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

Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos do
probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* como
terapia adjuvante no tratamento não cirúrgico da
Periodontite Crônica: estudo clínico controlado e
aleatorizado.

MARCOS DE MENDONÇA INVERNICI

RIBEIRÃO PRETO

2018

MARCOS DE MENDONÇA INVERNICI

Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos do probiótico
Bifidobacterium animalis subsp. lactis como terapia adjuvante no
tratamento não cirúrgico da Periodontite Crônica: estudo clínico
controlado e aleatorizado.

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

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Versão corrigida

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

Invernici, Marcos de Mendonça.

Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* como terapia adjuvante no tratamento não cirúrgico da Periodontite Crônica: estudo clínico controlado e aleatorizado / Marcos de Mendonça Invernici ; orientador Michel Reis Messoria. - Ribeirão Preto, 2018.

175 f.: il.; 30cm

Versão corrigida da Tese(Doutorado). A versão original se encontra disponível na Unidade que se aloja o Programa.

1. Periodontite Crônica. 2. Probiótico. 3. Raspagem Dentária.

INVERNICI, M. M. **Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* como terapia adjuvante no tratamento não cirúrgico da Periodontite Crônica: estudo clínico controlado e aleatorizado:** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

•

*D*EDICO ESSE TRABALHO, À MINHA FAMÍLIA. MEUS PAIS LUIZ
ALEXANDRE (IN MEMORIAN) E JANE INVERNICI, MINHAS IRMÃS, SABRINA
E JULIANA QUE DURANTE TODA A MINHA VIDA ESTIVERAM COMIGO, NOS
MOMENTOS RUINS E NOS MOMENTOS BONS. PESSOAS QUE SÃO MINHA BASE
NA VIDA.

*M*INHA MARAVILHOSA ESPOSA E MÃE, MARIANA QUE SEMPRE
ME ACOMPANHOU, ABRINDO MÃO DE MUITOS PROJETOS PESSOAIS, MAS
QUE SEMPRE ACREDITOU NO CAMINHO POR MIM ESCOLHIDO E SEMPRE ME
APOIOU.

AGRADECIMENTOS

Primariamente queria agradecer a minha esposa Marina, por ter suportado muitas turbulências durante essa fase da minha vida, foram elas emocionais ou financeiras, mas que sempre estive ao meu lado apoiando, incentivando e acreditando nos meus princípios. Além de ser uma mãe maravilhosa da nossa filha Valentina, soube conciliar seu tempo entre nós.

Agradeço do fundo do meu coração a mulher mais forte que conheço, minha mãe, Jane Invernici que sempre me ajudou quando precisei e que durante esse período de 4 anos de doutorado suportou muitos acontecimentos dolorosos incluindo a perda do meu querido pai Luiz Alexandre, que com certeza está orgulhoso e estaria presente nesse momento. As minhas irmãs Sabrina e Juliana por me apoiarem e ajudarem em todos os sentidos.

Não teria como não ter um agradecimento especial ao meu orientador e amigo Prof. Michel Reis Messoria, pela confiança em levar seu nome em trabalhos realizados aqui no país e no exterior. Pelos vários ensinamentos científicos passados, agregando isso a minha carreira como pesquisador/professor, bem como conselhos pessoais para a minha vida. Agradeço pela paciência, pelas oportunidades que me proporcionou, pelas várias discussões de artigos, metodologias, tabelas, painéis e estatística que tivemos. Sempre aprendi muitas coisas com essas conversas. Tenho muito respeito por você como amigo e como pesquisador. Obrigado!

À Profa. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto pelo auxílio em várias etapas no curso do doutorado e do projeto de pesquisa.

Gostaria de agradecer a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-graduação de Periodontia (PPG-Perio) por serem minha casa durante esse período importante na minha vida.

Aos Profs. do PPG-Perio, Sérgio Scombatti, Daniela Palioto, Mário Taba e Arthur Belém Novaes por terem me passado um pouco dos seus conhecimentos, e sempre estarem dispostos a esclarecer minhas dúvidas.

À Universidade de Guarulhos em especial a técnica Izilvania por ter realizado o microbiológico.

Aos Profs. Renato Casarin e Edilson Ervolino por terem me ajudado e ensinado sobre Multiplex e Imunohistoquímica, com amostras relacionadas a tese.

Ao Prof. Sérgio Salvador pelos ensinamentos e discussões relacionadas ao mundo bacteriano, que serviu como base no período que passei no exterior, além das conversas amigáveis relacionada a pesca.

À Universidade de Turku, Finlândia por ter me recebido de portas abertas.

Aos Profs. Seppo Salminen, Arthur Ouwehand e Gabriel Vinderola que me ajudaram em alguns experimentos paralelos a tese, além da preocupação com o bem-estar e toda atenção dada a minha família durante o período sanduíche.

Agradeço a empresa Dupont-Danisco pela doação do probiótico usado na pesquisa.

À farmácia doce erva pela manipulação das pastilhas.

Ao meu amigo braço direito que sei que sempre posso contar, Uislen Cadore que me ajudou em todas as circunstâncias imagináveis tanto profissional como familiar. Não tenho palavras pela gratidão.

Aos meus amigos da pós-graduação que me ajudaram diretamente na tese, Luiz Fernando, Pedro Henrique, Mariana Sales muito obrigado pelo auxílio. E para outros mestrandos e doutorandos que não foram menos importantes e fazem parte da minha vida, Kleber, Sergio Lago, Gabriel, Felipe Torres,

Paulinha, Cris, Kelly, Felipe, Nicolly entre outros, obrigado pela amizade e ajuda.

Aos Funcionários da FORP, Maria Izabel na secretária com a papelada, Milla e Fábiola que me ajudaram com as amostras, inclusão e pcr. Dani uma pessoa essencial na clínica, obrigado por tudo.

À Capes e ao CNPq pelo auxílio financeiro durante meu doutorado tanto na pesquisa como no sanduíche, que me proporcionou experiências incríveis e crescimento profissional. Muito obrigado.

“IDEIAS ASSIM COMO PESSOAS, SÓ SE
DESENVOLVEM QUANDO ESTÃO LIVRES”

(AUTOR DESCONHECIDO)

RESUMO

RESUMO

INVERNICI, M. M. **Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* como terapia adjuvante no tratamento não cirúrgico da Periodontite Crônica: estudo clínico controlado e aleatorizado.** 2018. 175 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O propósito deste estudo foi avaliar o efeito adjuvante da terapia probiótica (TProb) no tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes com Periodontite Crônica generalizada (PCg). Em um estudo clínico aleatorizado, duplo-cego e placebo-controle, 41 pacientes com PCg foram tratados com TProb associada à raspagem e alisamento radicular (RAR – Grupo Teste) ou apenas RAR (Grupo Controle). Os pacientes do Grupo Teste consumiram pastilhas contendo *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) HN019 durante 4 semanas. Os pacientes do Grupo Controle receberam pastilhas placebo (sem probiótico). Parâmetros clínicos periodontais foram avaliados no *baseline* (período pré-intervenção) e em 30 e 90 dias após a RAR. Nestes mesmos períodos foram coletadas amostras de placa subgengival para contagem de 40 espécies bacterianas (*checkerboard DNA-DNA hybridization*) e detecção do genoma de *B. lactis* HN019 (Reação em cadeia da polimerase em tempo real - q-PCR), amostras do fluido crevicular gengival para avaliação dos níveis de Interleucina (IL)-1beta, IL-8 e IL-10 (Imunoensaios *multiplex*) e amostras de saliva para avaliação dos níveis de Imunoglobulina A (IgA) (Nefelometria). Foram realizadas, também, biópsias de tecido gengival para determinação da expressão de beta-defensina (BD)-3 e receptores do tipo *Toll* (TLR)-4 (reações imunohistoquímicas - estreptavidina-biotina-peroxidase). Os dados obtidos foram estatisticamente analisados ($p < 0,05$). O Grupo Teste apresentou, aos 90 dias, redução de profundidade de sondagem (PS) e ganho de inserção clínica significativamente maiores que aqueles do Grupo Controle. O Grupo Teste também apresentou menor quantidade de bolsas periodontais moderadas (aos 30 e 90 dias) e profundas (aos 90 dias) que o Grupo Controle ($p < 0,05$), bem como menor quantidade de pacientes ($p < 0,05$) apresentando 3 ou mais sítios com PS ≥ 6 mm ou PS = 5mm e sangramento à sondagem (SS) positivo. O Grupo Teste apresentou menor SS (aos 30 e 90 dias) e menor IP (aos 30 dias) quando comparado ao Grupo

Controle ($p<0,05$). Na análise microbiológica, o Grupo Teste apresentou proporções significativamente menores de espécies microbianas dos complexos vermelho (ao 30 e 90 dias) e do complexo laranja (aos 30 dias), bem como maiores proporções de espécies do complexo azul (aos 90 dias) quando comparado ao Grupo Controle. A análise por meio de q-PCR mostrou que o Grupo Teste apresentou um aumento no número de cópias/ μL do genoma da cepa probiótica *B. lactis* HN019 no biofilme subgengival aos 30 e 90 dias ($p<0,05$). Na análise imunológica, o Grupo Teste apresentou menor razão (valores ajustados ao *baseline*) de IL-1 β (aos 30 e 90 dias) e de IL-8 (aos 30 dias) do que o Grupo Controle ($p<0,05$). Apenas o Grupo Teste apresentou valores de IL-10 significativamente maiores que aqueles do *baseline* aos 30 dias. Não foram observadas diferenças entre os grupos nas razões de IgA aos 30 e 90 dias. Na análise imunohistoquímica, o Grupo Teste apresentou expressões significativamente maiores de BD-3 e TLR-4 em sítios doentes quando comparado ao Grupo Controle aos 30 dias. Pode-se concluir que a utilização do probiótico *B. lactis* HN019 como recurso adjuvante à RAR promove benefícios clínicos, microbiológicos e imunológicos adicionais no tratamento de pacientes com PCg.

Palavras-chave: Periodontite Crônica; Probiótico; Raspagem Dentária.

ABSTRACT

ABSTRACT

INVERNICI, M.M. **Clinical, microbiological and immunological effects of probiotic *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* as adjuvant therapy in the non-surgical treatment of Chronic Periodontitis: a randomized controlled clinical trial.** 2018. 175 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The purpose of this study was to evaluate the adjuvant effect of probiotic therapy (ProbT) in non-surgical periodontal treatment in patients with generalized chronic periodontitis (GCP). In this randomized, double-blind, placebo-control, 41 patients with GCP were treated with ProbT associated with scaling and root planing (SRP - Test Group) or SRP only (Control Group). The patients in the Test Group consumed lozenges containing *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) HN019 during 4 weeks. The patients in the Control Group received placebo (lozenges without probiotic). Periodontal clinical parameters were evaluated at baseline (pre-intervention) and at 30 and 90 days after SRP. Samples of subgingival plaque were collected to count 40 bacterial species (checkerboard DNA-DNA hybridization) and detection of genome of *B. lactis* HN019 (polymerase chain reaction in real time - q-PCR). Gingival crevicular fluid samples were collected for assessing levels of interleukin (IL)-1 β , IL-8 and IL-10 (multiplex immunoassays). Saliva samples were collected to measure levels of immunoglobulin A (IgA) (nephelometry). Also, biopsies of gingival tissues were performed to determine the expression of beta-defensin (BD)-3 and Toll-Like receptors (TLR)-4 (immunohistochemical reactions - streptavidin-biotin-peroxidase). The data obtained were statistically analyzed ($p < 0.05$). The Test Group presented, at 90 days, reduction of probing pocket depth (PPD) and clinical attachment gain significantly higher when compared to the Control Group. The Test Group also presented a lower number of moderate (at 30 and 90 days) and deep (90 days) periodontal pockets than the Control Group ($p < 0.05$), as well as a lower number of subjects ($p < 0.05$) with 3 or more sites with $PPD \geq 6$ mm or $PPD = 5$ mm and bleeding on probing (BOP) positive. The Test Group presented lower BOP (at 30 and 90 days) and lower PI (at 30 days) when compared to the Control Group ($p < 0.05$). In the microbiological analysis, the Test Group showed

significantly lower proportions of microbial species of red (at 30 and 90 days) and the orange (at 30 days) complexes, as well as higher proportions of species of blue complex (at 90 days) when compared to the Control Group. q-PCR analysis showed that the Test Group presented an increase in the number of copies/ μ L of the genome of the probiotic strain *B. lactis* HN019 in subgingival biofilm at 30 and 90 days ($p < 0.05$). In the immunological analysis, the Test Group presented a lower ratio of IL-1 β (at 30 and 90 days) and IL-8 (30 days) than the Control Group ($p < 0.05$). Only the Test Group presented values of IL-10 significantly higher than those of the baseline at 30 days. No differences were observed between the groups on the ratios of IgA at 30 and 90 days. In the immunohistochemical analysis, the Test Group showed significantly higher expression of BD-3 and TLR-4 in sites with periodontitis when compared to the Control Group at 30 days. It can be concluded that the use of probiotic *B. lactis* HN019 as an adjuvant to SRP promotes clinical, microbiological and immunological additional benefits in the treatment of patients with GCP.

Keywords: Chronic Periodontitis; Probiotic; Scaling and Root Planing.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma do estudo clínico.....	64
Figura 2 -	Níveis de IL-8 (A), IL-1 β (B), IL-10 (C) e IgA (D) dos grupos Teste e Controle no <i>baseline</i> e aos 30 e 90 dias pós-operatórios. As mudanças médias dos níveis das citocinas e imunoglobulina analisadas em relação aos valores obtidos no <i>baseline</i> para os grupos Teste e Controle podem ser observadas em E-H. *Valores do Grupo Teste significativamente maiores que aqueles do <i>baseline</i> (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, $p < 0,05$). †Valores do Grupo Controle significativamente maiores que aqueles do <i>baseline</i> (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, $p < 0,05$). ‡Diferença significativa entre os grupos em um mesmo período de análise (Teste t de Student, $p < 0,05$).....	70
Figura 3 -	Médias da contagem total ($\times 10^5$) das 40 espécies subgengivais em bolsas periodontais moderadas ao longo do período experimental para os grupos Teste e Controle, bem como mudanças nas contagens médias de cada espécie bacteriana aos 90 dias em relação aos valores obtidos no <i>baseline</i> . Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas. Diferenças significativas (*30 dias e #90 dias) quando comparado ao <i>baseline</i> (Teste de Friedman). &Diferença significativa entre os grupos aos 90 dias (Teste Mann-Whitney).....	72
Figura 4 -	Médias da contagem total ($\times 10^5$) das 40 espécies subgengivais em bolsas periodontais profundas ao longo do período experimental para os grupos Teste e Controle, bem como mudanças nas contagens médias de cada espécie bacteriana aos 90 dias em relação aos valores obtidos no <i>baseline</i> . Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas. Diferenças	

	significativas (*30 dias e #90 dias) quando comparado ao <i>baseline</i> (Teste de Friedman). &Diferença significativa entre os grupos aos 90 dias (Teste Mann-Whitney).....	73
Figura 5 -	Proporções médias dos complexos microbianos presentes nos indivíduos dos grupos Teste e Controle nos diferentes períodos experimentais, bem como os resultados das comparações intra e intergrupos. As cores representam os diferentes complexos microbianos (SOCRANSKY et al. 1998). Letras diferentes indicam diferenças significativas em cada grupo ao longo dos tempos experimentais (Teste de Friedman, Dunn). A significância da diferença entre os grupos em um mesmo período de análise foi determinada usando o Teste Mann-Whitney (Diferenças significativas aos **30 dias e ##90 dias).....	74
Figura 6 -	Número médio ($\times 10^2$) de cópias/ μ L do genoma de <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> HN019 nas amostras de biofilme subgengival dos grupos Teste e Controle no <i>baseline</i> e aos 30 e 90 dias pós-operatórios, bem como os resultados das comparações intra e intergrupos. Os desvios-padrão observados estão representados em números absolutos sobre as barras do gráfico. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas em cada grupo ao longo dos tempos experimentais (Teste de Friedman, Dunn, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos em um mesmo período de análise (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$).....	75
Figura 7 -	Medianas, desvios interquartílicos e valores máximos e mínimos dos escores atribuídos para o padrão de imunomarcacão de BD-3 e TLR-4 nos grupos Teste e Controle em sítios saudáveis e doentes no <i>baseline</i> e aos 30 dias pós-operatórios, bem como os resultados das comparações intra e intergrupos. *Diferença significativa (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0,05$).....	76

Figura 8 - Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcação para BD-3 em biópsias gengivais de sítios saudáveis (**A-D**) e doentes (**E-H**) nos grupos Teste (**B, D, F, H**) e Controle (**A, C, E, G**). Setas = Células positivas para BD-3; ep = Tecido Epitelial; ct = Tecido Conjuntivo. Escala = 25 μ m. Contra-coloração: Hematoxilina..... 78

Figura 9 - Fotomicrografias mostrando o padrão imunomarcação para TLR-4 em biópsias gengivais (tecido conjuntivo) de sítios saudáveis (**A-D**) e doentes (**E-H**) nos grupos Teste (**B, D, F, H**) e Controle (**A, C, E, G**). Setas = Células positivas para TLR-4. Escala = 25 μ m. Contra-coloração: Hematoxilina..... 79

