de osteoporose, demonstraram que bactérias probióticas podem reduzir a reabsorção óssea, aumentando a expressão de OPG, induzindo a expressão gênica de proteína ácida secretada e rica em cisteína e de proteína morfogenética óssea 2, alterando a frequência de células T-reguladoras na medula óssea e reduzindo a expressão de RANKL (BRITTON et al., 2014; OHISSON et al., 2014; PARVANEH et al., 2015). O presente estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos de *B. lactis* HN019 na expressão de OPG e RANKL nos tecidos periodontais.

Uma expressão significativamente maior de BD foi observada no Grupo DPT-HN019 quando comparado ao Grupo DPT. BD são peptídeos antimicrobianos importantes na imunidade inata epitelial e suas expressões diferenciais estão associadas com a DP (WANG et al., 2015). Enquanto BD-1 é continuamente expressa nos tecidos epiteliais periodontais, BD-2 e BD-3 são diferencialmente induzidas por estímulos infecciosos ou inflamatórios (KRISANAPRAKORNKIT et al., 2000; HARDER et al., 2001; JIA et al., 2001; DALE & KRISANAPRAKORNKIT et al., 2001). Estudos prévios demonstraram que os tecidos gengivais saudáveis apresentam maior expressão de BD-1, BD-2 e BD-3 do que os tecidos de pacientes com periodontite (BISSELL et al., 2004; LU et al., 2004; VARDAR-SENGUL et al., 2007; KUULA et al., 2008; BRANCATISANO et al., 2001; LIU et al. 2014). No presente estudo, é possível que a exposição das células epiteliais ao *B. lactis* HN019, logo antes da indução da periodontite experimental e no decorrer do desenvolvimento da doença, tenha potencializado a expressão de BD. Essa hipótese pode ser aventada considerando que uma amplificação da expressão gênica de BD-2 pode ocorrer quando células epiteliais gengivais são primeiramente expostas a bactérias benéficas ou comensais antes da exposição a periodontopatógenos (DOMMISCH et al., 2012). No presente estudo, a expressão de BD foi encontrada também em osteoblastos presentes nos tecidos de suporte periodontal. De fato, osteoblastos podem expressar BD quando estimulados por bactérias ou citocinas pró-inflamatórias (WARNKE et al., 2006; VAROGA et al., 2008; VAROGA et al., 2009). Nesse contexto, a maior expressão de BD observada no Grupo DPT-HN019 em relação ao Grupo

DPT pode ser reflexo de uma ação antagonista dos peptídeos antimicrobianos ao processo de destruição óssea decorrente da inflamação. BD afetam a diferenciação e maturação de osteoblastos e podem, em casos de moderada inflamação ou na presença de mediadores anti-inflamatórios, auxiliar na proteção do tecido ósseo (KRAUS et al., 2012).

Probióticos podem ter um impacto significativo no tratamento da DP (GRUNER et al., 2016; MARTIN-CABEZAS et al., 2016). Este estudo prova de conceito demonstrou os efeitos microbiológicos e imunoinflamatórios de *B. lactis* HN019 na periodontite experimental em ratos. Novos estudos são fundamentais para confirmar os achados obtidos em modelos animais de maior escala filogenética e em estudos clínicos controlados. É importante também que futuras investigações analisem o potencial de colonização desta cepa probiótica na cavidade bucal e seu período de permanência após a descontinuidade da terapia probiótica. Além disso, novos veículos de administração e regimes terapêuticos merecem ser investigados.

Conclusão

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o uso tópico de *B. lactis* HN019 promove um efeito protetor contra a perda óssea e de inserção conjuntiva decorrentes da periodontite experimental em ratos.

Referências

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):5721-5732.

Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* 2013;7(5):1016-1025.

Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factor. *Arch Oral Biol* 2002;47:799-804.

Amrouche T. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur de bifidobactéries: analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués / Tahar Amrouche. Québec: Université Laval 2005;175.

Aruni AW, Dou Y, Mishra A, Fletcher HM. The Biofilm Community-Rebels with a Cause. *Curr Oral Health Rep* 2015;2(1):48-56.

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;160:403-409.

Barouei J, Moussavi M, Hodgson DM. Effect of Maternal Probiotic Intervention on HPA Axis, Immunity and Gut Microbiota in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome. *PLoS ONE* 2012;7(10):e46051.

Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000* 2011;55:36-47.

Berglundh T, Liljenberg B, Tarkowski A, Lindhe J. The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:281-286.

Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann Microbiol* 2000;50:117-131.

Bissell J, Joly S, Johnson GK, et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2004;33:278-285.

Blümer N, Sel S, Virna S, et al. Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. *Clin Exp Allergy* 2007;37:348-357.

Bogsan CS, Novaes e Brito RR, Palos Mda C, et al. B-1 cells are pivotal for *in vivo* inflammatory giant cell formation. *Int J Exp Pathol* 2005;86:257-265.

Bogsan CSB, Ferreira L, Maldonado C, Perdigon G, Almeida SR, Oliveira MN. Fermented or unfermented milk using *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019: Technological approach determines the probiotic modulation of mucosal cellular immunity. *Food Res Int* 2014;64:283-288

- Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res* 2011;90:241–245.
- Britton RA, Irwin R, Quach D, et al. Probiotic *L. reuteri* Treatment Prevents Bone Loss in a Menopausal Ovariectomized Mouse Model. *J Cell Physiol* 2014;229:1822–1830.
- Caglar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand* 2006;64:314-318.
- Caglar E, Kuscu OO, Cildir SK, Kuvvetli SS & Sandalli N. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Int J Paediatr Dent* 2008;18:35-9.
- Chitprasert P, Sudsai P, Rodklongtan A. Aluminum carboxymethyl cellulose–rice bran microcapsules: Enhancing survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. *Carbohydr Polym* 2012;90(1):78-86.
- Čitar M, Hacin B, Tompa G, et al. Human intestinal mucosa-associated *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. *Benef Microbes* 2015;6(3):325-336.
- Commane D, Hughes R, Shortt C, Rowland I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res* 2005;11:591:276-289.
- Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, et al. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun* 2008;76:4163-4175.
- Dale BA, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2001;30(6):321-7.
- Devine DA, Marsh PD, Meade J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *J Oral Microbiol* 2015;6(7):26941.
- Dommisch H, Reinartz M, Backhaus T, Deschner J, Chung W, Jepsen S. Antimicrobial responses of primary gingival cells to *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 2012;39(10):913-22.
- Dong X, Cheng G, Jian W. Simultaneous identification of five bifidobacterium species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Syst Appl Microbiol* 2000;23(3):386-90.
- Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2010;55(2):142-7.
- Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ; CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill, USA),

Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), Roy Page (University of Washin). Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 2012;91:914-20.

Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: An investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol* 2001;21:264-271.

Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nut* 2000;83:167-76.

Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;81:591-606.

Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 2001;67: 207-216.

Gordon DM. The potential of bacteriocin producing probiotics and associated caveats. *Future Microbiol* 2009;4:941-943.