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação das cepas bacterianas avaliadas na análise microbiológica por meio do <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	53
Tabela 2 -	Características demográficas da amostra no <i>baseline</i> de acordo com os grupos experimentais	65
Tabela 3 -	Médias e desvio-padrão dos parâmetros clínicos (PS, NIC, RG, IP, SS) observados nos grupos Teste e Controle, bem como o número de bolsas moderadas e profundas detectadas ao longo do estudo (<i>baseline</i> , 30 e 90 dias pós-operatórios) e as mudanças nos valores de PS ocorridas em bolsas moderadas e profundas (diagnosticadas no <i>baseline</i>) aos 90 dias após a RAR.....	66
Tabela 4 -	Frequências absolutas e relativas de indivíduos apresentando baixo (≤ 4 sítios com $PS \geq 5$ mm), moderado (5-8 sítios com $PS \geq 5$ mm) e alto (≥ 9 sítios com $PS \geq 5$ mm) risco para progressão da periodontite, bem como 0, 1-2 ou ≥ 3 sítios com necessidade de terapia adicional.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BANA	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
BD	Beta-defensina
CARAT	<i>Council for Appropriate and Rational Antibiotic Therapy</i>
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Imunoensaio enzimático
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FCG	Fluido crevicular gengival
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Grama
g/mL	Grama/mililitro
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
IP	Índice de placa
JCE	Junção cimento-esmalte
LPS	Lipopolissacarídeo
Mb	Megabases
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama/decilitro
mg/mL	Miligrama/mililitro
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases da matriz
MRS	<i>Man, Rogosa and Sharpe</i>
NAM	Ácido N-acetil murâmico
NIC	Nível de inserção clínico
ng	Nanograma
ng/dL	Nanograma/decilitro
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
nm	Nanômetros
OPG	Osteoprotegerina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
pg/mL	Picograma/mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
PHO	Programa de higiene oral
PS	Profundidade de Sondagem
PCR	Reação em cadeia da polimerase
q-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RANK-L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-beta
RAR	Raspagem e alisamento radicular
RG	Recessão gengival
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
spp	Várias espécies
SS	Sangramento à sondagem
SSC	Solução salina citratada

TE	Tris-EDTA
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TPNC	Terapia periodontal não cirúrgica
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
UFC	Unidades formadoras de colônia
UNG	Universidade de Guarulhos
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i>
μg	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma/mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
fg	Fentograma

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Menos
%	Por cento
°C	Graus Celsius
+	Mais
<	Menor
=	Igual
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
CO ₂	Dióxido de carbono
g	Unidade de aceleração
H ₂	Hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
M	Concentração molar
n	Tamanho da amostra
N ₂	Nitrogênio
NA ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
<i>p</i>	Probabilidade de significância
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Z	Conjunto de números inteiro
α	Alfa
δ	Delta
σ	Desvio padrão
β	Beta

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	105
Anexo 2-	Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	107
Anexo 3 -	Artigo científico submetido para publicação no periódico Journal of Clinical Periodontology.....	108
Anexo 4 -	Artigo científico submetido para publicação no periódico Clinical Oral Investigations.....	140

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	35
2	PROPOSIÇÃO	44
2.1	Objetivo Geral.....	45
2.2	Objetivos Específicos.....	45
3	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1	Consentimento para a pesquisa	47
3.2	Cálculo do tamanho da amostra	47
3.3	Seleção dos pacientes	47
3.4	Delineamento do estudo, ocultação da alocação e protocolo de tratamento.....	48
3.5	Calibração do examinador.....	50
3.6	Monitoramento clínico.....	50
3.7	Monitoramento imunológico	51
3.7.1	Coleta de fluido crevicular gengival (FCG).....	51
3.7.2	Coleta de saliva.....	52
3.8	Monitoramento microbiológico	52
3.8.1	Checkerboard DNA-DNA hybridization.....	54
3.8.2	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR) – Quantificação absoluta.....	56
3.9	Biópsias gengivais e análise imunohistoquímica.....	58
3.10	Variáveis de resultado.....	59
3.11	Análise estatística.....	60
3.11.1	Parâmetros clínicos.....	60

3.11.2	Parâmetros microbiológicos.....	61
3.11.3	Parâmetros imunológicos.....	62
3.11.4	Parâmetros imunohistoquímicos.....	62
4	RESULTADOS	63
4.1	Monitoramento clínico	65
4.2	Monitoramento imunológico.....	68
4.3	Monitoramento microbiológico.....	71
4.3.1	<i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	71
4.3.2	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR) – Quantificação absoluta.....	75
4.4	Biópsias gengivais e análise imunohistoquímica.....	76
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÃO.....	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	93
	ANEXOS.....	105

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial. Participam da sua patogênese microrganismos e diversos fatores (genéticos, ambientais e sistêmicos) que podem modificar sua expressão e a susceptibilidade do indivíduo ao seu desenvolvimento (OFFENBACHER, 1996). A periodontite caracteriza-se por um processo imunoinflamatório que atinge o tecido de suporte dentário e promove destruição do osso alveolar em resposta a um acúmulo de biofilme bacteriano (LOESCHE; GROSSMAN, 2001). Em um levantamento epidemiológico realizado nos Estados Unidos da América pelo *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), foi demonstrado que 47% da amostra examinada, representando 64,7 milhões de adultos, apresentava periodontite nas formas leve (8,7%), moderada (30%) e severa (8,9%) (EKE et al., 2012).

A Raspagem e alisamento radicular (RAR) é a terapia 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 periodontite. Nestas situações, a recolonização de bactérias periodontopatogênicas e a recorrência da doença são bastante comuns (BEREZOW; DARVEAU, 2011). Considerando as limitações da RAR no tratamento da periodontite (BEREZOW; DARVEAU, 2011), novas terapias adjuvantes estão sendo estudadas para potencializar o resultado do tratamento mecânico, como a antibioticoterapia, a terapia fotodinâmica antimicrobiana e a terapia probiótica. Dentre elas, a antibioticoterapia apresenta histórico com maior número de estudos clínicos controlados que investigaram seus efeitos adjuvantes no tratamento da periodontite.

Segundo o Conselho para Terapia Antibiótica Apropriada e Racional (*Council for Appropriate and Rational Antibiotic Therapy* - CARAT), 5 critérios devem servir de guia para seleção de um regime antibiótico: uso baseado somente com evidências de resultados, benefícios da terapia, segurança do uso do antibiótico, tempo e relação custo/benefício do uso do antibiótico (SLAMA et al., 2005). Quando esses critérios são aplicados no contexto de tratamento da periodontite, há razoável evidência para afirmar que o uso de antibióticos como recurso adjuvante na terapia periodontal não cirúrgica (TPNC) promove ganho adicional de inserção clínica, sendo seus benefícios maiores em bolsas profundas e em pacientes com Periodontite Agressiva (HERRERA et al., 2002; SGOLASTRA et al., 2012; FERES et al., 2012; ZANDBERGEN et al., 2013; SALEH et al., 2016; COSGAREA et al., 2016). Contudo, é importante considerar que a antibioticoterapia promove efeitos colaterais indesejáveis, como náusea, vômito,

distúrbios intestinais e, até mesmo, resistência bacteriana, afetando o prognóstico do tratamento se não usada corretamente (JEPSEN; JEPSEN, 2016).

O uso de probióticos como uma nova terapia adjuvante para a periodontite tem despertado o interesse da comunidade científica odontológica nos últimos anos. A terapia probiótica pode proporcionar vantagens que não são observadas quando antibióticos são associados à RAR (BEREZOW; DARVEAU, 2011), pois não promove resistência bacteriana e pode interferir naturalmente na resposta imunoinflamatória local e sistêmica do hospedeiro.

O termo probióticos foi introduzido por Lilly e Stillwell em 1965. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO) e a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* - WHO) definiram probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Esta definição restringe a utilização da palavra probiótico a produtos que possuem microrganismos vivos e aponta a necessidade de se proporcionar uma dose adequada de bactérias probióticas para que os efeitos desejáveis possam ocorrer.

Evidências crescentes têm mostrado que 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; MESSORA et al., 2017).

Para que microrganismos sejam considerados probióticos, Martinez et al. (2015) estabeleceram alguns critérios, como: 1 – embora algumas cepas probióticas comercialmente disponíveis não sejam de origem humana, acredita-se que, se um probiótico é isolado do trato gastrointestinal de seres humanos, ele é seguro para consumo humano e pode ser mais efetivo no ecossistema intestinal; 2 – culturas probióticas devem ser reconhecidas como seguras (estado GRAS - geralmente reconhecido como seguro) para consumo humano por meio de evidências científicas ou experimentos baseados na história do consumo por um número significativo de pacientes. Neste contexto, bactérias dos gêneros *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* têm uma longa história de consumo

seguro, sem qualquer efeito deletério relatado; 3 – microrganismos probióticos devem estar viáveis e ativos nos veículos aos quais são incorporados; 4 – microrganismos probióticos devem possuir resistência aos sucos gástricos e intestinais, já que o baixo pH é um dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra microrganismos ingeridos; 5 – microrganismos probióticos devem possuir uma adesão em células intestinais humanas e mucinas intestinais, o que favorecerá a persistência e o crescimento dos mesmos no intestino, garantindo a exclusão competitiva de patógenos potenciais da superfície da mucosa; 6 – as bactérias probióticas devem produzir substâncias antimicrobianas contra patógenos intestinais para restaurar a composição da microbiota saudável; 7 – microrganismos probióticos devem ser seguros quando ingeridos por indivíduos imunocomprometidos; 8 – os probióticos precisam ter sua segurança e eficácia estabelecidas por meio de estudos clínicos aleatorizados e placebo-controlados (MESSORA et al., 2017).

Em se tratando de um microrganismo no ambiente bucal, algumas outras propriedades são determinantes para que o mesmo possa desencadear efeitos benéficos ao hospedeiro, sendo assim um potencial probiótico (MESSORA et al., 2017). O objetivo de uma terapia probiótica é a substituição de agentes patogênicos nocivos residentes por outras bactérias não patogênicas (MESSORA et al., 2017). Para isso, é necessário que o probiótico apresente atividade antagonista contra os patógenos a serem substituídos no ambiente bucal, bem como uma alta capacidade de colonização do ambiente, resistindo às condições ambientais e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (BOSCH et al., 2012; STAMATOVA et al., 2009). É essencial que os candidatos probióticos mostrem capacidade de adesão às superfícies bucais revestidas com saliva, capacidade de formação de biofilmes, alta sobrevivência nas condições bucais e ausência de produção de compostos capazes de ocasionarem mal odor bucal (BOSCH et al., 2012). Além disso, a potencial cepa não deve demonstrar toxicidade, ser incapaz de espalhar genes resistentes a antibióticos e não promover o desenvolvimento de cáries (BOSCH et al., 2012). As cepas também devem ser de origem humana e preferencialmente isoladas do meio bucal, desde que podem funcionar melhor em um ambiente semelhante ao local onde foram originalmente isoladas (BOSCH et al., 2012).

A dose suficiente de bactérias probióticas para promover benefícios à saúde varia dependendo da cepa e do produto. De modo geral, produtos contendo microrganismos probióticos devem ter um número mínimo de células viáveis, com eficácia comprovada, estabelecida com base em estudos clínicos, variando entre 10^6 e 10^8 unidades formadoras

de colônia por grama (UFC)/g do produto final (CHAMPAGNE et al., 2011). A legislação brasileira recomenda uma dosagem mínima variando de 10^8 a 10^9 UFC/dia no produto alimentício para se obter benefícios na saúde intestinal (MARTINEZ et al., 2015). Um número similar de células viáveis probióticas (10^9 UFC) por porção, consumido diariamente, também é recomendado pelos Ministérios da Saúde do Canadá e da Itália (MARTINEZ et al., 2015). No que se refere ao ambiente bucal, não existe um consenso sobre a dose ideal para os efeitos benéficos de probióticos.

A visão atual sobre a etiologia da inflamação periodontal relacionada ao biofilme considera três fatores que determinam se a doença se desenvolverá em um sujeito (TEUGHEL et al., 2008): 1) suscetibilidade do hospedeiro; 2) presença de bactérias periodontopatogênicas; 3) redução ou ausência das chamadas bactérias benéficas. Do ponto de vista teórico, a restauração destes números reduzidos de bactérias benéficas por meio de probióticos pode ser de interesse considerável no tratamento de doenças periodontais relacionadas a biofilmes. Os probióticos podem não apenas suprimir a emergência de patógenos endógenos ou impedir a superinfecção com patógenos exógenos, mas também proteger o hospedeiro por meio da promoção de uma resposta imunoinflamatória benéfica (TEUGHEL et al. 2008).

A cavidade oral, tem sido sugerida como um alvo relevante para as aplicações dos probióticos (MEURMAN, 2005). Foi sugerido que os mecanismos de ação dos probióticos na cavidade bucal parecem ser semelhantes àqueles descritos para estabelecer o equilíbrio da flora intestinal (HAUKIOJA, 2010). Estes mecanismos podem ser uma alternativa para o tratamento da periodontite. Um estudo de “prova de conceito” mostrou que uma mistura de espécies de *Streptococcus* aplicada em dentes de cães com periodontite, associada à RAR, atrasou a recolonização de patógenos periodontais e reduziu a inflamação (TEUGHEL et al., 2007). Este estudo apresentou o conceito de recolonização guiada de bolsas periodontais mediante o uso de probiótico como uma estratégia de tratamento para a periodontite.

As bactérias usadas como probióticos podem ter efeitos sobre os patógenos periodontais, afetando seu crescimento, adesão e colonização (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). Bactérias probióticas podem produzir diversos componentes, tais como ácido lático, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e outras substâncias inibitórias que atuam como agentes antimicrobianos (GILLOR et al., 2008; GORDON, 2009; OELSCHLAEGER, 2010). Outro mecanismo sugerido para explicar a ação dos probióticos no tratamento da periodontite refere-se à modulação da resposta

imunoinflamatória do hospedeiro (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). Alguns estudos demonstraram que determinadas espécies de bactérias probióticas podem diminuir a expressão de interleucina (IL)-8 induzida por periodontopatógenos nas células epiteliais bucais (COSSEAU et al., 2008; ZHANG et al., 2008; SLIEPEN et al., 2009) e reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) presentes no fluido crevicular gengival (FCG) (TWETMAN et al., 2009).

Até o momento, apenas cinco estudos clínicos relataram resultados positivos dos efeitos adjuvantes da terapia probiótica, administrada por meio de pastilhas ou comprimidos, no tratamento da periodontite (VIVEKANANDA et al., 2010; SHAH et al. 2013; TEUGHEL et al., 2013; INCE et al. 2015; TEKCE et al., 2015). Vivekananda et al. (2010) avaliaram os efeitos adjuvantes do probiótico *Lactobacillus reuteri* à RAR no tratamento de pacientes com Periodontite Crônica. Os indivíduos deste estudo consumiram pastilhas contendo 1×10^8 UFC de *L. reuteri*, 2 vezes ao dia, durante 21 dias. Os autores concluíram que o uso de *L. reuteri* pode ser recomendado durante a TPNC e na fase de manutenção do tratamento periodontal, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e inibitórios na formação da placa bacteriana. Esses resultados benéficos também foram encontrados por Teughels et al. (2013), os quais demonstraram que o uso da mesma cepa probiótica reduziu o risco de progressão da periodontite e o número de pacientes indicados para a terapia periodontal cirúrgica. Shah et al. (2013) avaliaram o uso do probiótico *Lactobacillus brevis* CD2 e da doxiciclina, associados ou não, no tratamento não cirúrgico de pacientes com Periodontite Agressiva. Os pacientes pertencentes ao grupo da terapia probiótica deste estudo consumiram 10^8 UFC de *L. brevis* CD2, 2 vezes ao dia, durante 14 dias após a RAR. Todos os pacientes foram acompanhados por 2 meses. Os parâmetros clínicos periodontais analisados no grupo de pacientes que fez o uso de *L. brevis* CD2 não associado à doxiciclina foram semelhantes àqueles de pacientes tratados apenas com doxiciclina ou doxiciclina combinada com probiótico. Os autores concluíram que a terapia com probióticos pode ser uma boa alternativa para o uso de antibióticos no tratamento dessa condição periodontal. Ince et al. (2015) avaliaram os efeitos clínicos e bioquímicos resultantes do uso adjuvante de *L. reuteri* à RAR no tratamento de pacientes com Periodontite Crônica. A terapia combinada (RAR + *L. reuteri*) proporcionou maior redução de bolsas periodontais e maior ganho de inserção clínica aos 12 meses pós-operatórios quando comparada ao uso isolado da RAR. Os pacientes tratados com a terapia combinada também apresentaram menores níveis de metaloproteinases da matriz (MMP)-8 e aumento de inibidor de

metaloproteinase tecidual no fluido crevicular gengival (FCG). Tecke et al. (2015) avaliaram os efeitos do uso adjuvante de pastilhas contendo 10^8 UFC de *L. reuteri*, 2 vezes ao dia, durante 3 semanas após a RAR no tratamento de pacientes com Periodontite Crônica. Todos os parâmetros clínicos periodontais avaliados aos 21, 90 e 180 dias pós-operatórios estavam melhores no grupo de pacientes tratados com RAR e *L. reuteri* quando comparado ao grupo de pacientes tratados apenas com RAR. As avaliações microbiológicas demonstraram que os pacientes do grupo tratado com RAR e probiótico, aos 180 dias pós-operatórios, ainda apresentavam menor quantidade de microrganismos anaeróbios estritos no biofilme subgengival quando comparado àqueles tratados apenas com RAR. Os autores concluíram que a utilização do *L. reuteri* como terapia adjuvante à RAR pode retardar a recolonização de bolsas periodontais em pacientes com Periodontite Crônica.

O uso de microrganismos probióticos em enxaguatórios bucais e em soluções para irrigação subgengival também proporcionou resultados satisfatórios como terapia adjuvante no tratamento da Periodontite Crônica (PENALA et al., 2016; TSUBURA et al., 2009). Penala et al. (2016) realizaram um estudo clínico controlado envolvendo 32 pacientes com Periodontite Crônica. Após a realização da RAR, os indivíduos foram aleatoriamente alocados nos grupos Teste ou Controle. Os indivíduos do Grupo Teste receberam 4 irrigações subgengivais e enxaguatórios bucais contendo *Lactobacillus salivarius* e *L. reuteri* durante 15 dias. No Grupo Controle, os indivíduos receberam irrigação subgengival e enxaguatórios bucais sem probióticos (placebo). O Grupo Teste, aos 3 meses pós-operatórios, apresentou índice de placa (IP), índice gengival modificado e índice de sangramento significativamente melhores que aqueles do Grupo Controle. Considerando as bolsas periodontais moderadas, uma maior redução de profundidade de sondagem (PS) foi observada no Grupo Teste quando comparado ao Grupo Controle. Os indivíduos tratados com probióticos também apresentaram maior redução microbiológica avaliada pelo teste do N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida (BANA) quando comparados àqueles que não consumiram probióticos. Tsubura et al. (2009) avaliaram os efeitos adjuvantes de enxaguatórios bucais contendo *Bacillus subtilis* no tratamento da Periodontite Crônica. Neste estudo clínico controlado e aleatorizado, os indivíduos foram tratados com RAR e fizeram uso de enxaguatórios contendo ou não probióticos do gênero *Bacillus* durante 30 dias. Os indivíduos que fizeram p uso da solução contendo microrganismos probióticos apresentaram escores do teste BANA significativamente menores que aqueles que fizeram uso da solução placebo.