Greenstein G. Local drug delivery in the treatment of periodontal diseases: assessing the clinical significance of the results. *J Periodontol* 2006;77:565-578.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65: 260-267.

Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Dent* 2016;doi: 10.1016/j.jdent.2016.03.002
Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London: *FAO/WHO* 2002.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111.

Hajishengallis G, Lamont RJ. Dancing with the Stars: How Choreographed Bacterial Interactions Dictate Nososymbiocity and Give Rise to Keystone Pathogens, Accessory Pathogens, and Pathobionts. *Trends Microbiol* 2016;doi: 10.1016/j.tim.2016.02.010.

Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:717-725.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001;276(8):5707-13.

Hasegawa Y, Mans JJ, Mao S, et al. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species. *Infect Immun* 2007;75:2540-7.

- Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21(5):326-32.
- Hoffman AF, Heimbach JT, Sanders ME, Hibberd PL. Executive Summary: Scientific and Regulatory Challenges of Development of Probiotics as Foods and Drugs. *Clin Infect Dis* 2008;46:53-57.
- İnce G, Gürsoy H, İpçi ŞD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yılmaz S. Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2015;86(6): 746-754.
- Jia HP, Schutte BC, Schudy A, et al. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 2001;263(1-2):211-8.
- Kaci G, Lakhdari O, Dore J, et al. Inhibition of the NF-kappa B pathway in human intestinal epithelial cells by commensal *Streptococcus salivarius*. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:4681-4.
- Kaci G, Goudercourt D, Dennin V, et al. Anti-inflammatory properties of *Streptococcus salivarius*, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:928-34.
- Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol* 2010;2:5532.
- Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-regression. *J Dent Res* 2014;93(11):1045-1053.
- Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J* 2006;30:55-60.
- Kraus D, Deschner J, Jäger A, et al. Human β -defensins differently affect proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblast-like MG63 cells. *J Cell Physiol* 2012;227:994-1003.
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 2000;68(5):2907-15.
- Kumar PS, Mason MR. Mouthguards: does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health? *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:35.
- Kuula H, Salo T, Pirilä E, et al. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol* 2008;53(2):175-186.

- Laleman I, Yilmaz E, Ozcelik O, et al. The effect of a streptococci containing probiotic in periodontal therapy: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 2015;42:1032–1041.
- Lisboa MR, Gondim DV, Ervolino E, et al. Effects of electroacupuncture on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2015;86(6):801-11.
- Liu C, Zhang ZY, Dong K & Guo XK. Adhesion and immunomodulatory effects of *Bifidobacterium lactis* HN019 on intestinal epithelial cells INT-407. *World J Gastroenterol* 2010;14(16):2283-2290.
- Liu J, Chen J, Du X, Hu L, Chen L. The expression of hBDs in the gingival tissue and keratinocytes from healthy subjects and periodontitis patients. *Arch Oral Biol* 2014;59(2):193-8.
- Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2004;39(4):221–227.
- Lucas VS, Beighton D, Roberts GJ. Composition of the oral streptococcal flora in healthy children. *J Dent* 2000;28:45–50
- Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res* 2014;49:785–791
- Martins AK, Martins FS, Gomes DA, et al. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*. *Arch Microbiol* 2010;192: 995-1003.
- Martin-Cabezas, R., Davideau, J.-L., Tenenbaum, H. and Huck, O. Clinical efficacy of probiotic as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2016.doi:10.1111/jcpe.12545.
- Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009;36:506-513.
- Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry. *Eur J Oral Sci* 2005;113:188-196.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Ann Rev Immun* 2001;19:683-765.
- Morales A, Carvajal P, Silva N, et al. Clinical Effects of *Lactobacillus Rhamnosus* in Non-Surgical Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized Placebo-Controlled Trial With 1-Year Follow-up. *J Periodontol* 2016;4:1-12.
- Näse L, Hatakka K, Savilahti E, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res* 2001;35:412-420.

- Nissen L, Sgorbati B, Biavati B, Belibasakis GN. *Lactobacillus salivarius* and *L. gasseri* down-regulate *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* exotoxins expression. *Ann Microbiol* 2014;64(2):611-617.
- Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int J Med Microbiol* 2010;300:57-62.
- Ohlsson C, Engdahl C, Fåk F, et al. Probiotics Protect Mice from Ovariectomy-Induced Cortical Bone Loss. *PLoS ONE* 2014;9(3):e92368.
- Ouwehand AC, Salvadori B, Fonden R, Mogensen G, Salminen S, Sellars R. Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. *Bulletin Int Dairy J* 2003;380:4-19.
- Parvaneh k, Ebrahimi M, Sabran MR, et al. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) Increase Bone Mass Density and Upregulate Sparc and Bmp-2 Genes in Rats with Bone Loss Resulting from Ovariectomy. *BioMed Res Int* 2015;ID:897639.
- Prasad J, Smart JB, Gopal PK, Gill HS. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J* 1998;8:993-1002.
- Pugliese LS, Goncalves TO, Popi AF, Mariano M, Pesquero JB, Lopes JD. B-1 lymphocytes differentiate into functional osteoclast-like cells. *Immunobiol* 2012;217:336-344.
- Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 2001;28:499-507.
- Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis* 2007;13:376-85.
- Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis* 2007;13:376-85.
- Salvi GE & Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005;32(6):108-29.
- Sazawal S, Dhingra U, Hiremath G, et al. Effects of bifidobacterium lactis HN019 and prebiotic oligosaccharide added to milk on iron status, anemia, and growth among children 1 to 4 years old. *J pediatr gastroenterol nutr* 2010;51:341-346.
- Shah MP, Gujjari SK, Chandrasekhar VS. Evaluation of the effect of probiotic (inersan®) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. *J Clin Diagn Res* 2013;7:595-600.
- Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2008;35:897-905.

- Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2008;35:897-905.
- Shu Q, Lin H, Rutherford KJ, et al. Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiol Immunol* 2000;44:213-222.
- Singh RP, Damle SG, Chawla A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. *Acta Odontol Scand* 2011;69(6):389-94.
- Sliepen I, Van Damme J, Van Essche M, Loozen G, Quirynen M, Teughels W. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res* 2009;88:1026-1030.
- Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Non-isotopic DNA probes for the identification of subgingival microorganisms. *Oral microbiol immunol* 1989;4(1):41-46.
- Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988;67(1):31-40.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-44.
- Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol* 2001;90:172-179.
- Staab B, Eick S, Knöfler G, Jentsch H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J Clin Periodontol* 2009;36:850-856.
- Stamatova I & Meurman JH. Probiotics and periodontal Disease. *Periodontol* 2000 2009;51:141-151.
- Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpiński TM. Effect of Oral Administration Involving a Probiotic Strain of *Lactobacillus reuteri* on Pro-Inflammatory Cytokine Response in Patients with Chronic Periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp* 2014;62(6):495-500.
- Tekce M, Ince G, Gursoy H, et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol* 2015;42:363-372.
- Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol* 2000 2006;42:180-218.
- Teles RP, Gursky LC, Faveri M, et al. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37:313-323.
- Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota?. *J Clin Periodontol* 2011;38:159-177.

- Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2013;40(11):1025-35.
- Teughels W, Newman MG, Coucke W, et al. Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. *J Dent Res* 2007;86:1078–1082.
- Teughels W, Van Essche M, Sliepen I & Quirynen M. Probiotics and oral health. *Periodontol* 2000 2008;48:111-1147.
- Toiviainen A, Jalasvuori H, Lahti E, et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin Oral Investig* 2015;19:77-83.
- Tsubura S, Mizunuma H, Ishikawa S, et al. The effect of *Baccillus subtilis* Mouth rinsing in patients with periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1353-1356.
- Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel– Lindberg T, Stecksen–Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand* 2009;67:19-24.
- Van Hoogmoed CG, van der Kuijl-Booij M, van der Mei HC, Busscher HJ. Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salivary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strains. *Appl Environm Microbiol* 2000;66:659-663.
- Varoga D, Tohidnezhad M, Paulsen F, et al. The role of human β -defensin-2 in bone. *J Anat* 2008;213(6):749-757.
- Varoga D, Wruck CJ, Tohidnezhad M, et al. Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human β -defensin-3. *Histochem Cell Biol* 2009;131:207–218.
- Vicario M, Santos A, Violant D, Nart J, Giner L. Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontol Scand* 2013;71:813-9.
- Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol* 2010;2:2.
- Warnke PH, Springer IN, Russo PA, et al. Innate immunity in human bone. *Bone* 2006;38:400–408.
- Wang WM, Ye P, Qian YJ, et al. Effects of whole cigarette smoke on human beta defensins expression and secretion by oral mucosal epithelial cells. *Tob Induc Dis* 2015;13(1):3.
- Weichert S, Schrotten H, Adam R. The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31(8):859-62.

Zhang G, Chen R, Rudney JD. *Streptococcus cristatus* attenuates *Fusobacterium nucleatum*-induced interleukin-8 expression in oral epithelial cells. *J Periodontal Res* 2008;43:408-416.

Zhou JS & Gill HS. Immunostimulatory probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 do not induce pathological inflammation in mouse model of experimental autoimmune thyroiditis. *Int J Food Microbiol* 2005;103:97-104.

*A*nexos

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “Efeitos da terapia com *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* HN019 e *Bdellovibrios bacteriovorus* HD100 na Periodontite experimental em ratos: estudo do perfil microbiológico, imunológico, histológico e genético da resposta do hospedeiro”, Protocolo nº 2014.1.389.58.2, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Michel Reis Messoria – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em reunião de 15/07/2014, com alterações aprovadas pela Comissão em 19/08/2015.

Vigência do Projeto	01/10/2014 a 01/10/2015
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de animais	184
Peso/Idade	250-300g/ 42 a 56 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 19 de agosto de 2015.

Prof. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICATE CEUA – FORP/USP

We hereby certify that the project entitled "**Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* HN019 and *Bdellovibrios bacteriovorus* HD100 on the experimental periodontitis in rats: microbiological, immunological, histological and generic features of the host response**" Protocol 2014.1.389.58.2 under the responsibility of Prof. Dr. Michel Reis Messoria involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 15/07/2014, with modifications approved in 19/08/2015.

Duration of the Project	01/10/2014 a 01/10/2015
Species/Lineage	Heterogenic rat/ Wistar
Nº of animals	184
Weight / age	250-300g/ 42-56 days
Gender	Male
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo

Ribeirão Preto, August 19th, 2015.

Prof. Dra. Andriara De Rossi Daldegan

Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP

ANEXO B - Artigo científico submetido para publicação no periódico *Journal of Periodontology*.

Benefits of *Bifidobacterium animalis* Probiotic in Experimental Periodontitis

Luiz F. F. Oliveira, DDS^{*}; Sérgio L. Salvador, Pharm.D, PhD[†]; Pedro H. F. Silva, DDS^{*}; Flávia A. C. Furnalento, DDS, PhD^{*}; Luciene, DDS, PhD[‡]; Renato Casarin, DDS, PhD[§]; Edilson Ervolino, DDS, PhD^{||}; Sérgio L. S. Souza, DDS, PhD^{*}; Daniela B. Palioto, DDS, PhD^{*}; Michel R. Messoro, DDS, PhD^{*}

Author responsible for correspondence:

Prof. Dr. Michel R. Messoro

Av. Café, s/n 14040-904

Ribeirão Preto / SP, Brazil

Telephone: +55 16 3315 4135 / Fax: +55 16 3315 4788 (fax number can be published)

e-mail: m.messoro@forp.usp.br (e-mail can be published)

Source of Support: Sao Paulo Research Foundation (FAPESP – process #2013/25022-7).

There is no relationship between any author and commercial firms that may pose a conflict of interest.

Word count: 3913

Number of figures: 6

Number of tables: 0

Running title: *Bifidobacterium lactis* in Periodontitis.

Summary Sentence: The topical administration of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 promotes a protective effect against alveolar bone and connective tissue attachment losses attributable to experimental periodontitis in rats.

ABSTRACT

Background: This study evaluated the effects of topical administration of probiotic bacteria (PROB) of the genus *Bifidobacterium* on experimental periodontitis (EP) in rats. **Methods:**

32 rats were divided into groups C (control; without EP), EP (EP only), C-HN019 (control+PROB) and EP-HN019 (EP+PROB). On day 0 of the experiment, animals of groups EP and EP-HN019 received cotton ligatures around mandibular first molars. In groups C-HN019 and EP-HN019, 2mL of suspensions containing *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (*B. lactis*) HN019 were topically administered in the subgingival region of mandibular first molars on days 0, 3 and 7. In groups C and EP, topical administrations were performed using a *sham* suspension (without PROB). All animals were euthanized at day 14. Gingival tissue, hemi-mandibles and oral biofilm were collected. Data were statistically analyzed ($P < 0.05$). **Results:** Group EP presented greater values of bone porosity, trabecular separation and connective tissue attachment loss as well as reduced bone volume when compared with all the other groups ($P < 0.05$). In group EP-HN019, there were greater percentages of bacteria of the yellow and blue complexes and greater expressions of Osteoprotegerin (OPG) and beta-defensins (BD)-1, BD-2 and BD-3 when compared with group EP ($P < 0.05$). Group EP presented greater levels of Interleukin (IL)-1 β and Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B ligand (RANKL) than group EP-HN019 ($P < 0.05$). **Conclusion:** It can be concluded that the topical use of *B. lactis* HN019 promotes a protective effect against alveolar bone and connective tissue attachment losses attributable to EP in rats.

Keywords: Periodontitis; Probiotics; Rats; *Bifidobacterium*.