É importante ressaltar que os resultados obtidos com a utilização de microrganismos probióticos não podem ser generalizados, uma vez que, dentre outros fatores, dependem da cepa bacteriana utilizada. Alguns estudos utilizando bactérias dos gênero *Streptococcus* e *Lactobacillus rhamnosus* (LALEMAN et al., 2015; MORALES et al., 2016) não observaram efeitos adicionais do uso adjuvante da terapia probiótica no tratamento da Periodontite Crônica.

Até o presente momento, os estudos que investigaram os efeitos de probióticos nas doenças periodontais usaram principalmente microrganismos do gênero *Lactobacillus*. Contudo, outros potenciais probióticos merecem ser investigados. Hojo et al. (2007a) avaliaram a distribuição de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em pacientes saudáveis ou com periodontite. Entre as 11 espécies de *Lactobacillus* detectadas na saliva, nenhuma espécie foi especificamente associada com saúde periodontal. Contrariamente, os autores observaram que espécies e contagens de *Bifidobacterium* podem estar associadas com saúde periodontal e com o progresso do tratamento em pacientes com periodontite. Em um estudo *in vitro*, Jasberg et al. (2016) demonstraram que espécies do gênero *Bifidobacterium* podem integrar-se bem no biofilme subgengival e são capazes de reduzir significativamente o número de *Porphyromonas gingivalis*. Apenas três estudos avaliaram o efeito *in vivo* de bactérias do gênero *Bifidobacterium* na doença periodontal.

Oliveira et al. (2017) investigaram os efeitos da administração tópica de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) HN019 na periodontite experimental em ratos. As análises microtomográficas realizadas demonstraram que os animais com periodontite induzida por ligadura e tratados por meio de irrigações subgengivais com microrganismos probióticos (Grupo Teste) apresentaram menores porosidade óssea, separação de trabéculas ósseas e perda de inserção conjuntiva, bem como maior volume ósseo que os animais que receberam irrigações subgengivais com uma solução sem probióticos (Grupo Controle). No Grupo Teste, as amostras de biofilme coletadas apresentaram maiores proporções de espécies semelhantes a *Actinomyces* e *Streptococcus* (espécies compatíveis com saúde periodontal), bem como menores proporções de espécies semelhantes à *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens* e *Prevotella intermedia* (espécies envolvidas na patogênese da periodontite) quando comparadas àquelas do Grupo Controle. As análises de amostras de biofilme por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) confirmaram a presença da cepa probiótica HN019 nos animais do Grupo Teste. Considerando o perfil imunoinflamatório

dos animais, o Grupo Teste apresentou maior expressão de osteoprotegerina (OPG) e de beta-defensina (BD), bem como menores níveis de IL-1 β e do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta (RANK-L) nos tecidos gengivais quando comparado ao Grupo Controle.

Ricoldi et al. (2017) avaliaram os efeitos de *B. lactis* HN019 como terapia adjuvante à RAR em ratos com periodontite experimental. Os animais tratados com *B. lactis* HN019 e RAR apresentaram menores reabsorção óssea alveolar e perda de inserção, bem como menor número de osteoclastos, maiores níveis de citocinas anti-inflamatórias e menores níveis de citocinas pró-inflamatórias quando comparados àqueles tratados apenas com RAR.

Kuru et al. (2017) avaliaram o efeito do consumo de iogurte suplementado com o probiótico *B. lactis* DN-173010 durante 4 semanas, seguido por um período de 5 dias sem a realização de higiene bucal em indivíduos sem periodontite e sistemicamente saudáveis. Os indivíduos que consumiram o probiótico apresentaram menores sangramento gengival, acúmulo de placa e concentração de IL-1 β no FCG quando comparados àqueles que não consumiram o probiótico.

De fato, probióticos podem ter um impacto significativo no tratamento da periodontite (GRUNER et al., 2016; MARTIN-CABEZAS et al., 2016). Novos estudos são fundamentais para melhor elucidar o papel das bactérias benéficas na cavidade bucal, identificar novas espécies de bactérias, estabelecer tempos e novos veículos de administração. Até o momento, não existe na literatura um estudo clínico controlado que tenha avaliado os efeitos adjuvantes de bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium* no tratamento não cirúrgico da periodontite.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar os efeitos adjuvantes do probiótico *B. lactis* HN019 no tratamento não cirúrgico da Periodontite Crônica generalizada.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar antes e após o tratamento periodontal:

- ✓ Parâmetros clínicos (IP, PS, retração gengival - RG, nível de inserção clínico - NIC e sangramento à sondagem - SS);
- ✓ Níveis das citocinas IL-1 β , IL-8 e IL-10 presentes no fluido crevicular gengival por meio de imunoenaios enzimáticos (Luminex™ xMAP®);
- ✓ Níveis de Imunoglobulina A (IgA) presentes na saliva por meio de imunoenaios enzimáticos (Nefelometria);
- ✓ Microbiota subgengival por meio de *checkerboard DNA-DNA hybridization* e PCR em tempo real (q-PCR);
- ✓ Expressão de BD-3 e de Receptor do tipo *Toll* (TLR)-4 nos tecidos periodontais por meio de reações imunohistoquímicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Consentimento para a pesquisa

Todos os pacientes receberam informações detalhadas a respeito do experimento do qual participaram (objetivos, benefícios, riscos e desconfortos) conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo nº: 06278012.1.0000.5419 – (Anexo 2) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) – Universidade de São Paulo (USP). O estudo foi registrado no *ClinicalTrials.gov* (NCT03408548).

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 ideal capaz de assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados foi calculado para reconhecer diferenças de 1 mm (δ) entre os grupos, considerando as mudanças na média do NIC como variável primária, $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$, intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) e desvio padrão (σ) de 1,13 mm (Vivekananda et al. 2010). Os cálculos do tamanho da amostra (n) foram realizados de acordo com a fórmula: $n \geq \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$. Obteve-se, então, como resultado um número mínimo necessário de 40 indivíduos para este estudo.

3.3 Seleção dos pacientes

Foram incluídos 41 indivíduos da população atendida na Clínica de Periodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FORP-USP. Todos os indivíduos apresentavam bom estado de saúde geral e, no mínimo, 15 dentes presentes, excluindo-se terceiros molares e dentes indicados para exodontia. Os indivíduos deveriam receber o diagnóstico de Periodontite Crônica generalizada de acordo com a atual classificação da Academia Americana de Periodontologia (ARMITAGE, 1999). Os critérios de inclusão foram: (1) idade ≥ 30 anos; (2) 30% ou mais dos sítios com PS ≥ 4 mm, NIC ≥ 4 mm e presença de SS; (3) um mínimo de 6 dentes com pelo menos um sítio em cada com PS e NIC ≥ 5 mm (FERES et al., 2013); (4) e presença de pelo menos dois sítios com PS ≤ 3 mm e ausência de sangramento à sondagem.

Foram considerados critérios de exclusão para o presente estudo: (1) história positiva de antibioticoterapia nos últimos seis meses; (2) história positiva de tratamento periodontal básico nos últimos seis meses; (3) envolvimento sistêmico que capaz de interferir na progressão da doença ou na resposta ao tratamento (ex.: diabetes, desordens imunológicas); (4) envolvimento protéticos extensos; (5) necessidade de profilaxia antibiótica para a realização de procedimentos odontológicos de rotina; (6) uso de anti-inflamatórios por longo período de tempo; (7) tabagismo; e (8) gravidez.

3.4 Delineamento do estudo, ocultação da alocação e protocolo de tratamento

Os indivíduos selecionados foram identificados por um código numérico, bem como receberam instruções específicas de higiene oral e raspagem supragengival em todos os elementos dentários. De acordo com uma tabela numérica aleatória gerada por um programa computadorizado, o coordenador do estudo (M.R.M.) alocou cada paciente em um dos seguintes grupos experimentais: Controle (Raspagem e alisamento radicular – RAR) ou Teste (RAR + Terapia probiótica). Os indivíduos receberam pastilhas de 10 mg contendo placebo (Grupo Controle) ou 10^9 UFC de *B. lactis* HN019 (HOWARU™ Bifido, E. I. Dupont® de Nemours and Company, Wilmington, DE, EUA) (Grupo Teste). Os indivíduos foram orientados, logo após a primeira sessão de instrumentação mecânica, a consumirem as pastilhas pela manhã e antes de dormir, durante 30 dias, deixando as mesmas serem dissolvidas na boca. Foram orientados, também, a não consumirem durante o estudo nenhum outro produto contendo probióticos.

Uma farmácia de manipulação foi responsável pela preparação das pastilhas e controle de qualidade das mesmas. As pastilhas foram armazenadas em frascos dessecantes idênticos, os quais foram enviados ao coordenador do estudo. Cada frasco recebeu o código numérico que foi atribuído a cada indivíduo participante do estudo. As embalagens codificadas foram enviadas ao examinador do estudo (M.M.I.), o qual distribuiu aos indivíduos e, em nenhum momento, teve informações sobre o conteúdo das mesmas. Os indivíduos envolvidos também não souberam qual o conteúdo das embalagens e em qual grupo experimental estavam alocados. O significado de cada código numérico foi revelado pelo coordenador do estudo apenas após a realização da análise estatística dos dados experimentais obtidos.

Os indivíduos participantes da pesquisa receberam 14 pastilhas (placebo ou probiótico) por semana, armazenadas em frascos dessecantes, e foram orientados a conservarem o produto sob refrigeração. Ao final de cada semana, comparecerem à Clínica de Periodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FORP-USP. Durante essa visita, os mesmos entregaram os frascos vazios que continham as pastilhas consumidas durante a semana para, então, receberem novos frascos contendo pastilhas em quantidade suficiente para mais uma semana de consumo. Nesta visita, os indivíduos responderam um questionário sobre a percepção de qualquer efeito colateral observado durante o consumo das pastilhas. Um assistente de pesquisa (M.S.M.S.) conduziu estes procedimentos, sendo responsável por monitorar o comprometimento do indivíduo no consumo das pastilhas fornecidas. Este assistente não foi examinador ou operador no presente estudo.

Todos os indivíduos foram submetidos a um exame radiográfico periapical completo da boca toda. Os mesmos foram incluídos em um programa de higiene oral (PHO) de acordo com suas necessidades específicas. Neste programa, os indivíduos receberam instruções para um efetivo autocontrole de placa bacteriana, incluindo informações sobre a Técnica de Bass (BASS, 1954) e limpeza interproximal com fio dental e escovas interdentais. Após a realização deste PHO, os indivíduos receberam raspagem supragengival e um polimento coronário em todos os elementos dentários presentes na cavidade bucal. A TPNC teve início 7 dias após a execução do PHO e da raspagem supragengival inicial. O tratamento foi realizado por um especialista em Periodontia (M.M.I.), por meio de raspagem (supragengival e subgengival) e aplainamento radicular de todos elementos dentários com comprometimento periodontal, utilizando instrumentos manuais (Curetas Gracey, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e ultrassônicos. A instrumentação foi realizada quadrante por quadrante, até adequada limpeza da área e alisamento radicular, o qual foi verificado com auxílio de uma sonda exploradora.

Os parâmetros clínicos periodontais, imunológicos e microbiológicos foram avaliados no *baseline* (período pré-intervenção) e após a realização da TPNC. Foram realizadas, também, biópsias gengivais de sítios periodontais saudáveis e doentes. Todas as coletas de amostras, exames clínicos periodontais, avaliações microbiológicas e imunológicas (pré e pós-intervenção) e procedimentos de RAR foram realizados por um

único examinador (M.M.I.), devidamente treinado e calibrado, o qual desconhecia os grupos experimentais do presente estudo.

3.5 Calibração do examinador

O índice Kappa foi utilizado para avaliar a calibração do examinador para coleta dos parâmetros clínicos periodontais a fim de mensurar a concordância diagnóstica intra-examinador. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para critérios de diagnóstico, o índice aceitável de concordância de Kappa deve ser maior ou igual a 0,85 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997). Este nível de concordância foi utilizado para a calibração do examinador no presente estudo. Foram selecionados 10 pacientes, com pelo menos 5 dentes com PS e NIC ≥ 5 mm nos sítios proximais. Cada paciente foi examinado duas vezes por meio da sonda periodontal Carolina do Norte (PCPUNC156, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA), com um intervalo de 48 horas entre o primeiro e segundo exame.

3.6 Monitoramento clínico

O IP visível de cada indivíduo foi avaliado. O IP foi determinado pelo percentual de superfícies dos dentes que apresentavam depósitos de placa visualizados pelo deslizamento suave de uma sonda periodontal entre a margem gengival e a superfície dentária.

Foram avaliados, em 6 sítios de cada elemento dentário (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual), os seguintes parâmetros clínicos periodontais: (i) PS da bolsa periodontal (mm): foi mensurada a partir da margem gengival até o fundo da bolsa ou sulco gengival; (ii) NIC (mm): foi mensurado a partir da junção cimento-esmalte (JCE) ao fundo da bolsa ou sulco gengival; (iii) SS: foi avaliado dicotomicamente, sendo que a presença do sangramento foi considerada positiva quando ocorreu em até 20 segundos após a inserção da sonda para mensuração da PS; (iv) e Retração gengival (RG) (mm): foi mensurada a partir da JCE até a margem gengival.

Os parâmetros clínicos periodontais de cada indivíduo foram registrados no *baseline*, bem como em 30 e 90 dias após a realização da TPNC.

3.7 Monitoramento imunológico

3.7.1 Coleta de fluido crevicular gengival (FCG)

No *baseline*, bem como em 30 e 90 dias após a realização da TPNC, foram coletadas amostras do FCG em 4 sítios inteproximais não contíguos em cada indivíduo com PS $\geq$ 4mm, sendo escolhidos 2 sítios com os maiores valores de PS nos sextantes posteriores e 2 sítios nos sextantes anteriores. A placa supragengival dos elementos dentários selecionados foi removida e os sítios foram cuidadosamente secos com jatos de ar, sendo, posteriormente, isolados com roletes de algodão estéreis. As amostras do FCG foram obtidas com a utilização de tiras de papel absorvente (Periopaper[®], Oralflo Inc., Amityville, NY, EUA). As tiras foram cuidadosamente inseridas junto à margem do sulco gengival, permanecendo por um período de 30 segundos. Posteriormente, as mesmas foram colocadas em microtubos esterilizados, os quais foram armazenados a uma temperatura de -80 °C.

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

Para a quantificação de citocinas (IL-1 β , IL-10 e IL-8), foram utilizados kits disponíveis comercialmente (LXSAHM-03 – Techne Corporation, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) em um analisador MAGPIX[®] (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA), conforme descrito por Moreira et al. (2015). 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 três analitos (IL-1 β , IL-10 e IL-8) foram adicionadas aos poços. As amostras e padrões (variando de 16,3 a 3960, de 10,6 a 880 e de 4,4 a 1060 pg/mL para IL-1 β , IL-10 e IL-8, respectivamente) foram transferidas para os poços e incubadas *overnight* a 4°C. Os poços foram lavados novamente e uma mistura de anticorpos secundários biotinizados foi adicionada. Após a incubação por uma hora, Estreptavidina R-ficoeritrina foi adicionada aos poços, sendo este conjunto incubado por mais uma hora. Após lavagem para a remoção de reagentes

não-ligados, foi adicionado *sheath fluid* (Luminexs, MiraiBio, Alameda, CA, USA) aos poços. As placas foram, então, analisadas no MAGPIX[®], para obtenção da 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 por meio do software xPONENT[®] (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA).

3.7.2 Coleta de saliva

No *baseline*, bem como em 30 e 90 dias após a realização TPNC, saliva não-estimulada foi coletada no período matutino e com o indivíduo em jejum por um período mínimo de 8 horas. Os participantes foram esclarecidos que, durante a coleta de saliva, deveriam evitar fazer movimentos com a língua, bochechas ou lábios. Decorridos 2 minutos iniciais após as instruções, os participantes eliminaram a saliva na cuspeira a fim de desprezar os resíduos iniciais. A partir desse momento, a coleta foi iniciada. Foram feitos ciclos de 3 minutos, nos quais os indivíduos mantiveram a saliva na cavidade bucal. Ao final deste período, eles expeliram a saliva residual em tubo *Falcon* (Corning Inc, Corning, NY, EUA) de polipropileno de 50 mL. A ação foi repetida mais 2 vezes e o tempo total de coleta foi de 9 minutos. As amostras de saliva foram, então, dispensadas, com micropipeta manual, em 2 tubos *eppendorfs* (Eppendorf AG, Hamburg, Hamburg, Alemanha) graduados. Cada tubo contendo 1mL de saliva foi armazenado a uma temperatura de -80°C. A determinação dos níveis de IgA foi realizada em um laboratório de análises clínicas por meio de nefelometria com intervalo de 1,59 a 41,45 mg/dL.

3.8 Monitoramento microbiológico

No *baseline*, bem como em 30 e 90 dias após a realização da TPNC, amostras de placa subgengival foram coletadas em 4 sítios inteproximais não contíguos em cada indivíduo, agrupados de acordo com as seguintes categorias de PS obtidas no *baseline*: bolsas intermediárias (PS = 4 a 6 mm) e bolsas profundas (PS $\geq$ 7 mm). Para a coleta da placa subgengival, os sítios foram isolados com roletes de algodão estéreis e secos com jatos de ar. A placa supragengival foi, então, cuidadosamente removida com a utilização de uma cureta estéril. Posteriormente, outra cureta estéril foi utilizada para a coleta de

placa subgengival, partindo da porção mais profunda da bolsa/sulco para a região coronal. As amostras de placa bacteriana subgengival coletadas foram imediatamente depositadas em frascos *ependorfs* esterilizados contendo 150µL de solução tampão [10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6 – solução Tris-EDTA (TE)]. Foram adicionados a esta solução 100µL de NaOH a 0,5M para que o ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Os *ependorfs*, previamente identificados com o código do indivíduo e do sítio coletado, foram armazenados sob refrigeração a -80 °C. Contagens de 40 espécies bacterianas (Tabela 1) subgengivais 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) e Moreira et al. (2015). A detecção e quantificação do *B. lactis* HN019 nas amostras coletadas foram feitas por q-PCR utilizando *primers* específicos com base na metodologia proposta por Junick e Blant (2012).