INTRODUCTION

According to the World Health Organization probiotics are live microorganisms that can confer health benefits to the host when consumed in adequate amounts (www.who.int/entity/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf). The studies that evaluated the effects of probiotics on the treatment of periodontal disease demonstrated that they can reduce periodontopathogens, improve periodontal clinical parameters, decrease the levels of pro-inflammatory cytokines and potentiate the effects of scaling and root planing (SRP).¹⁻⁵

Although the scientific literature presents promising results, it is important to consider that the findings obtained with probiotics can not be generalized⁶ once they are dependent on the strain, dosage, frequency and route of administration used. Unlike the results obtained with *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus brevis*,¹⁻⁵ the use of *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus* as adjunctive therapies to SRP in the treatment of chronic periodontitis did not promote additional benefits.^{7,8}

The studies that investigated the effects of probiotics on periodontal diseases to date used mainly microorganisms from the genus *Lactobacillus*. However, other potential probiotics deserve investigations. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) composes the human microbiota and presents a symbiotic relationship with the host. It is considered a potential probiotic because possesses immunomodulatory⁹⁻¹¹ and antimicrobial¹²⁻¹⁴ properties. To the best of our knowledge, there are no studies evaluating the effects of the genus *Bifidobacterium* on periodontitis. Some studies demonstrated that *Bifidobacterium* alters the colonization of cariogenic bacteria and prevents dental caries¹² as well as decreases plaque and gingival indexes.¹⁴ Whether it can also inhibit periodontal bone loss and the underlying mechanisms involved are yet to be determined.

The purpose of this study was to evaluate the microbiological, histomorphometric, microtomographic and immunological outcomes following the administration of *B. lactis* HN019 in rats with ligature-induced periodontitis.

MATERIALS AND METHODS

Sample

This study was conducted in compliance with the ethical principles of the Universal Declaration of Animal Rights by UNESCO. The present study was conducted after review and approval by the Ethics Committee on Animal Experimentation at School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – FORP/USP (protocol 2014.1.389.58.2).

A power calculation was performed to determine the sample size. The animal was considered the study unit. The sample size was determined to provide 80% power to recognize a significant difference of 20% among groups and the standard deviation of 15% with a 95% confidence interval ($\alpha = 0.05$), considering the change in the alveolar bone in the furcation area (Bone Volume - BV) as the primary outcome variable. Therefore, a sample size of eight animals per group was required.

Experimental model

Thirty-two adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus, albinus*), weighing 230-250 g, were used (Central Animal Facility, FORP/USP). The rats were kept in a 12-hour light/dark cycle and temperatures between 22 and 24°C. They were fed with selected solid diet and water *ad libitum*. Before the study began, the rats were identified by a numeric code. According to a random numeric table generated by a computer software, the study coordinator (MRM)

allocated each rat into one of the following groups (n=8): Group C (control, without experimental periodontitis); Group CT-HN019 (control+probiotic); Group EP (experimental periodontitis) and Group EP-HN019 (experimental periodontitis+probiotic). The allocation sequence was unknown to the investigators of the study (operators, outcome assessors and biostatistician). All analyses were performed by calibrated and blinded examiners.

Preparation of probiotic cultures and administration to the animals

B. lactis HN019[¶] were cultivated in MRS agar medium[#] for 48 hours under anaerobic conditions^{**} at 37°C. Using a sterile handle, the bacterial inoculum was transferred to Falcon tubes containing glass pearls and sterile distilled water. After homogenization in tubes agitator,^{††} the suspension was submitted to serial decimal dilutions until 10⁻⁹ in phosphate-buffered saline solution (PBS) at pH 7.0 containing 2% carboxymethylcellulose.¹⁵ Aliquots of 100 µl were placed on Petri plates containing MRS agar[#] and sown using sterile glass stick. Plates were then incubated for 48 hours under anaerobic conditions at 37°C. The quantitative standardization of the inocula was obtained by determining the optical density (OD) in the wavelength of 625 nm in spectrophotometer^{‡‡} and by duplicate counting of the number of colony-forming units (CFU/mL). Therefore, the OD of 2.898 corresponded to the standard inoculum with 1.9x10⁹ CFU/mL.¹⁶

In groups C-HN019 and EP-HN019, 2 mL of suspensions containing 1.9x10⁹ CFU/mL of *B. lactis* HN019 were topically administered in the subgingival region of mandibular first molars of the animals on days 0, 3 and 7 of the experiment. In groups C and EP, topical administrations were performed using a sham suspension (without probiotic).

Induction of periodontitis

At day 0, the animals of groups DPT and DPT-HN019 were anesthetized by an intraperitoneal injection of xylazine^{§§} (10 mg/kg body weight) and ketamine^{||} (80 mg/kg body weight). A cotton ligature was placed around their right and left mandibular first molars, as previously described.¹⁷

Euthanasia and collection of samples

Animals were euthanized with a lethal dose (150 mg/kg body weight) of sodium thiopental^{¶¶} at day 14 of the experiment.

Using sterile blades, samples of gingival tissues from buccal and lingual regions around the right mandibular first molar of each animal were collected for immunoenzymatic assays.

Gingival tissues collected were rinsed with PBS associated with a proteases-inhibitor cocktail.^{##} Then the tissues were macerated under freezing with liquid nitrogen, inserted in a solution containing PBS and proteases-inhibitor cocktail and mechanically homogenized.^{***} The samples were centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes at 4°C and the supernatant obtained was stored at -80°C. The right hemi-mandibles were analyzed by microcomputed tomography (micro-CT) and the left hemi-mandibles were submitted to histomorphometric and immunohistochemical analyses.

Immediately after the euthanasia of the animals, oral biofilm samples were also collected. In groups C and C-HN019, subgingival biofilm samples were collected using a sterile periodontal curette.^{†††} In groups EP and EP-HN019, the biofilm was collected along with the ligatures placed around mandibular first molars. All samples were instantly placed in sterile microtubes containing 150µL of buffered solution (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7.6 – solution TE). 100µL of 0.5M NaOH were added to this solution so that bacterial DNA could remain viable for a long period of time. The microtubes were stored at -20°C for microbiological analysis.

Microbiological analysis

Counts of 40 bacterial species were performed in each sample, using the checkerboard DNA–DNA hybridization technique¹⁸ as described previously.¹⁹ Signals were evaluated visually by comparison with the standards at 10^5 and 10^6 bacterial cells for the test species on the same membrane. They were recorded as: 0 = not detected; 1 = $< 10^5$ cells; 2 = $\sim 10^5$ cells; 3 = $10^5 - 10^6$ cells; 4 = $\sim 10^6$ cells; or 5 = $> 10^6$ cells. A total of 32 samples were analyzed.

Immunological analysis

The amount of total protein of each sample was determined by conventional enzyme immunoassays (ELISA), using commercially available kits.^{†††} The levels of the cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-10, Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and Osteoprotegerin (OPG) in gingival crevicular fluid (GCF) samples were determined using high sensitivity available kits^{§§§} and the multiplexing instrument^{|||} according to the manufacturer's recommendations. The samples were individually evaluated and the concentrations of each cytokine were estimated from the standard curve using a five-parameter polynomial equation with specific software.^{¶¶¶} A total of 128 samples were analyzed.

Histomorphometric analysis

After routine laboratorial processing,¹⁷ two sections representing the most central buccal-lingual portion in the furcation area of left mandibular first molars were selected for histopathological and histometric analyses. Histologic sections were evaluated under light microscopy with an optical microscope.^{****}

For histometric analysis, photomicrographs were captured by a digital camera^{††††} connected to a light microscope.^{††††} The images were analyzed using appropriate software.^{§§§§} The attachment loss (AL) was measured.¹⁷

Immunohistochemical analyses

Immunohistochemical processing was performed through the indirect immunoperoxidase method, as previously described.²⁰ The histological slides containing samples from all experimental groups were incubated with one of the following primary antibodies: rabbit anti-beta defensin (BD)-1,^{||||} rabbit anti-BD-2,^{¶¶¶¶} goat anti-BD-3.^{####}

Histologic sections were evaluated under light microscopy with an optical microscope.^{****}

Three regions were analyzed: mesial area to mandibular first molar, interproximal area between first and second mandibular molars and furcation area of mandibular first molar. In each region, an area of 600x800 µm was analyzed at x400 magnification. The coronal limit of these areas was the epithelial tissue (mesial and interproximal areas) or the roof of furcation (furcation area). Semiquantitative analyses of the immunolabeling patterns were conducted according to the following scores: score 0 – no immunolabeling (total absence of immunoreactivity in the area); score 1 – low immunolabeling pattern ($\approx \frac{1}{3}$ of the area presenting immunoreactivity); score 2 – moderate immunolabeling pattern ($\approx \frac{2}{3}$ of the area presenting immunoreactivity) and score 3 – high immunolabeling pattern (almost the totality of the area presenting immunoreactivity). The Group C was considered the reference point to define the basal pattern of immunoreactivity, from which the scores were attributed to the other experimental groups.

Microcomputed tomography (micro-CT) analyses

Non-demineralized specimens were scanned by a cone-beam micro-CT system.^{*****} The x-ray generator was operated at an accelerated potential of 60 kV with a beam current of 165 µA and an exposure time of 650 ms per projection. Images were produced with a voxel size of 6x6x6 µm.

Linear measurements on alveolar bone level (ABL) were performed at four different sites (buccal, lingual, interproximal and furcation) as previously described.²¹ The four linear measurements obtained from each animal were summed to express the ABL value.

For volumetric measurements, a volume of interest (VOI-prismatic section) was outlined from the apexes of all roots of M1 up to the roof of the furcation of M1, touching the roots surfaces²¹, in all images of the coronal dataset, using an adequate software.^{†††††} The following parameters were analyzed: i) BV: percentage of VOI filled with bone tissue; ii) Bone Porosity (BP): percentage of porosities present in the bone tissue within the VOI; iii) Trabecular Number (Tb.N): number (mm^{-1}) of bone trabeculae present within the VOI; iv) Trabecular Separation (Tb.Sp): total of spaces (mm) present among bone trabeculae within the VOI.

Rendered reconstructions of the microtomographic sections were also obtained for groups C, C-HN019, EP and EP-HN019 using an adequate software.^{†††††}

Statistical Analyses

Changes in the mean BV were defined as the primary outcome variable of the study. The other parameters analyzed were considered secondary outcome variables. Data were grouped and presented as means and standard deviations (continuous variables) or medians, interquartiles ranges and maximum and minimum values (ordinal variables). Normality and homoscedasticity of the data were verified. The significance level was set at 5%.

The significance of differences among groups for AL, ABL, BV, BP, Tb.N and Tb.Sp was assessed by analysis of variance (ANOVA) followed by *post-hoc* Tukey test. The significance of differences among groups in relation to the immunolabeling pattern of BD-1, BD-2 and BD-3 was determined by Kruskal-Wallis tests, followed by Dunn's multiple comparison post-test.

Total protein values in the immunological analysis were converted to pg/mL. Final levels of the cytokines analyzed were obtained dividing the values resultant from the multiplexing system initially by the total protein content in GCF samples (pg/mL). IL-1 β /IL-10 and RANKL/OPG ratios were also calculated for each group. Differences between groups for mean levels of IL-1 β , IL-10, RANKL, OPG, IL-1 β /IL-10 ratio and RANKL/OPG ratio were assessed by ANOVA followed by *post-hoc* Tukey test.

Microbiological data were presented as mean counts ($\times 10^5$) of individual bacterial species in each group. The bacterial species were grouped into complexes.¹⁸ Significance of differences between groups for mean proportions of microbial complexes was determined using t-Test.

RESULTS

Microbiological analysis

There was no bacterial detection in groups C and C-HN019. One explanation for this is the sensitivity of the *checkerboard DNA-DNA hybridization* and the low amount of biofilm in periodontal sites without ligature. The minimum detection level of *checkerboard DNA-DNA hybridization* is 10^4 cells.

Figure 1 shows the proportions of microbial complexes and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in groups EP and EP-HN019. Considering the proportions of species of orange, red, green and purple complexes and the proportions of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, there were no significant differences between groups EP and EP-HN019. Group EP-HN019 presented significantly higher proportions of species of yellow, blue and gray complexes than Group EP.

Immunological analysis

Means and standard deviations of the levels of IL-1 β , IL-10, RANKL and OPG, as well as intergroup comparisons, are depicted in Figure 2. Group EP presented significantly greater levels of IL-1 β (Fig. 2A) and RANKL (Fig. 2D) than groups C, C-HN019 and EP-HN019 ($P < 0.05$). No significant difference was observed between groups EP-HN019 and EP regarding mean levels of IL-10 (Fig. 2B). Group EP-HN019 presented mean levels of OPG significantly greater ($P < 0.05$) than groups C, C-HN019 and EP (Fig. 2E). Considering the ratios IL-1 β /IL-10 (Fig. 2C) and RANKL/OPG (Fig. 2F), Group EP-HN019 presented values significantly lower than Group EP ($P < 0.05$).

Histopathological analysis

In groups C and C-HN019, periodontal ligament (PL) presented a great amount of collagen fibers, fibroblasts, blood vessels and discreet inflammatory infiltrate. Collagen fibers were inserted both in cementum and in alveolar bone (Figs. 3A, 3B, 3D and 3E). The bone tissue of the furcation region presented a few irregularities on its surface (Figs. 3A, 3B, 3D and 3E). In both groups, junctional and sulcular epithelia integrities were observed in the interproximal area (Figs. 3C and 3F).

Group EP presented connective tissue with few fibroblasts, unorganized and detached collagen fibers, interstitial edema and moderate chronic inflammatory infiltrate (Figs. 3G and 3H). In some areas the connective tissue presented intense inflammatory infiltrate consisting primarily of neutrophils. The bone of the interradicular septum and the root cement showed

irregular outer contours and resorption areas (Figs. 3G and 3H). A severe damage of the junctional and sulcular epithelia and apical migration of the junctional epithelia were observed in the interproximal area (Fig. 3I).