Tabela 1 – Relação das cepas bacterianas avaliadas na análise microbiológica por meio do *checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Complexo Azul	Complexo Roxo	Complexo Verde	Complexo Amarelo
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>		<i>Capnocytophaga sputigena</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Actinomyces viscosus</i>		<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
		<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
Complexo Laranja	Complexo Vermelho	Especies “não-orais”	
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Eubacterium saburreum</i>	
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	
<i>Campylobacter showae</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>	
<i>Eubacterium nodatum</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>	
<i>Parvimonas micra</i>		<i>Prevotella melaninogenica</i>	
<i>Prevotella intermedia</i>		<i>Neisseria mucosa</i>	
<i>Prevotella nigrescens</i>		<i>Streptococcus anginosus</i>	
<i>Streptococcus constellatus</i>		<i>Selenomonas noxia</i>	
<i>Fusobacterium Periodonticum</i>		<i>Treponema Socranskii</i>	
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum</i>			
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum</i>			
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii</i>			

3.8.1 Checkerboard DNA-DNA hybridization

Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, 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-Aldrich®, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrilado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma-Aldrich®) e 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich®). As espécies *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma-Aldrich®), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma-Aldrich®), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma-Aldrich®), 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-Aldrich®) 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 microcentrifuga 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-Aldrich®) 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-Aldrich®) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma-Aldrich®) 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.

As suspensões de biofilme subgengival foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônio a 5M. 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 minutos. 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% caseína (Vetec), 5 vezes de solução salina citratada (SSC) (1 vez de SSC = 150 mM NaCl - Vetec), 15 M de citrato de sódio – pH 7,0 (J.T.Baker, Estado de México, México), 25 mM de fosfato de sódio – pH 6,5 (Na_2HPO_4 , Labsynth) e 0,5 mg/mL de ácido ribonucleico (RNA) de levedura (Sigma-Aldrich®). 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% de formamida, 5 vezes de SSC, 20mM 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 min a 65 °C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM 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), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína - pH 8,0, e, logo após, por 30 min, 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 min, 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 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador (I.B.) treinado e calibrado 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.

3.8.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR) – Quantificação absoluta

Após a coleta, as amostras foram armazenadas em tubos *ependorfs* de 1,5 mL contendo 150 µL de tampão TE (Merck, Whitehouse Station, Nova Jersey, EUA) e mantidas em freezer a -80 °C até o início dos experimentos. A extração do DNA genômico foi realizada por meio do kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germantown, Maryland, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Posteriormente, a concentração e a pureza do DNA genômico foram avaliadas por espectrofotometria em aparelho Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A leitura foi realizada em dois diferentes comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm, para obtenção da concentração de DNA/µL e detecção de contaminação das amostras por proteínas.

A técnica de q-PCR foi realizada por meio do sistema SYBRGreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, EUA), no aparelho StepOne Plus™ Real-Time (Thermo Fisher Scientific). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 13 µL,

quantidade de DNA genômico correspondente a 10 ng e *primers* específicos (0,1 µg/µL) para amplificar o gene *groEL*: *Bifidobacterium* B_ani-forward (5'-CACCAATGCGGAAGACCAG-3') e B_ani-reverse (5'-GTTGTTGAGAATCAGCGTGG-3') (JUNICK & BLAUT 2012). Para cada reação, foram utilizados: a) 7 µL do reagente SYBR Green Master Mix (Invitrogen) contendo fluoróforo SYBR Green, a enzima polimerase AmpliTaq Gold, dNTPs com dUTP e o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, além dos demais componentes de tampão; b) 2,5 µL de DNA genômico (10 ng); c) 2,5 µL de água Milli-Q RNase/DNase free (Thermo Fisher Scientific); d) 0,5 µL primer *forward* (0,1 µg/µL) e) 0,5 µL primer *reverse* (0,1 µg/µL). A reação de amplificação seguiu o protocolo: a) 95°C por 3 minutos; b) 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; c) 72°C por 10 minutos; d) 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

Para a quantificação absoluta dos dados, foi necessária a construção de uma curva padrão a partir da extração de DNA genômico de cultura pura de *B. lactis* HN019 (HOWARU™ Bifido). A cepa bacteriana foi cultivada em meio MRS Agar (Man, Rogosa and Sharpe - D TMLactobacilli 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 uma 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. 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 UFC/mL.

O DNA genômico de um inóculo a 10⁸ UFC/mL foi extraído e sua concentração determinada como descrito anteriormente. A partir desta concentração, em ng/µL, e conhecendo o tamanho do genoma da cepa, 2,25 megabases (Mb), foi possível aplicar a fórmula abaixo e descobrir o número de cópias de bactéria (moléculas)/µL (JUNICK & BLAUT 2012):

Número de cópias de genoma de bactéria/ μL (moléculas/ μL) = concentração do DNA genômico (ng/ μL) / *2,47 (fentograma - fg/molécula)

*[2,25 Mb $\times$ massa média de 1 par de base - bp (660 g/mol)] / constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol) = 2,47 fg/molécula.

Após os cálculos, foi realizada uma diluição seriada a partir do ponto mais concentrado (10^8 moléculas/ μL) sendo possível estabelecer a curva padrão com os pontos: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 moléculas/ μL . O intervalo considerado aceitável para a eficiência das curvas foi de 90-110%. Por meio do *software* StepOnePlus™ Software v2.3 foi possível obter o número de cópias de genoma de bactéria/ μL presente em cada amostra analisada. Três amostras negativas (água) foram submetidas à reação com o primer utilizado.

3.9 Biópsias gengivais e análise imunohistoquímica

No *baseline* e 30 dias após a TPNC, foram coletadas amostras de tecido gengival (tecidos epitelial e conjuntivo) de 1 sítio saudável ($\text{PS} \leq 3 \text{ mm}$) e de 1 sítio doente ($\text{PS} \geq 5 \text{ mm}$). As biópsias gengivais coletadas foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina. Foram realizados, então, cortes seriados com 4 μm de espessura, no plano transversal para visualizar epitélio e conjuntivo. 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 *Diva Decloaker* (Biocare Medical, Inc., Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking Chamber, Biocare Medical, Inc., Concord, CA, EUA), a 95°C , por 10 min. Entre cada uma das etapas da reação imunohistoquímica, foram realizadas lavagens em PBS 0,1 M - pH 7,4. As secções histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e em 1% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio da peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos, respectivamente. Lâminas histológicas contendo amostras dos grupos experimentais foram divididas em 2 lotes. Cada lote foi submetido à incubação, durante 24 horas, com um dos seguintes anticorpos primários: anti-BD-3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA) e anti-TLR-4 (Santa Cruz Biotechnology). Nas etapas subsequentes, foi utilizado o *Universal LSAB™+ Kit/HRP* (Dako North America, Inc., Carpinteria CA, EUA). As

secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado durante 2 horas e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte por 1 hora. Na revelação foi utilizado como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (Liquid DAB+, Dako North America, Inc., Carpinteria CA, EUA) e os cortes histológicos foram contra-corados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente, suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

Os cortes histológicos foram analisados semi-quantitativamente por um investigador (E.E.) que desconhecia a identificação dos grupos experimentais. As áreas imunomarcadas foram padronizadas utilizando magnificação microscópica de 250x considerando uma área de 400 µm x 600 µm situada no centro da secção histológica. O longo eixo deste retângulo se mostrava perpendicular a uma linha imaginária situada na interface tecido epitelial – tecido conjuntivo. O retângulo foi posicionado de modo que sua metade superior continha predominantemente o tecido epitelial e sua metade inferior continha predominantemente o tecido conjuntivo. A imunomarcção foi definida como um precipitado de coloração acastanhada nas células e/ou matriz extracelular e capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico, sendo posteriormente salvas em um computador. Foram usados escores para classificar as imunomarcções da seguinte forma: 0 – nenhuma imunomarcção (ausência total de imunorreatividade na área); escore 1 – padrão extremamente baixo de imunomarcção (aproximadamente 1/5 da área apresentando imunoreatividade); escore 2 – baixo padrão de imunomarcção (aproximadamente 2/5 da área apresentando imunorreatividade); escore 3 – moderado padrão de imunomarcção (aproximadamente 3/5 da área apresentando imunorreatividade); escore 4 – Alto padrão de imunomarcção (aproximadamente 4/5 da área apresentando imunorreatividade); escore 5 - padrão extremamente alto de imunomarcção (quase a toda a área apresentando imunorreatividade).

3.10 Variáveis de resultado

Foi definida como variável primária deste estudo a diferença obtida no NIC aos 90 dias pós-operatórios. Os demais parâmetros clínicos (IP, SS, RG e PS), microbiológicos e imunológicos analisados, bem como número de bolsas periodontais residuais, acompanhamento de bolsas moderadas e profundas diagnosticadas no *baseline*, número de pacientes com necessidade de terapia periodontal adicional e número de pacientes classificados de acordo com o risco de progressão da periodontite (baixo,

moderado ou alto) foram definidos como variáveis secundárias. Os parâmetros clínicos (PS, NIC e RG) e microbiológicos foram analisados em subgrupos levando-se em consideração a PS inicial. As bolsas periodontais foram classificadas de acordo com a PS inicial como moderadas ($PS = 4-6 \text{ mm}$) ou profundas ($PS \geq 7 \text{ mm}$)

Para a variável “necessidade de terapia adicional”, o indivíduo foi considerado como tendo necessidade de tratamento periodontal adicional caso apresentasse pelo menos um dente com um sítio com $PS \geq 6 \text{ mm}$ ou $PS = 5 \text{ mm}$ e SS positivo (CIONCA et al, 2009). O risco de progressão da periodontite foi também avaliado ao nível do indivíduo de acordo com Lang & Tonetti (2003): baixo risco (≤ 4 sítios com $PS \geq 5 \text{ mm}$); risco moderado (5-8 sítios com $PS \geq 5 \text{ mm}$); e alto risco (≥ 9 sítios com $PS \geq 5 \text{ mm}$).

3.11 Análise estatística

As análises foram realizadas com os *softwares* GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, Versão 6.0. CA, EUA) e IBM SPSS Statistics (IBM Corporation, Versão 23. Armonk, NY, EUA). Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A distribuição de normalidade dos dados clínicos, microbiológicos e imunológicos foi verificada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos para análises das diferenças intra e intergrupos. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados com distribuição não normal.

3.11.1 Parâmetros clínicos

Para os diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (*baseline*, 30 dias e 90 dias) foi calculada a média e o desvio-padrão de PS, NIC e RG. Para as variáveis SS, IP, bolsas periodontais residuais, acompanhamento de bolsas moderadas e profundas diagnosticadas no *baseline*, indivíduos com necessidade de terapia periodontal adicional e indivíduos classificados de acordo com o risco de progressão da periodontite, foram calculadas as frequências absolutas e relativas médias em cada grupo e tempo experimentais. As diferenças intra-grupos (ao longo do tempo) para PS, NIC, RG, IP, SS e bolsas periodontais residuais foram avaliadas pela Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas e teste *post hoc* de Bonferroni. As diferenças intergrupos (em um determinado tempo experimental) para PS, NIC, RG, IP, SS, bolsas periodontais residuais e acompanhamento de bolsas moderadas e profundas diagnosticadas no *baseline* foram

avaliadas pelo Teste t de Student. A análise das diferenças intergrupos para as mudanças ocorridas (aos 30 e 90 dias) nos valores de PS, NIC e RG em relação aos valores obtidos no *baseline* foram avaliadas pelo Teste t de Student. As diferenças intra e intergrupos para indivíduos com necessidade de terapia periodontal adicional e indivíduos classificados de acordo com o risco de progressão da periodontite foram avaliadas pelo teste Qui-Quadrado.

3.11.2 Parâmetros microbiológicos

Após a realização do *checkerboard DNA-DNA hybridization*, os níveis de cada espécie bacteriana testada foram calculados pela transformação dos escores obtidos na leitura dos filmes radiográficos 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 indivíduo, foi calculada a média das contagens de cada espécie bacteriana ($\times 10^5$) presente. Foi calculada, então, a contagem média de cada espécie nos diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (*baseline*, 30 dias e 90 dias), considerando a presença de bolsas periodontais moderadas (PS = 4-6 mm) e profundas (PS $\geq$ 7 mm) separadamente. As mudanças ocorridas aos 90 dias nas contagens médias de cada espécie bacteriana em relação aos valores obtidos no *baseline* foram calculadas para cada indivíduo e grupo experimental. Os dados foram também agrupados em complexos, conforme descrição de Socransky et al. (1988). Neste agrupamento, foram calculadas as frequências relativas médias dos complexos bacterianos presentes em cada grupo experimental nos 3 tempos analisados (*baseline*, 30 dias e 90 dias). As diferenças intra-grupos nas contagens médias de cada espécie bacteriana foram avaliadas pelo Teste de Friedman. As análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, conforme descrito por Socransky et al. (1994). Resumidamente, foi computado um valor geral de *p* conforme as seguintes fórmulas: i) $1-(1-k)$ (QIN et al., 2008) para espécies orais; ii) $1-(1-k)$ (DANSER et al., 1996) para espécies não periodontais, sendo *k* o valor de *p* estabelecido para o presente estudo (0,05). Dessa forma, valores de $p < 0,0012$ e valores de $p < 0,002$ foram considerados estatisticamente significantes para as espécies orais e não orais, respectivamente. As diferenças intergrupos para mudanças ocorridas aos 90 dias nas contagens médias de cada espécie bacteriana em relação aos valores obtidos no *baseline* foram avaliadas pelo Teste Mann-Whitney. As diferenças intra-grupos e intergrupos para

as frequências relativas médias dos complexos bacterianos foram avaliadas pelo Teste de Friedman (seguido pelo Teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn) e pelo Teste Mann-Whitney, respectivamente.

As diferenças intra-grupos e intergrupos para o número de cópias do genoma de *B. lactis* HN019 nas amostras de biofilme subgengival foram avaliadas pelo Teste de Friedman (seguido pelo Teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn) e pelo Teste Mann-Whitney, respectivamente.

3.11.3 Parâmetros imunológicos

Os valores de proteína total obtidos na análise das amostras coletadas de FCG foram convertidos em pg/mL. Os níveis finais das citocinas IL-1 β , IL-8 e IL-10 foram obtidos pela razão entre os valores inicialmente obtidos com sistema MAGPIX® e os valores de proteína total convertidos em pg/mL.

Foram calculados a média e o desvio-padrão dos níveis de IL-1 β , IL-8, IL-10 e IgA em cada indivíduo. Em seguida, obteve-se a média de cada citocina/imunoglobulina para os diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (*baseline*, 30 dias e 90 dias). As diferenças intra-grupos foram avaliadas pela ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo Teste *post hoc* de Bonferroni. As razões dos níveis de cada citocina/imunoglobulina aos 30 e 90 dias [razão = (nível obtido aos 30 ou 90 dias) / (nível obtido no *baseline*)] foram também calculadas para cada indivíduo e grupo experimental. As diferenças integrupos para os valores dessas razões foram avaliadas pelo Teste t de Student.

3.11.4 Parâmetros imunohistoquímicos

Para análise dos dados imunohistoquímicos referentes ao padrão de imunomarcção de BD-3 e TLR-4, foram obtidas, para cada grupo experimental, no *baseline* e aos 30 dias, considerando sítios saudáveis e doentes separadamente, as medianas, desvios interquartílicos e valores máximos e mínimos dos escores atribuídos. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste *post-hoc* de Dunn.

4. RESULTADOS

O fluxograma deste estudo está apresentado na Figura 1. Todos os indivíduos na amostra completaram o estudo. As características demográficas dos grupos experimentais estão apresentadas na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre os grupos Teste e Controle para as variáveis apresentadas. A cicatrização após a RAR ocorreu sem complicações em todos os casos. Nenhum efeito adverso foi relatado durante e/ou após o uso das pastilhas contendo probiótico.

Figura 1 – Fluxograma do estudo clínico.

Tabela 2 – Características demográficas da amostra no *baseline* de acordo com os grupos experimentais

VARIÁVEL	GRUPOS EXPERIMENTAIS		COMPARAÇÃO INTERGRUPO (Teste Qui-quadrado) <i>Valor p</i>
	Teste n=20	Controle n=21	
Número de indivíduos	20	21	NS
Idade (Média ± DP)*	48,40±9,87	47,29±10,24	NS
Gênero (F/M)	13/7	13/8	NS
Número de dentes	23,20±2,83	24,23±2,99	NS
Sítios com PS ≤ 3 mm (Número médio ± DP)	105,15±17,86	105,22±24,14	NS
Sítios com PS ≥ 4 ≤ 6 mm (Número médio ± DP)	28,45±9,72	33,9±13,12	NS
Sítios com PS ≥ 7 mm (Número médio ± DP)	5,60±3,69	6,00±5,25	NS

F = feminino; M = masculino; PS = profundidade de sondagem; DP = desvio-padrão; NS = Não significativo (Teste Qui-Quadrado, $p > 0,05$), * (Teste t de Student $p > 0,05$)

4.1 Monitoramento clínico

Os valores de IP, SS PS, NIC e RG para os grupos Controle e Teste podem ser observados na Tabela 3.

No *baseline*, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Ambos os grupos demonstraram melhoras nos parâmetros clínicos analisados em bolsas periodontais moderadas e profundas aos 30 e 90 dias. O Grupo Teste apresentou menor SS (aos 30 e 90 dias) e menor IP (aos 30 dias) quando comparado ao Grupo Controle ($p < 0,05$). Em bolsas moderadas e profundas, o Grupo Teste apresentou maior ganho de inserção clínica e menor PS que o Grupo Controle aos 90 dias ($p < 0,05$).