In Group EP-HN019, the inflammatory infiltrate in the furcation region was mainly composed of neutrophils and was less extensive than the one observed in Group EP. The connective tissue presented numerous fibroblasts, a little interstitial edema and collagen fibers inserted both in cementum and in alveolar bone (Figs. 3J and 3K). Bone tissue in the interradicular septum was covered with osteoblasts or bone lining cells and presented a regular contour and plateau architecture (Figs. 3J and 3K). Few active osteoclasts were observed. The root cement presented a regular contour and absence of resorption areas. The junctional and sulcular epithelia of the interproximal area were less injured than that of Group EP (Fig. 3L).

Histometric analysis

Group EP ($0.31 \text{ mm} \pm 0.09 \text{ mm}$) showed significantly greater AL than Groups C and C-HN019 ($P < 0.05$), which did not present AL. When compared with Group EP, Group EP-HN019 ($0.19 \text{ mm} \pm 0.07 \text{ mm}$) presented AL significantly reduced ($P < 0.05$).

Immunohistochemical analyses

BD were detected both in the gingival epithelium and connective tissue and in the teeth-supporting tissues. There were qualitative and quantitative variations in the immunolabeling patterns for BD-1, BD-2 and BD-3 in all groups. In general, immunolabelings for BD-1, BD-2, and BD-3 were detected in keratinocytes, gingival fibroblasts, gingival blood vessels, osteoblasts and osteocytes. Further, periodontal ligament fibroblasts presented immunolabeling for BD-1 and BD-3. Osteoclasts showed immunolabeling for BD-2.

Figure 4 shows the immunolabeling pattern for BD-1 (Figs. 4B, 4C, 4D and 4E), BD-2 (Figs. 4G, 4H, 4I and 4J) and BD-3 (Figs. 4L, 4M, 4N and 4O) in teeth-supporting tissues of groups C (Figs. 4B, 4G and 4L), C-HN019 (Figs. 4C, 4H and 4M), EP (Figs. 4D, 4I and 4N) and EP-HN019 (Figs. 4E, 4J and 4O). Group EP presented lower immunolabeling pattern for BD-1, BD-2 and BD-3 than Group EP-HN019 (Figs. 4A, 4B and 4C).

Micro-CT analysis

Group EP presented ABL significantly increased ($P < 0.05$) when compared with all the other experimental groups (Fig. 5D). In the BV analysis, Group EP showed values significantly reduced when compared with groups C, C-HN019 and EP-HN019 (Fig. 5A). Considering the

bone microarchitecture in the furcation area, Group EP presented greater BP (Fig. 5B) and Tb.Sp (Fig. 5C) when compared with groups C, C-HN019 and EP-HN019 ($P < 0.05$).

Three-dimensional rendered reconstructions of the microtomographic sections of all groups can be observed in Figure 6.

DISCUSSION

Probiotic bacteria, mainly those of the genus *Lactobacillus*, can significantly impact the treatment of periodontal disease.^{22, 23} Other potential strains, such as the ones of the genus *Bifidobacterium*, were not investigated in periodontitis yet. The present study is the first one to demonstrate the potentiality of *B. lactis* HN019 on experimental periodontitis. The topical administration of this strain reduced alveolar bone and connective tissue attachment losses attributable to experimental periodontitis, increased the expression of BD in periodontal tissues, favored the expression of anti-inflammatory cytokines and influenced the proportion of microbial complexes present in the oral biofilm of rats.

The topical administration of *B. lactis* HN019 on periodontal sites seems to have facilitated the growth of commensal bacteria. In fact, the rationale for the use of probiotics is mainly based on their ability to promote the growth and survival of commensal bacteria.²⁴ Group EP-HN019 presented greater percentages of bacteria of the yellow and blue complexes in subgingival biofilm when compared with Group EP. The bacteria of these complexes (*Actinomyces* and *Streptococcus*) are frequently associated with periodontal health^{25, 26} and can assist inflammation control in periodontal tissues.²⁷⁻³⁰ Oral commensal bacterial species, such as *Streptococcus*, may suppress the expression of epithelial pro-inflammatory cytokines.²⁷⁻²⁸

In this study, no significant differences were found between groups EP and EP-HN019 regarding the percentage of green, purple, orange and red microbial complexes present in subgingival biofilms. Considering that the bacteria of these complexes are involved in the pathogenesis of periodontal diseases³¹ and the reduced disease severity observed in Group EP-HN019 through microtomographic and histomorphometric analyses, it can be hypothesized that there was a decrease in the biofilm pathogenicity due to the probiotic administration. Nissen et al.³² demonstrated that lactic acid bacteria can affect the virulence of periodontopathogens, reducing the expression of some exotoxins.³² It is also important to consider that the same bacterial specie may present a wide spectrum of actions, involving commensalism and pathogenicity, depending on the composition of the biofilm community.³³

The microbiological results of this study should be interpreted with caution, since it was not possible to identify the subgingival microbiota of groups C and C-HN019 as well as the one of groups EP and EP-HN019 before the placement of ligatures. It occurred because of the detection threshold of checkerboard DNA–DNA hybridization (10^4 cells). More sensitive techniques, such as cultures and 16S ribosomal RNA gene sequencing, may be useful tools to surpass this limitation in future studies.¹⁹

Group EP-HN019 presented levels of IL-1 β and ratio IL-1 β /IL-10 significantly reduced when compared with Group EP, which demonstrates a possible effect of the probiotic therapy on the modulation of periodontal inflammatory process. In a recent clinical study, the administration of probiotic lactic acid bacteria to patients with chronic periodontitis decreased the levels of IL-1 β in gingival crevicular fluid (GCF).³⁴ Other studies also demonstrated that probiotic bacteria of the genus *Bifidobacterium* can increase the levels of IL-10 in non-periodontal sites.^{35, 36} IL-10 exerts inhibitory effects on IL-1 β and TNF- α , which play synergistic roles in inflammatory process, amplifying the host response.³⁷ An elevated ratio IL-1 β /IL-10 in GCF may be associated with the progression of aggressive periodontitis.³⁸

Group EP-HN019 presented levels of RANKL and ratio RANKL/OPG significantly reduced when compared with Group EP. These results indicate a modulatory effect of the probiotic therapy on bone resorption and neoformation processes. An increase in the ratio RANKL/OPG favors bone resorption through osteoclastogenesis and osteoclasts activation.³⁹ Some studies performed with ovariectomized rats, an experimental model of osteoporosis, demonstrated that probiotic bacteria can decrease bone resorption, increasing OPG expression, inducing genic expression of secreted protein acidic and rich in cysteine and bone morphogenetic protein-2, affecting the frequency of regulatory T-cells in bone marrow and reducing RANKL expression.⁴⁰⁻⁴² The present study is the first one to demonstrate the effects of *B. lactis* HN019 on OPG and RANKL expressions in periodontal tissues.