Na análise do número de bolsas moderadas e profundas residuais (Tabela 3), ambos os grupos apresentaram reduções significativas aos 30 e 90 dias. O Grupo Controle

apresentou maior quantidade de bolsas periodontais moderadas (aos 30 e 90 dias) e profundas (aos 90 dias) que o Grupo Teste ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Médias e desvio-padrão dos parâmetros clínicos (PS, NIC, RG, IP, SS) observados nos grupos Teste e Controle, bem como o número de bolsas moderadas e profundas detectadas ao longo do estudo (*baseline*, 30 e 90 dias pós-operatórios) e as mudanças nos valores de PS ocorridas em bolsas moderadas e profundas (diagnosticadas no *baseline*) aos 90 dias após a RAR

VARIÁVEL	PERÍODO	GRUPOS EXPERIMENTAIS				COMPARAÇÃO INTERGRUPO		
		Teste n=20		Controle n=21		Diferença das médias	Teste t Student Valor <i>p</i>	
		Média ± DP	Delta ± DP Δ 0-30 / 0-90	Média ± DP	Delta ± DP Δ 0-30 / 0-90		Média	Delta
PS (mm)								
Geral	Baseline	3,01±0,27		3,10±0,43		-0,09	NS	
	30 dias	2,53±0,25*	-0,48±0,30	2,78±0,37*	-0,32±0,27	-0,25	≤0,05	0,1579
	90 dias	2,49±0,27*	-0,52±0,32	2,85±0,34*	-0,25±0,22	-0,36	≤0,05	0,0048
Bolsas moderadas	Baseline	4,47±0,20	-	4,44±0,27	-	0,02	NS	-
	30 dias	3,29±0,47*	-1,18±0,37	3,33±0,42*	-1,11±0,41	-0,04	NS	NS
	90 dias	3,19±0,52*	-1,28±0,41	3,50±0,45*	-0,94±0,42	-0,31	≤0,05	0,01
Bolsas profundas	Baseline	7,27±0,29	-	7,26±0,35	-	0,14	NS	-
	30 dias	4,07±1,14*	-3,20±1,00	4,47±1,23*	-2,79±1,11	-0,39	NS	NS
	90 dias	3,75±1,32*	-3,52±1,19	4,64±1,00*	-2,62±0,88	-0,90	0,019	0,0103
NIC (mm)								
Geral	Baseline	3,26±0,39		3,42±0,54		-0,16	NS	
	30 dias	2,77±0,44*	-0,49±0,37	3,13±0,50*	-0,29±0,26	-0,36	≤0,05	0,0855
	90 dias	2,77±0,38*	-0,49±0,37	3,24±0,51*	-0,18±0,23	-0,47	≤0,05	0,0025
Bolsas moderadas	Baseline	4,63±0,42	-	4,70±0,45	-	-0,07	NS	-
	30 dias	3,51±0,65*	-1,12±0,44	3,69±0,56*	-1,01±0,44	-0,18	NS	NS
	90 dias	3,48±0,59*	-1,15±0,45	3,94±0,63*	-0,76±0,41	-0,45	0,022	0,0082
Bolsas profundas	Baseline	7,48±0,53	-	7,62±0,72	-	-0,13	NS	-
	30 dias	4,36±1,45*	-3,12±1,27	5,08±1,49*	-2,54±1,33	-0,72	NS	NS
	90 dias	4,03±1,44*	-3,45±1,21	5,55±1,37*	-2,07±0,97	-1,51	0,001	0,0004
RG (mm)								
Geral	Baseline	0,25±0,35	-	0,32±0,33	-	-0,07	NS	NS
	30 dias	0,23±0,32	-0,02±0,16	0,35±0,33	0,03±0,13	-0,12	NS	NS
	90 dias	0,27±0,87	0,02±0,12	0,38±0,97	0,06±0,19	-0,11	NS	NS
Bolsas moderadas	Baseline	0,15±0,27	-	0,26±0,25	-	-0,10	NS	-
	30 dias	0,21±0,33	0,06±0,16	0,36±0,34	-0,10±0,24	-0,14	NS	NS
	90 dias	0,28±0,34	0,13±0,27	0,43±0,48	-0,17±0,31	-0,15	NS	NS
Bolsas profundas	Baseline	0,26±0,45	-	0,50±0,77	-	-0,24	NS	-
	30 dias	0,28 ± 0,47	0,02±0,37	0,61±0,91	0,11±0,47	-0,33	NS	NS
	90 dias	0,28 ± 0,66	0,02±0,62	0,90±1,09	0,40±0,47	-0,61	0,038	0,0360
IP após PHO								
Número médio (%)	Baseline	23,85±15,33 (25,90)	-	26,71±16,60 (27,40)	-	-2,71 (-1,50)	NS	-
	30 dias	14,20±12,73* (15,40)	-9,65±10,52	20,24±17,53* (20,80)	-6,47±11,59	-6,51 (-5,40)	≤0,05	NS
	90 dias	21,65±13,13 (23,50)	-2,20±12,30	27,14±18,64 (27,90)	0,47±12,07	-5,49 (-4,40)	NS	NS

Tabela 3 (Continua)

SS após PHO								
Número médio (%)	Baseline	30,80±22,07 (22,10)	-	35,00±25,84 (24,10)	-	-4,20 (-2,00)	NS	-
	30 dias	17,05±14,60* (12,20)	-13,75±14,16	24,05±19,83* (16,50)	-10,50±16,17	-7,00 (-4,30)	≤0,05	NS
	90 dias	18,80±16,14* (13,50)	-12,00±15,49	30,71±27,86 (21,10)	-4,29±18,61	-11,91 (-7,60)	≤0,05	NS
Bolsas moderadas								
Número médio (%)	Baseline	28,45±9,72 (20,40)	-	33,90±13,12 (23,30)	-	-5,45 (-2,90)	NS	-
	30 dias	13,90±7,64* (10,00)	-14,55±8,63	22,86±14,1* (15,70)	-11,04±10,35	-8,96 (-5,70)	≤0,05	NS
	90 dias	12,50±6,95* (9,00)	-15,95±10,58	23,67±11,6* (16,30)	-10,23±8,82	-11,17 (-7,30)	≤0,05	0,0674
Bolsas profundas								
Número médio (%)	Baseline	5,60±3,69 (4,00)	-	6,00±5,25 (4,10)	-	-0,40 (-0,10)	NS	-
	30 dias	1,25±2,26* (0,90)	-4,35±3,66	1,90±3,41* (1,30)	-4,10±4,27	-0,65 (-0,40)	NS	0,8391
	90 dias	1,25±2,42* (0,90)	-4,35±3,95	2,90±4,14* (2,00)	-3,10±2,40	-1,65 (-1,10)	≤0,05	0,2242
Acompanhamento de bolsas moderadas diagnosticadas no baseline								
Número médio (%)								
PS ≤ 3mm	90 dias	19,60±9,33 (68,90)	-	18,38±8,80 (54,20)	-	1,22 (14,70)	≤0,05	-
PS ≥ 4 ≤ 6 mm	90 dias	8,40±5,39 (29,10)	-	14,81±10,54 (43,70)	-	-6,41 (14,60)	≤0,05	-
PS ≥ 7 mm	90 dias	0,45±1,23 (1,60)	-	0,71±1,30 (2,10)	-	0,26 (0,40)	NS	-
Acompanhamento de bolsas profundas diagnosticadas no baseline								
Número médio (%)								
PS ≤ 3mm	90 dias	3,25±2,50 (58,00)	-	1,33±1,20 (22,20)	-	1,92 (35,80)	≤0,05	-
PS ≥ 4 ≤ 6 mm	90 dias	1,65±1,53 (29,50)	-	2,8±2,56 (46,80)	-	-1,15 (17,30)	≤0,05	-
PS ≥ 7 mm	90 dias	0,7±1,42 (12,50)	-	1,86±2,85 (31,00)	-	-1,16 (18,50)	≤0,05	-

PS = profundidade de sondagem; NIC = nível de inserção clínica; RG = retração gengival; IP = índice de placa; SS = sangramento à sondagem; DP = desvio-padrão; PHO = profilaxia e higiene oral; bolsas moderadas = $PS \geq 4 \leq 6$ mm; bolsas profundas = $PS \geq 7$ mm; NS = não significativo; RAR = raspagem e alisamento radicular. *Diferença significativa quando comparado ao *baseline* (ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Bonferroni, $p < 0,05$).

Na análise das mudanças dos valores de PS de bolsas moderadas e profundas (diagnosticadas no *baseline*), o Grupo Teste apresentou maior percentual de bolsas moderadas e profundas reduzidas para $PS \leq 3$ mm quando comparado ao Grupo Controle aos 90 dias ($p < 0,05$). Na análise do risco de progressão da periodontite (Tabela 4), enquanto 55% dos indivíduos no Grupo Teste apresentaram baixo risco de progressão da doença, no Grupo Controle apenas 30% dos indivíduos foram classificados nesta categoria ($p = 0,0863$). Os percentuais de indivíduos com necessidade de tratamento periodontal adicional (Tabela 4) em mais de 3 sítios, aos 90 dias, foram 35% e 51,20% nos grupos Teste e Controle, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Frequências absolutas e relativas de indivíduos apresentando baixo (≤ 4 sítios com $PS \geq 5$ mm), moderado (5-8 sítios com $PS \geq 5$ mm) e alto (≥ 9 sítios com $PS \geq 5$ mm) risco para progressão da periodontite, bem como 0, 1-2 ou ≥ 3 sítios com necessidade de terapia adicional.

VARIÁVEL	PERÍODO	GRUPOS EXPERIMENTAIS		COMPARAÇÃO INTERGRUPO
		Teste n=20	Controle n=21	Teste Qui-Quadrado Valor <i>p</i>
		Número (%)	Número (%)	
Risco para progressão da periodontite				
Baixo	90 dias	11 (55,0)	6 (28,6)	0,0863
Moderado	90 dias	3 (15,0)	4 (19,0)	
Alto	90 dias	6 (30,0)	11 (52,4)	
Necessidade de terapia adicional				
0 sítios	90 dias	4 (20,0)	1 (12,2)	0,0306
1-2 sítios	90 dias	9 (45,0)	6 (36,6)	
≥ 3 sítios	90 dias	7 (35,0)	14 (51,2)	

4.2 Monitoramento imunológico

Os níveis de IL-8, IL-1 β e IL-10 estão apresentados na Figura 2 (A-C). Nas comparações intra-grupos, ambos os grupos apresentaram um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias aos 30 (IL-1 β e IL-8) e 90 (IL-8) dias em relação aos valores obtidos no *baseline* ($p < 0,05$). Em relação à IL-10, uma citocina anti-inflamatória, apenas

o Grupo Teste apresentou níveis maiores que aqueles do *baseline* aos 30 dias ($p < 0,05$). Na Figura 2 (E-G) podem ser observadas as razões médias dos níveis de cada citocina aos 30 e 90 dias. O Grupo Controle apresentou maior razão de IL-1 β (aos 30 e 90 dias) e de IL-8 (aos 30 dias) quando comparado ao Grupo Teste ($p < 0,05$).

Os níveis de IgA estão apresentados na Figura 2D. Não foram observadas mudanças significativas nos níveis de IgA, aos 30 e 90 dias, em relação aos valores obtidos no *baseline* para os grupos Teste e Controle. A Figura 2H apresenta as razões médias dos níveis de IgA aos 30 e 90 dias. Não foram observadas diferenças significativas entre as razões dos grupos Teste e Controle aos 30 e 90 dias.

Figura 2 – Níveis de IL-8 (A), IL-1β (B), IL-10 (C) e IgA (D) dos grupos Teste e Controle no *baseline* e aos 30 e 90 dias pós-operatórios. As mudanças médias dos níveis das citocinas e imunoglobulina analisadas em relação aos valores obtidos no *baseline* para os grupos Teste e Controle podem ser observadas em E-H. *Valores do Grupo Teste significativamente maiores que aqueles do *baseline* (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, $p < 0,05$). †Valores do Grupo Controle significativamente maiores que aqueles do *baseline* (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, $p < 0,05$). ‡Diferença significativa entre os grupos em um mesmo período de análise (Teste t de Student, $p < 0,05$).

4.3 Monitoramento microbiológico

4.3.1 Checkerboard DNA-DNA hybridization

De forma geral, os indivíduos apresentaram elevadas contagens de patógenos periodontais, como espécies dos complexos laranja e vermelho no *baseline*. As figuras 3 e 4 apresentam as médias da contagem total ($\times 10^5$) das 40 espécies subgingivais em bolsas periodontais moderadas (Figura 3) e profundas (Figura 4) ao longo dos tempos experimentais nos grupos Controle e Teste, bem como as mudanças nas contagens médias de cada espécie bacteriana aos 90 dias em relação aos valores obtidos no *baseline*.

Em bolsas periodontais moderadas (Figura 3), ambos os grupos apresentaram, aos 30 e 90 dias, contagens significativamente menores de *T. forsythia*, quando comparadas àquelas do *baseline*. No Grupo Teste, aos 30 dias, foram também observadas contagens significativamente menores de *P. intermedia* e *F. periodonticum*, bem como contagens significativamente maiores de *A. naeslundii* quando comparadas àquelas do *baseline*. No Grupo Controle, aos 30 dias, foram observadas reduções significativas nos valores de *P. gingivalis*, *F. periodonticum*, *E. nodatum* e *S. intermedius* quando comparados àqueles do *baseline*. Aos 90 dias, o Grupo Controle apresentou contagens significativamente maiores de *A. viscosus*, *V. parvula*, *C. ochracea*, *F. nuc. nucleatum* e *T. socranskii*, bem como contagens significativamente menores de *S. gordonii* quando comparadas àquelas obtidas no *baseline*. Nas comparações intergrupos, o Grupo Teste apresentou redução significativamente maior nas contagens de *P. intermedia* e *P. periodonticum* que o Grupo Controle aos 90 dias.

Em bolsas periodontais profundas (Figura 4), ambos os grupos apresentaram, aos 30 dias, contagens significativamente menores de *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* e *F. periodonticum* quando comparadas àquelas do *baseline* ($p < 0,05$). Aos 90 dias, apenas o Grupo Teste apresentou contagens de *P. gingivalis* e *T. denticola* significativamente menores que aquelas obtidas no *baseline* ($p < 0,05$). Nas comparações intergrupos, o Grupo Teste apresentou aumento significativo nas contagens de *A. naeslundii* e *S. mitis*, bem como reduções significativamente maiores nas contagens de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucl. vincentii*, *C. showae* e *E. nodatum* do que aquelas do Grupo Controle aos 90 dias ($p < 0,05$).

Figura 3 – Médias da contagem total ($\times 10^5$) das 40 espécies subgingivais em bolsas periodontais moderadas ao longo do período experimental para os grupos Teste e Controle, bem como mudanças nas contagens médias de cada espécie bacteriana aos 90 dias em relação aos valores obtidos no *baseline*. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas. Diferenças significativas (*30 dias e #90 dias) quando comparado ao *baseline* (Teste de Friedman). &Diferença significativa entre os grupos aos 90 dias (Teste Mann-Whitney).

Figura 4 – Médias da contagem total ($\times 10^5$) das 40 espécies subgengivais em bolsas periodontais profundas ao longo do período experimental para os grupos Teste e Controle, bem como mudanças nas contagens médias de cada espécie bacteriana aos 90 dias em relação aos valores obtidos no *baseline*. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas. Diferenças significativas (*30 dias e #90 dias) quando comparado ao *baseline* (Teste de Friedman). &Diferença significativa entre os grupos aos 90 dias (Teste Mann-Whitney).

A Figura 5 apresenta as proporções médias dos complexos microbianos presentes nos indivíduos dos grupos Controle e Teste nos diferentes períodos experimentais, bem como os resultados das comparações intra e intergrupos. Nas comparações intra-grupos, apenas o Grupo Teste apresentou aumento significativo no percentual do complexo azul aos 30 e 90 dias, bem como redução no percentual do complexo laranja aos 30 dias e no percentual do complexo vermelho aos 30 e 90 dias. O Grupo Controle apresentou redução significativa no percentual do complexo vermelho apenas aos 30 dias, bem como um aumento significativo no percentual do complexo roxo neste mesmo período. Nas diferenças intergrupos, verificou-se que o Grupo Teste apresentou percentuais médios dos complexos laranja (aos 30 dias) e vermelho (aos 90 dias) significativamente menores que aqueles do Grupo Controle. Uma percentagem significativamente maior do complexo azul também foi constatada no Grupo Teste quando comparado ao Grupo Controle aos 90 dias.

Figura 5 – Proporções médias dos complexos microbianos presentes nos indivíduos dos grupos Teste e Controle nos diferentes períodos experimentais, bem como os resultados das comparações intra e intergrupos. As cores representam os diferentes complexos microbianos (SOCRANSKY et al. 1998). Letras diferentes indicam diferenças significativas em cada grupo ao longo dos tempos experimentais (Teste de Friedman, Dunn). A significância da diferença entre os grupos em um mesmo período de análise foi determinada usando o Teste Mann-Whitney (Diferenças significativas aos **30 dias e ##90 dias).

4.3.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR) – Quantificação absoluta

A análise por meio de q-PCR (Figura 6) demonstrou que apenas o Grupo Teste apresentou aumento no número de cópias/ μL do genoma de *B. lactis* HN019 nas amostras de biofilme subgengival aos 30 e 90 dias ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Controle e Teste no *baseline*. Aos 30 e 90 dias, o Grupo Teste apresentou maior número de cópias/ μL do genoma de *B. lactis* HN019 quando comparado ao Grupo Controle ($p < 0,05$).

Figura 6 – Número médio ($\times 10^2$) de cópias/ μL do genoma de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 nas amostras de biofilme subgengival dos grupos Teste e Controle no *baseline* e aos 30 e 90 dias pós-operatórios, bem como os resultados das comparações intra e intergrupos. Os desvios-padrão observados estão representados em números absolutos sobre as barras do gráfico. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas em cada grupo ao longo dos tempos experimentais (Teste de Friedman, Dunn, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos em um mesmo período de análise (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$).

4.4 Biópsias gengivais e análise imunohistoquímica

As medianas dos escores atribuídos aos sítios saudáveis e doentes nos grupos Controle e Teste, antes e após o uso da terapia probiótica, podem ser observadas na Figura 7. Foram analisados 30 pacientes (15 de cada grupo) que permitiram a realização de biópsias gengivais. Apenas os sítios saudáveis dos pacientes que receberam a terapia probiótica apresentaram padrão de imunorreatividade significativamente maior de BD-3 e TLR-4 (Figura 7) aos 30 dias quando comparado àquele obtido no baseline ($p < 0,05$). Nos sítios doentes, um padrão de imunorreatividade significativamente maior de BD-3 e TLR-4 foi observado em ambos os grupos aos 30 dias quando comparado àquele do baseline ($p < 0,05$). O Grupo Teste apresentou expressões significativamente maiores de BD-3 e TLR-4 em sítios doentes aos 30 dias quando comparado ao Grupo Controle ($p < 0,05$).

Figura 7 – Medianas, desvios interquartílicos e valores máximos e mínimos dos escores atribuídos para o padrão de imunomarcção de BD-3 e TLR-4 nos grupos Teste e Controle em sítios saudáveis e doentes no *baseline* e aos 30 dias pós-operatórios, bem como os resultados das comparações intra e intergrupos. *Diferença significativa (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0,05$).

A técnica imunohistoquímica utilizada apresentou alta especificidade para detecção de BD-3 (Figura 8, A-H) e TLR-4 (Figura 9, A-H). Nos controles negativos das reações imunohistoquímicas, foi observada total ausência de imunorreatividade. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escura confinada ao citoplasma e, em menor escala, à matriz extracelular. A imunomarcção de BD-3 estava presente predominantemente em queratinócitos do tecido epitelial e em fibroblastos do tecido conjuntivo. A imunomarcção de TLR-4 estava presente predominantemente em células do tecido conjuntivo.

Figura 8 – Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para BD-3 em biópsias gengivais de sítios saudáveis (**A-D**) e doentes (**E-H**) nos grupos Teste (**B, D, F, H**) e Controle (**A, C, E, G**). Setas = Células positivas para BD-3; ep = Tecido Epitelial; ct = Tecido Conjuntivo. Escala = 25 µm. Contra-coloração: Hematoxilina.

Figura 9 – Fotomicrografias mostrando o padrão imunomarcção para TLR-4 em biópsias gengivais (tecido conjuntivo) de sítios saudáveis (**A-D**) e doentes (**E-H**) nos grupos Teste (**B, D, F, H**) e Controle (**A, C, E, G**). Setas = Células positivas para TLR-4. Escala = 25 μm. Contra-coloração: Hematoxilina.

5. DISCUSSÃO

Este estudo clínico, controlado, aleatorizado e duplo cego avaliou os efeitos adjuvantes do uso da cepa probiótica *B. lactis* HN019 no tratamento não cirúrgico de indivíduos com Periodontite Crônica generalizada avançada, por meio de análises de parâmetros clínicos, imunológicos, microbiológicos e imunohistoquímicos. Os resultados obtidos demonstraram que a terapia probiótica proporcionou benefícios adicionais ao uso isolado da RAR nas avaliações realizadas aos 30 e 90 dias pós-operatórios.

A prevalência crescente de resistência a antibióticos é convidativa para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas antimicrobianas para tratar doenças bucais relacionadas ao biofilme. Essas estratégias devem, idealmente, reduzir os níveis de biofilme sem afetar o equilíbrio biológico geral da cavidade bucal (ALLAKER; DOUGLAS, 2009). Em 2015, os agentes patogênicos resistentes aos antibióticos causaram mais de 50.000 mortes na Europa e nos Estados Unidos da América. O número deverá aumentar para 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo em 2050 (LANGDON et al., 2016). Os antibióticos podem desequilibrar a microbiota intestinal (MODI et al., 2014; LANGDON et al., 2016; DIGIULIO et al., 2008), reduzindo a diversidade e a abundância da microbiota, o que afeta a capacidade de exclusão competitiva no ambiente intestinal (PANDA et al., 2014; PEREZ-LOPEZ et al., 2014; SCHUBERT et al., 2015). Indiretamente, isso contribui para a destruição da estrutura da comunidade microbiológica, perturbando as interações entre as espécies microbianas. Essas mudanças não são totalmente revertidas, mesmo após vários meses de descontinuação da terapia antibiótica (SEKIROV et al., 2008; MODI et al., 2014). Eventualmente, a disbiose induzida por antibióticos da microbiota intestinal afeta o desenvolvimento e regulação do sistema imunológico e aumenta o risco de doenças relacionadas ao intestino, como as doenças inflamatórias intestinais (YOON; YOON, 2017). É importante destacar que as doenças inflamatórias intestinais podem ter impacto nas doenças periodontais por meios das vias microbiológicas e imunológicas (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO 2016). Há evidências crescentes de que a disbiose da microbiota intestinal está associada à patogênese de transtornos intestinais e extra intestinais (THAISS et al., 2016).

Os resultados obtidos no presente estudo para os valores de PS em bolsas profundas no Grupo Teste aos 90 dias pós-operatórios foram semelhantes ou superiores àqueles obtidos em alguns estudos que utilizaram antibióticos como terapia adjuvante no tratamento não cirúrgico da Periodontite Crônica. Silva et al. (2011) e Feres et al. (2012)

obtiveram reduções médias de 3,61 mm e 3,7 mm, respectivamente, nos valores de PS de bolsas profundas em pacientes com Periodontite Crônica tratados com RAR e administração de terapia antibiótica (400 mg de metronidazol e 500 mg de amoxicilina) por 14 dias. No presente estudo, a redução média de PS em bolsas profundas foi em torno de 3,52 mm no Grupo Teste. Esse valor foi superior àquele obtido por Saleh et al. (2016), os quais demonstraram uma redução média de 2,64 mm nos valores de PS quando se administrou metronidazol e amoxicilina por 7 dias como terapia adjuvante à RAR no tratamento de pacientes com Periodontite Crônica.

Considerando o NIC em bolsas profundas aos 90 dias, o presente estudo obteve maiores valores de ganho de inserção clínica no Grupo Teste quando comparados àqueles obtidos em outros estudos que utilizaram a terapia antibiótica para o tratamento da Periodontite Crônica. Enquanto o ganho médio de inserção deste estudo foi 3,45 mm no Grupo Teste, Silva et al. (2011), Feres et al. (2012), Saleh et al. (2016) e Cosgarea et al. (2016) obtiveram ganhos de 2,97 mm, 3 mm, 1,81 mm e 2,31 mm, respectivamente, no tratamento de pacientes com Periodontite Crônica por meio de RAR e uso adjuvante de antibióticos.

Desde que a progressão da periodontite é mais provável de ocorrer em sítios profundos (COSGAREA et al., 2017), parece relevante avaliar o número residual de tais sítios ou mudanças a fim de atribuir ao paciente uma categoria de risco de progressão da doença. Essas informações demonstram a significância clínica de uma terapia periodontal. No presente estudo, enquanto 58% das bolsas do Grupo Teste, diagnosticadas no *baseline* com valores de PS ≥ 7 mm, foram reduzidas para valores de PS ≤ 3 mm aos 90 dias, apenas 22,2% das bolsas profundas do Grupo Controle foram reduzidas dessa forma. Enquanto 30% dos indivíduos do Grupo Teste apresentavam alto risco para a progressão da doença aos 90 dias, aproximadamente mais da metade dos indivíduos do grupo Controle foram classificados nesta categoria. Esse potencial da terapia probiótica em promover benefícios clínicos adicionais à RAR no tratamento da Periodontite Crônica também foi demonstrado por Teughels et al. (2013), os quais verificaram que o uso adjuvante de *L. reuteri* à RAR reduziu o risco de progressão da periodontite e o percentual de pacientes, dentes e sítios indicados para a terapia periodontal cirúrgica.

Embora a literatura apresente resultados promissores, é importante considerar que os achados obtidos com probióticos não podem ser generalizados (TEUGHEL et al., 2011), uma vez que eles são dependentes da cepa, dosagem, frequência e forma de

administração usadas. De fato, a quantidade ideal de microrganismos probióticos a ser administrada não é facilmente determinada. Acredita-se que ela depende especificamente da cepa e do tipo de efeito benéfico almejado. Portanto, diferentes efeitos podem requerer diferentes cepas e diferentes quantidades de probióticos. Diferentemente dos resultados obtidos em estudos clínicos que utilizaram *L. reuteri* e *L. 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 *L. rhamnosus* e bactérias do gênero *Streptococcus* como adjuvantes à RAR no tratamento de pacientes com Periodontite Crônica (LALEMAN et al., 2015; MORALES et al., 2016). A utilização de *Lactobacillus casei* como monoterapia também não proporcionou benefícios clínicos em indivíduos com Periodontite Crônica generalizada (IMRAN et al., 2016). No presente estudo, a terapia com bactéria probiótica do gênero *Bifidobacterium* proporcionou redução média dos valores de PS (3,5 mm) em bolsas profundas aos 90 dias superior às reduções obtidas por Teughels et al. (2013) e Laleman et al. (2015) (2,88 e 2,37 mm, respectivamente) com a administração de probióticos dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, respectivamente.

A modulação da microbiota do hospedeiro é um dos mecanismos básicos que pode explicar os efeitos benéficos de probióticos na saúde periodontal. O Grupo Teste apresentou maiores percentuais de bactérias do complexo azul no biofilme subgengival quando comparado ao Grupo Controle aos 90 dias. As bactérias desse complexo (*Actinomyces*) 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). Quando comparado ao Grupo Controle, o Grupo Teste apresentou um maior aumento nas contagens de *Streptococcus mitis* aos 90 dias em bolsas profundas. Microrganismos do gênero *Streptococcus* são uma parte importante da microbiota e exercem papel crucial na colonização microbiana da cavidade bucal (RICKARD et al., 2003). Esses microrganismos influenciam a ecologia microbiana bucal devido à capacidade de aderirem a tecidos moles e duros (GIBBONS; VAN HOUTE, 1971), de metabolizarem uma vasta gama de hidratos de carbono (VADEBONCOEUR; PELLETIER, 1997) e de produzirem substâncias antimicrobianas (ROSS et al., 1993) que influenciam a formação e a composição do biofilme bucal. Portanto, um apropriado balanço de microrganismos comensais imunomodulatórios parece ser essencial para a saúde bucal (DEVINE et al., 2015).

No presente estudo, o Grupo Teste apresentou menores percentuais de bactérias do complexo laranja no biofilme subgengival quando comparado ao Grupo Controle aos 30 dias. Algumas espécies desse complexo são capazes de induzir, *in vitro*, a apoptose de leucócitos mono e polimorfonucleados (JEWETT et al., 2000), bem como elevam a produção de colagenase 3 (UITTO et al., 2005) por células epiteliais e a liberação de substâncias pró-inflamatórias por leucócitos periféricos (IL-1 β , TNF- α e IL-8) (SHEIKHI et al., 2000). Uma vez que a perpetuação da periodontite tem sido atribuída à superatividade de células do sistema imune, em termos de produção de citocinas como IL-1 β e TNF- α (PERIASAMY; KOLENBRANDER, 2009), a redução das contagens de espécies do complexo laranja pode ser uma etapa crítica para o sucesso da terapia periodontal. É importante também considerar que o gênero da cepa probiótica administrada no presente estudo possui capacidade de co-agregação com *F. nucleatum*, uma espécie do complexo laranja que atua como uma verdadeira “ponte biológica” na formação de biofilmes bucais, uma vez que adere-se a quase todas as bactérias bucais (HAUKIOJA et al., 2006). *F. nucleatum* facilita a co-agregação e otimização do crescimento de outros patógenos periodontais, como o *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* (SOCRANSKY et al., 1988; PERIASAMY; KOLENBRANDER, 2009). A possível co-agregação de *B. lactis* HN019 com *F. nucleatum* pode ter sido responsável pela diminuição da quantidade de sítios de ligação para bactérias do complexo vermelho no biofilme subgengival. De fato, o Grupo Teste apresentou menor percentual de bactérias do complexo vermelho aos 90 dias quando comparado ao Grupo Controle. É possível também que *B. lactis* HN019 tenha inibido diretamente o crescimento de *P. gingivalis*. Essa hipótese pode ser suportada por alguns estudos *in vitro* que investigaram os efeitos de *Bifidobacterium* na inibição do crescimento de periodontopatógenos (ZHU et al., 2010; JASBERG et al., 2016). A inibição do crescimento de *P. gingivalis* pode ocorrer, por exemplo, devido à ação de *Bifidobacterium* na diminuição do pH e/ou de vitamina K disponível (GLICK et al., 1959; HOJO et al., 2007b). O presente estudo é o primeiro a investigar clinicamente o efeito adjuvante da cepa probiótica *B. lactis* HN019 no tratamento da Periodontite Crônica. Outros estudos clínicos utilizando cepas probióticas diferentes, mas também produtoras de ácido láctico, corroboram os resultados microbiológicos do presente estudo. Nesses estudos foram observadas maiores reduções de *P. gingivalis* no biofilme subgengival de pacientes com doença periodontal tratados com a terapia probiótica quando comparados

àqueles que não receberam a terapia (VIVEKANANDA et al., 2010; INIESTA et al., 2012; TEUGHEL et al., 2013; PENALA et al., 2016).

No presente estudo, o Grupo Teste apresentou menor IP que o Grupo Controle aos 30 dias. Um menor IP também foi observado por Kuru et al. (2017) em pacientes com gengivite experimental tratados previamente com uma cepa probiótica do gênero *Bifidobacterium* quando comparados àqueles não tratados. Algumas cepas probióticas podem formar um biofilme sobre tecidos duros e moles impedindo a adesão de bactérias patogênicas, o que denota um mecanismo de competição por sítios de ligação. Em um estudo conduzido por Haukioja et al. (2006), foi demonstrado que *L. rhamnosus* GG e *L. casei* podem afetar a ecologia bucal prevenindo, especificamente, a aderência de outras bactérias e modificando a composição proteica da película salivar adquirida. Os autores observaram que as bactérias probióticas podem modificar a composição proteica da película salivar por ligação e/ou degradação das proteínas salivares.

O Grupo Teste apresentou número de cópias/ μ L do genoma do probiótico *B. lactis* HN019 em amostras de biofilme subgengival maior do que aquele do Grupo Controle aos 30 e 90 dias. Esse achado sugere uma translocação exógena do probiótico para o biofilme subgengival. Outros estudos utilizando probióticos do gênero *Lactobacillus* também encontraram um aumento da cepa probiótica no biofilme subgengival dos pacientes tratados (MEURMAN et al., 1994; INIESTA et al., 2012; TEKCE et al., 2015). Duas considerações são importantes em relação aos achados descritos anteriormente. A primeira delas refere-se ao fato do Grupo Controle do presente estudo apresentar cópias do genoma de *B. lactis* HN019 no biofilme subgengival. Desde que o Grupo Controle não foi tratado com *B. lactis* HN019, uma justificativa para esse achado seria uma possível ligação cruzada do *primer* com outras espécies de *Bifidobacterium* que ocorrem naturalmente no biofilme. Vários estudos foram realizados utilizando sequências de RNA ribossômico (rRNA) de *Bifidobacterium* para desenvolver *primers* específicos para as diversas espécies. No entanto, o poder de resolução do gene rRNA 16S entre espécies estreitamente relacionadas é limitado (JUNICK; BLAUT, 2012) e não há consenso na literatura sobre qual gene deve ser usado ainda. Embora essa amplificação cruzada possa ter ocorrido, no presente estudo, os *primers* usados para a detecção de *B. lactis* HN019 não promoveram amplificação cruzada com diferentes periodontopatógenos nos testes pilotos executados (dados não mostrados). A segunda consideração que deve ser destacada refere-se aos números elevados de cópias do genoma de *B. lactis* HN019 nas amostras de biofilme subgengival de pacientes do Grupo Teste aos 90 dias pós-

operatórios, ou seja, 60 dias após a interrupção da administração da terapia probiótica. Esse fato sugere que a cepa probiótica *B. lactis* HN019 pode ter integrado-se temporariamente ao biofilme subgengival dos pacientes do Grupo Teste. Jasberg et al. (2016) avaliaram a integração do probiótico *B. lactis* Bb12 e de isolados de *Bifidobacterium dentium* e *Bifidobacterium longum* em modelos *in vitro* de biofilme. Todas as bactérias integraram-se bem aos biofilmes subgengivais compostos por *P. gingivalis*, *A. naeslundii* e *Fusobacterium*.

É importante ressaltar que bactérias probióticas administradas exogenamente não colonizam a cavidade bucal permanentemente. Uma vez que o uso do probiótico for interrompido, as bactérias probióticas são erradicadas da cavidade bucal dentro de algumas semanas, o que demonstra a necessidade de aplicação repetida da terapia para que sejam mantidos os seus efeitos benéficos (TEUGHEL et al., 2008). Em um estudo conduzido por Meurman et al. (1994), os voluntários que consumiram uma dose diária de iogurte contendo *L. rhamnosus* GG apresentaram esta cepa na saliva por até 2 semanas após a interrupção do consumo de iogurte. Iniesta et al. (2012) detectaram a presença do *L. reuteri* na placa subgengival (administrado durante 4 semanas para o tratamento de pacientes com gengivite) 8 semanas após a interrupção da terapia probiótica. Tekce et al. (2015) detectaram a presença da cepa *L. reuteri* (administrado durante 3 semanas para o tratamento de pacientes com Periodontite Crônica) 9 semanas após a interrupção da terapia probiótica.