A significantly greater expression of BD was observed in Group EP-HN019 when compared with Group EP. BD are important antimicrobial peptides in epithelial innate immunity and their differential expressions are associated with periodontal disease.⁴³ Previous studies have demonstrated that healthy gingival tissues present greater expressions of BD-1, BD-2 and BD-3 than the tissues of patients with periodontitis.⁴⁴⁻⁴⁶ In the present study, it is possible that the exposition of epithelial cells to *B. lactis* HN019 before the induction of periodontitis and during the course of the disease have potentiated the expression of BD. This hypothesis can be suggested considering that an amplification of the genic expression of BD-2 may occur when gingival epithelial cells are initially exposed to beneficial or commensal bacteria before

being exposed to periodontopathogens.⁴⁷ In this study, expression of BD was also observed in osteoblasts present in teeth-supporting tissues. In fact, osteoblasts can express BD when stimulated by bacteria or pro-inflammatory cytokines.^{48, 49} In this context, the greater expression of BD found in Group EP-HN019 when compared with Group EP may represent an antagonist action of the antimicrobial peptides to the bone destruction process attributable to inflammation. BD affect osteoblasts differentiation and maturation. In cases of moderate inflammation or in the presence of anti-inflammatory mediators, BD can aid in the protection of bone tissues.⁵⁰

This proof-of-concept study demonstrated the microbiological and immunoinflammatory effects of *B. lactis* HN019 on experimental periodontitis in rats. Further studies are indispensable to confirm these findings in more advanced experimental models in the phylogenetic scale and in controlled clinical trials. It is also important that future investigations evaluate the potential of *B. lactis* HN019 to colonize the oral cavity, the period of time it remains after discontinuation of the probiotic therapy, new vehicles of administration and other therapeutic regimens.

CONCLUSION

It can be concluded that the topical use of *B. lactis* HN019 promotes a protective effect against alveolar bone and connective tissue attachment losses attributable to EP in rats.

FOOTNOTES

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

†Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil.

‡Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University - UNG, Guarulhos, Sao Paulo, Brazil

§Department of Prosthodontics and Periodontics, School of Dentistry, Campinas State University, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil.

||Department of Basic Sciences, Division of Histology, Dental School of Aracatuba, UNESP-Univ Estadual Paulista, Aracatuba, Sao Paulo, Brazil.

¶HOWARUM Bifido, E. I. Dupont® de Nemours and Company, Wilmington, DE, USA

#Man, Rogosa and Sharpe - Difco™ *Lactobacilli* MRS Broth, Sparks, MD, USA

**GASPAK™ EZ Anaerobe Container System with indicator, Sparks, MD, USA

†† Phoenix AP 65, Araraquara, SP, Brazil

‡‡ Micronal - AJX -1000, Sao Paulo, SP, Brazil

§§ Rompum[®], Bayer Animal Health, Sao Paulo, SP, Brazil

‖‖ Dopalen[®], Agribands Purina do Brasil Ltda., Paulinia, SP, Brazil

™™ Thiopentax[®], Cristalia Produtos Quimicos Farmaceuticos Ltda., Sao Paulo, SP, Brazil

Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

*** Ultra-Stirrer ULTRA 80-II, Eikonal do Brasil, Sao Paulo, SP, Brazil

††† 5-6, Mine-five - Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

‡‡‡ DCTM Protein Assay, Bio-Rad Laboratories Inc., Berkeley, CA, USA

§§§ RECYTMAG-65K-05, RBN-31K-1RANKL, RBN-31K-1OPG – Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, USA

‖‖‖ MAGPIX[®] analyzer, Luminex Corporation, Austin, TX, USA

™™™ Xponent[®] software, Luminex Corporation, Austin, TX, USA

**** Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany

†††† DM2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany

‡‡‡‡ DFC295, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany

§§§§ Diracon Bio Informatica Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brazil

‖‖‖‖ 1:200; SC-25573, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

™™™™ 1:200; orb-10531, Biorbyt, Cambridge, United Kingdom

1:100; SC-10860, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

***** Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Belgium

††††† CT-Analyser[®], version 1.13.5.1+, Bruker, Kontich, Belgium

‡‡‡‡‡ CTVox[®], version 3.1.0, Bruker, Kontich, Belgium

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Izilvânia Barros (Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, Sao Paulo, Brazil) for her expertise in conducting the microbiological analysis. The authors also thank Milla Sprone Tavares (Laboratory Assistant, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirao Preto / SP, Brazil) for her support during the preparation of the histologic specimens and Marina Del Arco (Laboratory Assistant, Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of São Paulo - USP, Ribeirao Preto / SP, Brazil) for her technical support during the microbiological procedures. The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. İnce G, Gürsoy H, İpçi ŞD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yılmaz S. Clinical and biochemical evaluation of lozenges containing *Lactobacillus reuteri* as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2015;86(6): 746-754.
2. Shah MP, Gujjari SK, Chandrasekhar VS. Evaluation of the effect of probiotic (inersan®) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. *J Clin Diagn Res* 2013;7:595-600.
3. Tekce M, Ince G, Gursoy H, et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol* 2015;42:363–372.
4. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2013;40(11):1025-35.
5. Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol* 2010;2:2.
6. Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol* 2011;38:159–177.
7. Laleman I, Yilmaz E, Ozcelik O, et al. The effect of a *streptococci* containing probiotic in periodontal therapy: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 2015;42:1032–1041.
8. Morales A, Carvajal P, Silva N et al. Clinical Effects of *Lactobacillus Rhamnosus* in Non-Surgical Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized Placebo-Controlled Trial With 1-Year Follow-up. *J Periodontol* 2016;4:1-12.
9. Biavati B; Vescovo M; Torriani S; Bottazzi V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann Microbiol* 2000;50:117-131.
10. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nut* 2000;83:167-76.
11. Prasad J, Smart JB, Gopal PK, Gill HS. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J* 1998;8:993-1002.
12. Caglar E, Kuscu OO, Cildir SK, Kuvvetli SS, Sandalli N. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary *mutans streptococci* and *lactobacilli*. *Int J Paediatr Dent* 2008;18:35-9.

13. Singh RP, Damle SG, Chawla A. Salivary *mutans streptococci* and *lactobacilli* modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. *Acta Odontol Scand* 2011;69(6):389-94.
14. Toiviainen A, Jalasvuori H, Lahti E, et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 on the number of salivary *mutans streptococci*, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin Oral Investig* 2015;19:77-83.
15. Chitprasert P, Sudsai P, Rodklongtan A. Aluminum carboxymethyl cellulose–rice bran microcapsules: Enhancing survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. *Carbohydr Polym* 2012;90(1):78-86.
16. Barouei J, Moussavi M, Hodgson DM. Effect of maternal probiotic intervention on HPA axis, immunity and gut microbiota in a rat model of irritable bowel syndrome. *PLoS ONE*. 2012; 7(10):e46051.
17. Messora MR, Oliveira LFF, Foureaux RC, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2013;84(12):1818-1826.
18. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotech* 1994;17(4):788-92.
19. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2010;55(2):142-7.
20. Furlaneto FA, Nunes NL, Oliveira Filho IL, et al. Effects of locally administered tiludronic acid on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2014;85(9):1291-301.
21. Messora MR, Pereira LJ, Foureaux R, et al. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2016;66:108-19.
22. Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Dent*. 2016.doi:10.1016/j.jdent.2016.03.002.
23. Martin-Cabezas, R., Davideau, J.-L., Tenenbaum, H. and Huck, O. Clinical efficacy of probiotic as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016.doi:10.1111/jcpe.12545.
24. Weichert S, Schroten H, Adam R. The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. *Pediatr Infect Dis* 2012;31(8):859-62.

25. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* 2013;7(5):1016-1025.
26. Aruni AW, Dou Y, Mishra A, Fletcher HM. The Biofilm Community-Rebels with a Cause. *Curr Oral Health Rep* 2015;2(1):48-56.
27. Hasegawa Y, Mans JJ, Mao S, et al. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species. *Infect Immun* 2007;75:2540-7.
28. Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, et al. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun* 2008;76:4163-4175.
29. Devine DA, Marsh PD, Meade J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *J Oral Microbiol* 2015;6(7):26941.
30. Kumar PS, Mason MR. Mouthguards: does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health? *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:35.
31. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2006;42:180-218.
32. Nissen L, Sgorbati B, Biavati B, Belibasakis GN. *Lactobacillus salivarius* and *L. gasseri* down-regulate *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* exotoxins expression. *Ann Microbiol* 2014 64(2):611-617.
33. Hajishengallis G, Lamont RJ. Dancing with the Stars: How choreographed bacterial interactions dictate nosymbiocity and give rise to keystone pathogens, accessory pathogens, and pathobionts. *Trends Microbiol.* 2016;doi: 10.1016/j.tim.2016.02.010.
34. Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpiński TM. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp* 2014;62(6):495-500.
35. Martins AK, Martins FS, Gomes DA, et al. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis var. lactis*. *Arch Microbiol* 2010;192:995-1003.
36. Čitar M, Hacin B, Tompa G, et al. Human intestinal mucosa-associated *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. *Benef Microbes* 2015;6(3):325-336.
37. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman R L, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.

38. Teles RP, Gursky LC, Faveri M, et al. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37:313-323.
39. Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol* 2010;2:5532.
40. Britton RA, Irwin R, Quach D, et al. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized Mouse Model. *J Cell Physiol* 2014;229:1822–1830.
41. Ohlsson C, Engdahl C, Fåk F, et al. Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e92368.
42. Parvaneh k, Ebrahimi M, Sabran MR, et al. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) increase bone mass density and upregulate SPARC and BMP-2 genes in rats with bone loss resulting from ovariectomy. *Biomed Res Int* 2015;ID:897639.
43. Wang WM, Ye P, Qian YJ, et al. Effects of whole cigarette smoke on human beta defensins expression and secretion by oral mucosal epithelial cells. *Tob Induc Dis* 2015;13(1):3.
44. Kuula H, Salo T, Pirilä E, et al. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol* 2008;53(2):175–186.
45. Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res* 2011;90:241–245.
46. Liu J, Chen J, Du X, Hu L, Chen L. The expression of hBDs in the gingival tissue and keratinocytes from healthy subjects and periodontitis patients. *Arch Oral Biol* 2014;59(2):193-8.
47. Dommisch H, Reinartz M, Backhaus T, Deschner J, Chung W, Jepsen S. Antimicrobial responses of primary gingival cells to *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 2012;39(10):913-22.
48. Varoga D, Tohidnezhad M, Paulsen F, et al. The role of human β -defensin-2 in bone. *J Anat* 2008;213(6):749-757.
49. Varoga D, Wruck CJ, Tohidnezhad M, et al. Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human β -defensin-3. *Histochem Cell Biol* 2009;131:207–218.
50. Kraus D, Deschner J, Jäger A, et al. Human β -defensins differently affect proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblast-like MG63 cells. *J Cell Physiol* 2012;227:994–1003.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Proportions of microbial complexes and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in groups EP and EP-HN019. (A) blue complex; (B) yellow complex; (C) green complex; (D) purple complex; (E) orange complex; (F) red complex; (G) grey complex; (H) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The colors represent different microbial complexes. (blue: *Actinomyces*; yellow: *Streptococcus*; green: *E. corrodens*, *C. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. ochracea*; purple: *V. parvula*, *A. odontolyticus*; orange: *S. constellatus*, *C. gracillis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. micros*, *F. nuc. vincentii*, *F. nuc. nucleatum*, *F. nuc. polymorphum*, *F. periodonticum*; red: *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*; grey: *E. saburreum*, *G. morbillorum*, *L. buccalis*, *P. acnes*, *P. melaninogenica*, *N. mucosa*, *S. anginosus*, *S. noxia*, *T. socranskii*). *Significant difference between groups (t-test, $P < 0.05$).

Figure 2 - Mean levels (pg/mL) and standard deviations of (A) IL-1 β , (B) IL-10, (D) RANKL and (E) OPG in groups C, C-HN019, EP and EP-HN019. IL-1 β /IL-10 and RANKL/OPG ratios are depicted in C and F. Different letters indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $P < 0.05$).

Figure 3 - Histopathological analysis. Photomicrographs of periodontal tissues in the furcation (A, B, D, E, G, H, J and K) and interproximal areas (C, F, I and L) of mandibular first molars: Group C (A-C); Group C-HN019 (D-F); Group EP (G-I); Group EP-HN019 (J-L). Hematoxylin and Eosin stain. Abbreviations and symbols: AB = alveolar bone; FR = furcation roof; FM = first molar; SM = second molar; not filled black arrow = blood vessel; black arrowhead = osteoblasts; asterisk = unorganized and detached collagen fibers and interstitial edema; white arrowhead = root cement with resorption areas; not filled black arrowhead = collagen fibers inserted both in cementum and in alveolar bone; black arrow = cemento enamel junction; white arrow = connective tissue attachment.

Figure 4 - Immunohistochemical analyses. Medians, interquartile range and maximum and minimum values of the immunolabeling scores for groups C, C-HN019, EP and EP-HN019 with comparisons among groups: (A) BD-1; (F) BD-2 and (K) BD-3. Different letters indicate significant differences between groups (Kruskal-Wallis, Dunn, $P < 0.05$). Photomicrographs showing immunolabeling for BD-1 (B-E), BD-2 (G-J) and BD-3 (L-O) in the furcation areas of mandibular first molars: Group C (B, G, L); Group C-HN019 (C, H, M); Group EP (D, I, N); Group EP-HN019 (E, J, O). Hematoxylin counterstaining. Abbreviations and symbols: PL = periodontal ligament; AB = alveolar bone; CT = connective tissue.

Figure 5 - Means and standard deviations of BV (A) BP (B), Tb.Sp (C) and ABL (D), as well as intergroup comparisons. Different letters indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $P < 0.05$). BV = bone volume; BP = bone porosity; Tb.Sp = trabecular Separation; ABL = alveolar bone level.

Figure 6 - Three-dimensional rendered reconstructions of the microtomographic sections of groups C (A, B), C-HN019 (C, D), EP (E, F) and EP-HN019 (G, H). Buccal view (A, C, E, G). Internal surface view, sagittal section (B, D, F, H). Pixel size = 7.96 μm .

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6