A terapia probiótica, mesmo quando administrada por um curto período de tempo, parece promover maior resiliência do microbioma bucal diante de fatores de risco para a periodontite, como o acúmulo de placa bacteriana (ROSIER et al., 2017). Mesmo com um IP semelhante ao Grupo Controle aos 90 dias, o Grupo Teste apresentou menor SS. Embora no presente estudo o período de acompanhamento dos pacientes após a terapia periodontal tenha sido curto, é possível especular que a terapia probiótica possa contribuir para o atraso da recolonização bacteriana nestes pacientes. Considerando que a recolonização de patógenos após o tratamento periodontal inicia-se aos 3 meses pós-operatórios (SBORDONE et al., 1990), Tekce et al. (2015) demonstraram que a terapia probiótica é capaz de atrasar essa recolonização. Neste estudo (TEKCE et al., 2015), os pacientes tratados com RAR e *L. reuteri* apresentaram, aos 21, 90 e 180 dias pós-operatórios, menores proporções de microrganismos anaeróbios estritos no biofilme subgengival quando comparados àqueles tratados apenas com RAR, bem como menores quantidades de bolsas periodontais profundas. Apenas aos 360 dias não foram mais

observadas diferenças significativas nas contagens de anaeróbios entre os dois grupos experimentais. Esse atraso na recolonização não foi observado nos estudos de Mdala et al. (2013) e de Bizzarro et al. (2016), os quais acompanharam por 2 anos e 1 ano, respectivamente, pacientes tratados com antibióticos e RAR. Foi demonstrado, em ambos os estudos (Mdala et al., 2013; Bizzarro et al., 2016) que, após 3 meses, não havia mais diferenças no número de microrganismos do complexo vermelho entre pacientes tratados apenas com RAR ou RAR associada ao uso de antibióticos. Sendo assim, os antibióticos, de acordo com esses autores, parecem proporcionar um efeito adicional à RAR a curto prazo.

A modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro é um outro mecanismo pelo qual probióticos podem auxiliar no tratamento das doenças periodontais. Os achados do presente estudo para os níveis de citocinas presentes no FCG merecem ser discutidos considerando dois aspectos. O primeiro deles trata-se do aumento nos níveis de IL-1 β e de IL-8 aos 30 dias quando comparados àqueles obtidos no *baseline* nos grupos Controle e Teste. IL-1 β e IL-8 são citocinas pró-inflamatórias associadas à patogênese da periodontite. Níveis elevados dessas citocinas no FGC influenciam a inflamação e a destruição dos tecidos periodontais (GAMONAL et al., 2000; RAWLINSON et al., 2000). Um aumento de IL-1 β no FCG 30 dias após a RAR também foi observado por Yoshinari et al. (2004). Uma razão para isso seria a presença de um processo inflamatório no ambiente periodontal em virtude da atividade de cicatrização das bolsas periodontais tratadas que ainda estaria ocorrendo neste curto período de observação pós-operatória. O segundo aspecto a ser discutido trata-se do efeito modulador da terapia probiótica na resposta inflamatória dos tecidos periodontais. Analisando os níveis de IL-1 β e IL-8 ajustados pelos valores obtidos no *baseline* em cada grupo nos diferentes períodos, observa-se que o grupo Controle apresentou maiores razões de IL-1 β aos 30 e 90 dias e de IL-8 aos 30 dias quando comparado ao Grupo Teste. Em um estudo prévio, foi também demonstrado que pacientes com Periodontite Crônica tratados com RAR e *L. reuteri* apresentaram menores níveis de IL-1 β no FCG do que aqueles tratados apenas com RAR (SZKARADKIEWICZ et al., 2014). Kuru et al. (2017) demonstraram que pacientes com gengivite experimental tratados com a cepa *B. lactis* DN-173010 durante 30 dias antes do início da gengivite apresentaram menores níveis de IL-1 β no FCG quando comparados àqueles que não fizeram o uso preventivo da referida cepa probiótica.

No que se refere à IL-10, apenas o Grupo Teste apresentou níveis maiores dessa citocina que aqueles do *baseline* 30 dias está envolvida na supressão da destruição

tecidual, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias por monócitos e regulando a duração e extensão da resposta inflamatória aguda (CASSATELLA et al., 1993). Ricoldi et al. (2017) constataram que ratos com periodontite experimental tratados por meio de RAR associada ao uso de *B. lactis* HN019 apresentaram menores níveis de IL-1 β e maiores níveis de IL-10 nos tecidos periodontais quando comparados àqueles tratados apenas com RAR.

A IgA é um importante fator de defesa presente na saliva e influencia a microbiota oral interferindo na adesão e metabolismo bacteriano (PATIL et al., 2011). Rangbulla et al. (2017) monitoraram os níveis de IgA em pacientes com Periodontite Crônica antes e após o tratamento periodontal. Os autores observaram que os níveis de IgA diminuíram após o tratamento periodontal. No presente estudo, não foram observadas reduções significativas de IgA após o tratamento periodontal nos grupos Controle e Teste. Esses resultados são corroborados por estudos prévios (HENSKENS et al., 1996; LIE et al., 2002; HAGEWALD et al., 2002). No estudo de Hagewald et al. (2002), os níveis de IgA não mostraram uma correlação com os parâmetros clínicos periodontais, e, segundo os autores, não apresentaram potencial para diagnóstico e prognóstico. A terapia probiótica no presente estudo também não afetou os níveis de IgA salivares. Não foram observadas diferenças entre os grupos Controle e Teste para os níveis de IgA aos 30 e 90 dias. Estudos clínicos sobre as propriedades imunoreguladoras das bactérias probióticas na cavidade bucal são contraditórios e inconclusivos (JORGENSEN et al., 2016). Enquanto diversos estudos mostraram que bactérias probióticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (PAINEAU et al., 2008; GLEESON et al., 2012; KEKKONEN et al., 2008; TIOLLIER et al., 2007; DONG et al., 2013) não proporcionaram aumento nos níveis de IgA, outros estudos apresentaram resultados contrastantes (SURONO et al., 2011; RIZZARDINI et al., 2012; SHIMIZU et al., 2014; KOTANI et al., 2010; ASAMA et al., 2015) em pacientes que receberam estirpes probióticas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ou *Enterococcus*. Pode haver várias razões para os resultados conflitantes, como modelos de estudo heterogêneos, tipo de saliva e metodologia analítica (JORGENSEN et al., 2016). Além disso, a saliva examinada pode não refletir o conteúdo das glândulas salivares em totalidade.

Nas análises de biópsias gengivais de sítos doentes, observou-se um aumento de BD-3 e TLR-4 promovido pela terapia probiótica e, também, pelo tratamento periodontal propriamente dito. BD são peptídeos antimicrobianos importantes na imunidade inata epitelial e suas expressões diferenciais estão associadas com as doenças periodontais

(WANG et al., 2015). Entre as BD, BD-3 são diferencialmente induzidas por estímulos infecciosos ou inflamatórios (KRISANAPRAKORNKIT et al., 2000; HARDER et al., 2001; JIA et al., 2001). Alguns estudos (VARDAR-SENGUL et al., 2007; BISSELL et al., 2004; KUULA et al., 2008) demonstraram que sítios periodontais inflamados apresentaram menores níveis de BD-3 do que sítios saudáveis. De fato, no presente estudo, os grupos Controle e Teste apresentaram um aumento na expressão de BD-3 em sítios doentes após o tratamento periodontal. TLR-4 é um receptor de reconhecimento que tem um papel fundamental na resposta inata do hospedeiro, uma vez que participa no processo de identificação de lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas (MEDZHITOV et al., 1997). A presença de periodontite pode aumentar a expressão de TLR-4 nos tecidos gengivais (FATEMI et al., 2013). Contudo, ainda não está claro se essa expressão pode ser alterada após o tratamento periodontal dos sítios doentes (KOUTOUZIS et al., 2013). O presente estudo é o primeiro a investigar a expressão de TLR-4 em tecido gengival antes e após o tratamento periodontal. O aumento na expressão de TLR-4 nos grupos Controle e Teste após a terapia periodontal pode, de alguma forma, ser reflexo de uma normalização da resposta imune inata dos tecidos periodontais. Estruturas específicas de lipídeos A no LPS de *P. gingivalis* podem inibir a resposta do TLR-4 a outras bactérias e impedir sua ativação (HAJISHENGALLIS et al., 2012). A redução significativa de *P. gingivalis* observada nos grupos Controle e Teste aos 30 dias pode, em parte, explicar o aumento nos valores de expressão de TLR-4 em ambos os grupos quando comparados aos valores obtidos no *baseline*. No que se refere aos efeitos da terapia probiótica, o Grupo Teste apresentou expressões significativamente maiores de BD-3 e TLR-4 aos 30 dias quando comparado ao Grupo Controle. Estudos prévios já demonstraram o potencial da terapia probiótica em interferir na expressão desses marcadores que estão envolvidos na regulação da imunocompetência da barreira epitelial. Oliveira et al. (2017) investigaram os efeitos da administração tópica de *B. lactis* HN019 na periodontite experimental em ratos. Os autores observaram que a terapia probiótica aumentou a expressão de BD-3 nos tecidos periodontais e reduziu a inflamação periodontal. A administração de *L. casei* CRL 431 em camundongos saudáveis aumentou o número de células positivas para TLR-4 quando os mesmos foram comparados aos animais não tratados com o probiótico. Esse achado, segundo os autores, pode representar uma melhora dos mecanismos fisiológicos de vigilância contra bactérias patogênicas (CASTILLO et al., 2011).

O presente estudo é o primeiro a demonstrar o potencial de uma bactéria probiótica do gênero *Bifidobacterium* no tratamento não cirúrgico da Periodontite Crônica. Uma limitação deste estudo é o curto período de avaliação dos pacientes tratados. Um acompanhamento desses pacientes em períodos mais longos seria importante para verificar se os efeitos adicionais proporcionados pela terapia probiótica à RAR seriam mantidos ao longo do tempo. Novos estudos são ainda fundamentais para avaliar a possível influência de diversos fatores relacionados à terapia probiótica nos resultados obtidos, tais como: dose diária, frequência de administração diária, período de administração (antes, durante ou após as refeições), duração da administração, veículo usado para a liberação do probiótico (comida fermentada, bebida, cápsula, comprimido ou pó), viabilidade da cepa probiótica e tempo de permanência da cepa probiótica no ambiente bucal após a descontinuação da terapia. Os efeitos de bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium* em pacientes que apresentam fatores de risco sistêmicos para as doenças periodontais ou portadores de Periodontite Agressiva também devem ser investigados.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a utilização do probiótico *B. lactis* HN019 como recurso adjuvante à RAR promove benefícios clínicos, microbiológicos e imunológicos adicionais no tratamento de pacientes com Periodontite Crônica generalizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. AAS, J. A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5721-32, Nov 2005.
2. ABUSLEME, L. et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. **ISME J**, v. 7, n. 5, p. 1016-25, May 2013.
3. ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. W. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, n. 1, p. 8-13, Jan 2009.
4. AMROUCHE, T. **Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries: analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués**. 2005. Tese. Université Laval.
5. ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, Dec 1999.
6. ARUNI, A. W. et al. The Biofilm Community-Rebels with a Cause. **Curr Oral Health Rep**, v. 2, n. 1, p. 48-56, Mar 1 2015.
7. ASAMA, T. et al. Lactobacillus kunkeei YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. **J Appl Microbiol**, v. 119, n. 3, p. 818-26, Sep 2015.
8. BASS, C. C. An effective method of personal oral hygiene; part II. **J La State Med Soc**, v. 106, n. 3, p. 100-12, Mar 1954.
9. BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R. P. Microbial shift and periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 55, n. 1, p. 36-47, Feb 2011.
10. BISSELL, J. et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. **J Oral Pathol Med**, v. 33, n. 5, p. 278-85, May 2004.
11. BIZZARRO, S. et al. Microbial profiles at baseline and not the use of antibiotics determine the clinical outcome of the treatment of chronic periodontitis. **Sci Rep**, v. 6, p. 20205, Feb 1 2016.
12. BOSCH, M. et al. Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 5, p. 539-49, May 2012.
13. CASSATELLA, M. A. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **J Exp Med**, v. 178, n. 6, p. 2207-11, Dec 1 1993.
14. CASTILLO, N. A.; PERDIGON, G.; DE MORENO DE LEBLANC, A. Oral administration of a probiotic Lactobacillus modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice. **BMC Microbiol**, v. 11, p. 177, Aug 3 2011.
15. CHAMPAGNE, C. P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **Int J Food Microbiol**, v. 149, n. 3, p. 185-93, Oct 3 2011.

16. CIONCA, N. et al. Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 80, n. 3, p. 364-71, Mar 2009
17. COMMANE, D. et al. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutat Res**, v. 591, n. 1-2, p. 276-89, Dec 11 2005.
18. COSGAREA, R. et al. One year results of a randomized controlled clinical study evaluating the effects of non-surgical periodontal therapy of chronic periodontitis in conjunction with three or seven days systemic administration of amoxicillin/metronidazole. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179592, 2017.
19. COSGAREA, R. et al. Non-surgical periodontal treatment in conjunction with 3 or 7 days systemic administration of amoxicillin and metronidazole in severe chronic periodontitis patients. A placebo-controlled randomized clinical study. **J Clin Periodontol**, v. 43, n. 9, p. 767-77, Sep 2016.
20. COSSEAU, C. et al. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. **Infect Immun**, v. 76, n. 9, p. 4163-75, Sep 2008.
21. DANSER, M. M. et al. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. **J Periodontol**, v. 67, n. 5, p. 478-85, May 1996.
22. DEVINE, D. A.; MARSH, P. D.; MEADE, J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. **J Oral Microbiol**, v. 7, p. 26941, 2015.
23. DIGIULIO, D. B. et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e3056, Aug 26 2008.
24. DONG, H. et al. Immunomodulatory effects of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* Shirota in healthy older volunteers. **Eur J Nutr**, v. 52, n. 8, p. 1853-63, Dec 2013.
25. EKE, P. I. et al. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. **J Dent Res**, v. 91, n. 10, p. 914-20, Oct 2012.
26. FAO/WHO, J. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London. **Ontario, Canada**, 2002.http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
27. FATEMI, K. et al. Comparison of relative TLR-2 and TLR-4 expression level of disease and healthy gingival tissue of smoking and non-smoking patients and periodontally healthy control patients. **Aust Dent J**, v. 58, n. 3, p. 315-20, Sep 2013.
28. FERES, M. et al. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 12, p. 1149-58, Dec 2012.

29. GAMONAL, J. et al. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. **J Periodontol**, v. 71, n. 10, p. 1535-45, Oct 2000.
30. GIBBONS, R. J.; VAN HOUTE, J. Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. **Infect Immun**, v. 3, n. 4, p. 567-73, Apr 1971.
31. GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 81, n. 4, p. 591-606, Dec 2008.
32. GLEESON, M. et al. Effects of a *Lactobacillus salivarius* probiotic intervention on infection, cold symptom duration and severity, and mucosal immunity in endurance athletes. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 22, n. 4, p. 235-42, Aug 2012.
33. GLICK, M. C.; ZILLIKEN, F.; GYORGY, P. Supplementary growth promoting effect of 2-methyl-1,4-naphthoquinone of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*. **J Bacteriol**, v. 77, n. 2, p. 230-6, Feb 1959.
34. GORDON, D. M. The potential of bacteriocin-producing probiotics and associated caveats. **Future Microbiol**, v. 4, n. 8, p. 941-3, Oct 2009.
35. GRUNER, D.; PARIS, S.; SCHWENDICKE, F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. **J Dent**, v. 48, p. 16-25, May 2016.
36. HAGEWALD, S. et al. Salivary IgA subclasses and bacteria-reactive IgA in patients with aggressive periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 37, n. 5, p. 333-9, Oct 2002.
37. HAJISHENGALLIS, G.; DARVEAU, R. P.; CURTIS, M. A. The keystone-pathogen hypothesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 717-25, Oct 2012.
38. HARDER, J. et al. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. **J Biol Chem**, v. 276, n. 8, p. 5707-13, Feb 23 2001.
39. HAUKIOJA, A. Probiotics and oral health. **Eur J Dent**, v. 4, n. 3, p. 348-55, Jul 2010.
40. HAUKIOJA, A. et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, n. 5, p. 326-32, Oct 2006.
41. HENSKENS, Y. M. et al. Effect of periodontal treatment on the protein composition of whole and parotid saliva. **J Periodontol**, v. 67, n. 3, p. 205-12, Mar 1996.
42. HERRERA, D. et al. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, v. 29 Suppl 3, p. 136-59; discussion 160-2, 2002.

43. HOJO, K. et al. Distribution of salivary *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in periodontal health and disease. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 71, n. 1, p. 152-7, Jan 2007a.
44. HOJO, K. et al. Reduction of vitamin K concentration by salivary *Bifidobacterium* strains and their possible nutritional competition with *Porphyromonas gingivalis*. **J Appl Microbiol**, v. 103, n. 5, p. 1969-74, Nov 2007b.
45. IMRAN, M. Y. et al. Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. **Int J Biol Macromol**, v. 93, n. Pt A, p. 731-745, Dec 2016.
46. INCE, G. et al. Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. **J Periodontol**, v. 86, n. 6, p. 746-54, Jun 2015.
47. INIESTA, M. et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 8, p. 736-44, Aug 2012.
48. JASBERG, H. et al. *Bifidobacteria* inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. **Eur J Oral Sci**, v. 124, n. 3, p. 251-8, Jun 2016.
49. JEPSEN, K.; JEPSEN, S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 71, n. 1, p. 82-112, Jun 2016.
50. JEWETT, A. et al. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. **Infect Immun**, v. 68, n. 4, p. 1893-8, Apr 2000.
51. JIA, H. P. et al. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. **Gene**, v. 263, n. 1-2, p. 211-8, Jan 24 2001.
52. JORGENSEN, M. R. et al. *Lactobacillus reuteri* supplements do not affect salivary IgA or cytokine levels in healthy subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **Acta Odontol Scand**, v. 74, n. 5, p. 399-404, Jul 2016.
53. JUNICK, J.; BLAUT, M. Quantification of human fecal *bifidobacterium* species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the *groEL* gene. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 8, p. 2613-22, Apr 2012.
54. KEKKONEN, R. A. et al. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 13, p. 2029-36, Apr 7 2008.
55. KOTANI, Y. et al. Oral intake of *Lactobacillus pentosus* strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. **Immun Ageing**, v. 7, p. 11, Aug 26 2010.

56. KOUTOUZIS, T. et al. Innate immune receptor expression in peri-implant tissues of patients with different susceptibility to periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 84, n. 2, p. 221-9, Feb 2013.
57. KRISANAPRAKORNKIT, S. et al. 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**, v. 68, n. 5, p. 2907-15, May 2000.
58. KUMAR, P. S.; MASON, M. R. Mouthguards: does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health? **Front Cell Infect Microbiol**, v. 5, p. 35, 2015.
59. KURU, B. E. et al. The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. **J Periodontol**, v. 88, n. 11, p. 1115-1123, Nov 2017.
60. KUULA, H. 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**, v. 53, n. 2, p. 175-86, Feb 2008.
61. LALEMAN, I. et al. The effect of a streptococci containing probiotic in periodontal therapy: a randomized controlled trial. **J Clin Periodontol**, v. 42, n. 11, p. 1032-41, Nov 2015.
62. LANGDON, A.; CROOK, N.; DANTAS, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. **Genome Med**, v. 8, n. 1, p. 39, Apr 13 2016.
63. LIE, M. A. et al. Parotid salivary S-IgA antibodies during experimental gingivitis in smokers and non-smokers. **J Periodontal Res**, v. 37, n. 2, p. 86-92, Apr 2002.
64. LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-8, Feb 12 1965.
65. LIRA-JUNIOR, R.; FIGUEREDO, C. M. Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions? **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 35, p. 7963-72, Sep 21 2016.
66. LOESCHE, W. J.; GROSSMAN, N. S. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 727-52, table of contents, Oct 2001.
67. LUCAS, V. S.; BEIGHTON, D.; ROBERTS, G. J. Composition of the oral streptococcal flora in healthy children. **J Dent**, v. 28, n. 1, p. 45-50, Jan 2000.
68. MARTIN-CABEZAS, R. et al. Clinical efficacy of probiotics as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Periodontol**, v. 43, n. 6, p. 520-30, Jun 2016.
69. MARTINEZ, R. C.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. **Br J Nutr**, v. 114, n. 12, p. 1993-2015, Dec 28 2015.

70. MDALA, I. et al. Multilevel analysis of bacterial counts from chronic periodontitis after root planing/scaling, surgery, and systemic and local antibiotics: 2-year results. **J Oral Microbiol**, v. 5, 2013.
71. MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-7, Jul 24 1997.
72. MESSORA, M; SILVA, P; INVERNICI, M; FURLANETO, F. Probióticos na terapia periodontal. In: Romito, G.A; HOLZHAUSEN, M; SARAIVA, L; MENDES, M. PANNUTI; VILLAR, C.C. **Estratégias Terapêuticas Atuais no Manejo da Doença Periodontal e Peri-implantar**. 1.ed. São Paulo: Nova Odessa, 2017. Cap.,26, p.xx-xx.
73. MEURMAN, J. H. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? **Eur J Oral Sci**, v. 113, n. 3, p. 188-96, Jun 2005.
74. MEURMAN JH; ANTILA H; S, S. Recovery of Lactobacillus strain GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium. **Microb Ecol Health Dis**, n. 7, 1994.
75. MODI, S. R.; COLLINS, J. J.; RELMAN, D. A. Antibiotics and the gut microbiota. **J Clin Invest**, v. 124, n. 10, p. 4212-8, Oct 2014.
76. MORALES, A. 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**, v. 87, n. 8, p. 944-52, Aug 2016.
77. MOREIRA, A. L. et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. **J Periodontol**, v. 86, n. 3, p. 376-86, Mar 2015.
78. OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions - A review. **Int J Med Microbiol**, v. 300, n. 1, p. 57-62, Jan 2010.
79. OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Ann Periodontol**, v. 1, n. 1, p. 821-78, Nov 1996.
80. OLIVEIRA, L. F. et al. Benefits of Bifidobacterium animalis subsp. lactis Probiotic in Experimental Periodontitis. **J Periodontol**, v. 88, n. 2, p. 197-208, Feb 2017.
81. OUWEHAND, A. C. et al. Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. **Bull Int Dairy Fed**, v. 380, p. 4-19, 2003.
82. PAINEAU, D. et al. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 107-13, Jun 2008.
83. PANDA, S. et al. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95476, 2014.
84. PATIL, P. B.; PATIL, B. R. Saliva: A diagnostic biomarker of periodontal diseases. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 15, n. 4, p. 310, 2011.

85. PENALA, S. et al. Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: A randomized controlled trial. **J Res Pharm Pract**, v. 5, n. 2, p. 86-93, Apr-Jun 2016.
86. PEREZ-LOPEZ, A. et al. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 3, p. 135-48, Mar 2016.
87. PERIASAMY, S.; KOLENBRANDER, P. E. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. **J Bacteriol**, v. 191, n. 22, p. 6804-11, Nov 2009.
88. QIN, Y. L. et al. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 2, p. 162-7, Apr 2008.
89. RANGBULLA, V. et al. Salivary IgA, Interleukin-1beta and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients. **Chin J Dent Res**, v. 20, n. 1, p. 43-51, 2017.
90. RAWLINSON, A. et al. Interleukin-1 and IL-1 receptor antagonist in gingival crevicular fluid. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 10, p. 738-43, Oct 2000.
91. RICKARD, A. H. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 2, p. 94-100, Feb 2003.
92. RICOLDI, M. S. T. et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179946, 2017.
93. RIZZARDINI, G. et al. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12(R) and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. casei 431(R) in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **Br J Nutr**, v. 107, n. 6, p. 876-84, Mar 2012.
94. ROSIER, B. T.; MARSH, P. D.; MIRA, A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. **J Dent Res**, p. 22034517742139, Nov 1 2017.
95. ROSS, K. F.; RONSON, C. W.; TAGG, J. R. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, n. 7, p. 2014-21, Jul 1993.
96. SALEH, A. et al. Comparison of adjunctive azithromycin and amoxicillin/metronidazole for patients with chronic periodontitis: preliminary randomized control trial. **Aust Dent J**, v. 61, n. 4, p. 469-481, Dec 2016.
97. SAMPAIO, E. D. M. **Azitromicina no tratamento da periodontite crônica-acompanhamento de seis meses**. Tese. Universidade de Guarulhos (Mestrado em Periodontia). Faculdade de Odontologia. Guarulhos. 2009:71p
98. SBORDONE, L. et al. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. **J Periodontol**, v. 61, n. 9, p. 579-84, Sep 1990.

99. SCHUBERT, A. M.; SINANI, H.; SCHLOSS, P. D. Antibiotic-Induced Alterations of the Murine Gut Microbiota and Subsequent Effects on Colonization Resistance against *Clostridium difficile*. **MBio**, v. 6, n. 4, p. e00974, Jul 14 2015.
100. SEKIROV, I. et al. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. **Infect Immun**, v. 76, n. 10, p. 4726-36, Oct 2008.
101. SGOLASTRA, F. et al. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol**, v. 83, n. 10, p. 1257-69, Oct 2012.
102. SHAH, M. P.; GUJJARI, S. K.; CHANDRASEKHAR, V. S. Evaluation of the effect of probiotic (inersan(R)) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. **J Clin Diagn Res**, v. 7, n. 3, p. 595-600, Mar 2013.
103. SHEIKHI, M.; GUSTAFSSON, A.; JARSTRAND, C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*-activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 10, p. 758-62, Oct 2000.
104. SHIMIZU, K. et al. The effects of *Lactobacillus pentosus* strain b240 and appropriate physical training on salivary secretory IgA levels in elderly adults with low physical fitness: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Clin Biochem Nutr**, v. 54, n. 1, p. 61-6, Jan 2014.
105. SILVA, M. P. et al. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 9, p. 828-37, Sep 2011.
106. SLAMA, T. G. et al. A clinician's guide to the appropriate and accurate use of antibiotics: the Council for Appropriate and Rational Antibiotic Therapy (CARAT) criteria. **Am J Med**, v. 118 Suppl 7A, p. 1S-6S, Jul 2005.
107. SLIEPEN, I. et al. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. **J Dent Res**, v. 88, n. 11, p. 1026-30, Nov 2009.
108. SMITH, G. L.; SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C. M. Non-isotopic DNA probes for the identification of subgingival microorganisms. **Oral Microbiol Immunol**, v. 4, n. 1, p. 41-6, Mar 1989.
109. SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; DZINK, J. L. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. **J Clin Periodontol**, v. 15, n. 7, p. 440-4, Aug 1988.
110. SOCRANSKY, S. S. et al. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, v. 17, n. 4, p. 788-92, Oct 1994.
111. STAMATOVA, I.; MEURMAN, J. H. Probiotics and periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 51, p. 141-51, 2009.

112. SURONO, I. S. et al. Novel probiotic *Enterococcus faecium* IS-27526 supplementation increased total salivary sIgA level and bodyweight of pre-school children: a pilot study. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 496-500, Dec 2011.
113. SZKARADKIEWICZ, A. K.; STOPA, J.; KARPINSKI, T. M. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 62, n. 6, p. 495-500, Dec 2014.
114. TEKCE, M. et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. **J Clin Periodontol**, v. 42, n. 4, p. 363-72, Apr 2015.
115. TEUGHEL, W. et al. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 11, p. 1025-35, Nov 2013.
116. TEUGHEL, W.; LOOZEN, G.; QUIRYNEN, M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? **J Clin Periodontol**, v. 38 Suppl 11, p. 159-77, Mar 2011.
117. TEUGHEL, W. et al. Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. **J Dent Res**, v. 86, n. 11, p. 1078-82, Nov 2007.
118. TEUGHEL, W. et al. Probiotics and oral healthcare. **Periodontol 2000**, v. 48, p. 111-47, 2008.
119. THAISS, C. A. et al. The microbiome and innate immunity. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 65-74, Jul 7 2016.
120. TIOLLIER, E. et al. Effect of a probiotics supplementation on respiratory infections and immune and hormonal parameters during intense military training. **Mil Med**, v. 172, n. 9, p. 1006-11, Sep 2007.
121. TSUBURA, S. et al. The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 28, n. 11, p. 1353-6, Nov 2009.
122. TWETMAN, S. et al. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. **Acta Odontol Scand**, v. 67, n. 1, p. 19-24, 2009.
123. UITTO, V. J. et al. *Fusobacterium nucleatum* increases collagenase 3 production and migration of epithelial cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 2, p. 1171-9, Feb 2005.
124. VADEBONCOEUR, C.; PELLETIER, M. The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. **FEMS Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 187-207, Feb 1997.
125. VARDAR-SENGUL, S. et al. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. **J Periodontol Res**, v. 42, n. 5, p. 429-37, Oct 2007.
126. VIVEKANANDA, M. R.; VANDANA, K. L.; BHAT, K. G. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal

- disease: a preliminary randomized clinical trial. **J Oral Microbiol**, v. 2, Nov 2010.
127. WANG, P. et al. Relationship between expression of human gingival beta-defensins and levels of periodontopathogens in subgingival plaque. **J Periodontal Res**, v. 50, n. 1, p. 113-22, Feb 2015.
128. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Oral Health Surveys-Basic Methods. 1997, Geneva. **World Health Organization**, v. 4.
129. YOON, M. Y.; YOON, S. S. Disruption of the Gut Ecosystem by Antibiotics. **Yonsei Med J**, v. 59, n. 1, p. 4-12, Jan 2018.
130. YOSHINARI, N. et al. Effects of scaling and root planing on the amounts of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist and the mRNA expression of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid and gingival tissues. **J Periodontal Res**, v. 39, n. 3, p. 158-67, Jun 2004.
131. ZANDBERGEN, D. et al. The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. **J Periodontol**, v. 84, n. 3, p. 332-51, Mar 2013.
132. ZHANG, G.; CHEN, R.; RUDNEY, J. D. Streptococcus cristatus attenuates Fusobacterium nucleatum-induced interleukin-8 expression in oral epithelial cells. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 4, p. 408-16, Aug 2008.
133. ZHU, Y. et al. Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. **Acta Odontol Scand**, v. 68, n. 5, p. 261-8, Sep 2010.

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Prof. Dr. Michel Reis Messoria, Profa. Dra. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto e Marcos de Mendonça Invernici convidamos você, _____, a participar da pesquisa “Efeitos da terapia probiótica no tratamento da Periodontite: estudo do perfil clínico, microbiológico e imunológico da resposta do hospedeiro..”

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos da Terapia Probiótica como auxiliar ao tratamento não cirúrgico da Periodontite Crônica. Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos, principalmente bactérias, seguros para o consumo e capazes de produzirem efeitos benéficos para a saúde quando ingeridos em quantidades suficientes. Antes do estudo começar, você receberá instruções específicas de higiene oral e uma limpeza em todos os seus dentes. Serão feitas fotografias e radiografias de seus dentes. Logo em seguida, você será encaixado em um dos seguintes grupos experimentais: controle ou teste, sendo que em ambos os grupos você receberá tratamento periodontal adequado. Você não saberá em qual grupo foi encaixado durante todo o estudo. Você receberá no início do estudo 60 pastilhas. Apenas as pastilhas do \ grupo teste apresentarão bactérias vivas (10^9 unidades formadoras de colônias de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* HN019 por grama) as quais são seguras para o consumo e podem promover equilíbrio de sua flora intestinal.

Após a realização profissional de raspagem e alisamento radicular (limpeza) em todos os seus dentes com inflamação, você deverá consumir duas vez ao dia durante 4 semanas, dissolvendo a pastilha na boca antes de dormir e pela manhã. Ao longo do estudo, serão coletadas algumas informações clínicas como análise do hálito, avaliação do sangramento gengival, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, índice de placa, microbiológicas (coleta de bactérias aderidas nas raízes de seus dentes) e imunológicas (coleta do líquido existente entre a gengiva e a raiz de seus dentes, coleta de saliva e coleta de um pequeno pedaço de gengiva como parte da cirurgia periodontal em áreas com indicação de extração de dentes, correção de defeitos estéticos na gengiva ou tratamento da inflamação na gengiva) com a finalidade de documentação e avaliação dos resultados obtidos. Você será acompanhado(a) por um período de 3 meses.

Os procedimentos que poderão lhe causar incômodo são: exames periodontais (procedimentos de sondagem, coleta de placa e coleta de líquido existente entre a gengiva e raiz dos dentes) que serão realizados em sua boca, fotografias, radiografias, raspagem e alisamento dos dentes e anestesia local. Os riscos que podem existir são os mesmos riscos atribuídos às pessoas que se submetem ao tratamento dos dentes e das gengivas e que necessitam de anestesia local. Todos os procedimentos necessários para minimização dos riscos existentes serão cuidadosamente observados. O consumo do probiótico poderá provocar gases intestinais temporários e mínimo desconforto.

Todos os dados relacionados com você serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados será realizada preservando sempre a sua

identidade. Você será identificado(a) por um número ou apenas por suas iniciais, não tendo seu nome ou dados que lhe possa identificar revelados.

A sua participação não é obrigatória e você poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não participação neste projeto de pesquisa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Você terá garantido o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte urbano e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames.

O presente Termo, confeccionado em duas vias de igual teor, será assinado na última página e rubricado nas demais páginas pelos pesquisadores e pelo participante da pesquisa. Você receberá uma via deste termo, com o endereço e telefone do pesquisador e da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP/USP. Caso tenha alguma dúvida, você poderá entrar em contato.

Michel Reis Messoria, PhD
Av. do Café s/n, 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brasil
Departamento de Cirurgia e Periodontia
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
+55 (16) 3602-4140

Anexo 2 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa **COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeitos da terapia probiótica no tratamento da Periodontite: estudo do perfil clínico, microbiológico e imunológico da resposta do hospedeiro.

Pesquisador: Michel Reis Messoria

Versão: 5

CAAE: 06278012.1.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 058894/2015

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E

Anexo 3 - Artigo científico submetido para publicação no periódico *Journal of Clinical Periodontology*.

Effects of *Bifidobacterium* Probiotic on the Treatment of Chronic Periodontitis:

A Controlled Clinical Trial

Marcos M. Invernici, DDS, Ms¹; Sérgio L. Salador, Pharm.D, PhD²; Pedro H. F. Silva, DDS¹; Mariana S. M. Soares¹; DDS, Ms; Renato Casarin, DDS, PhD³; Daniela B. Palioto, DDS, PhD¹; Sérgio L.S. Souza, DDS, PhD¹; Mario Taba Jr., DDS, PhD¹; Arthur B. Novaes Jr, DDS, PhD¹; Flávia A. C. Furlaneto, DDS, PhD¹; Michel R. Messoro, DDS, PhD¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirao Preto / SP, Brazil.

²Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirao Preto / SP, Brazil.

³Department of Prosthodontics and Periodontics, School of Dentistry, Campinas State University – UNICAMP, Piracicaba / SP, Brazil.

Corresponding author:

Michel R. Messoro

Av. Café s/n Ribeirão Preto-SP 14020-150

Telephone number: +55 16 3315 4135 Fax number: +55 16 3315 4788

Email address: m.messoro@forp.usp.br

Running title: Probiotic in the treatment of periodontitis

Keywords: Probiotics; Root Planing; Periodontitis; *Bifidobacterium lactis*

Source of Funding and Conflict of Interest: The study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – process #480982/2013-9) awarded to Michel R. Messori. DuPont™ Danisco® Sweeteners Oy (Kantvik, Finland) donated the probiotics. The authors report no conflicts of interest related to this study.

ABSTRACT

Aim: This randomized placebo-controlled clinical trial evaluated the effect of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) HN019-containing probiotic lozenges as adjuvant to scaling and root planing (SRP) in patients with generalized chronic periodontitis.

Materials and Methods: Forty-one chronic periodontitis patients were recruited and monitored clinically, immunologically, and microbiologically at baseline (before SRP) and 30 and 90 days after SRP. All patients were randomly assigned to a Test (Probiotic+SRP, n=20) or Control (Placebo+SRP, n=21) group. The probiotic lozenges were used twice a day for 30 days. The data were statistically analyzed.

Results: The Test group presented a decrease in probing pocket depth and a clinical attachment gain significantly higher than those of the Control group at 90 days. The Test group also demonstrated significantly fewer periodontal pathogens of red and orange complexes, as well as lower proinflammatory cytokine levels when compared to the Control group. Only the Test group showed an increase in the number of *B. lactis* HN019 genome copies on subgingival biofilm at 30 and 90 days.

Conclusion: The use of *B. lactis* HN019 as an adjunct to SRP promotes additional clinical, microbiological, and immunological benefits in the treatment of chronic periodontitis (NCT03408548).

CLINICAL RELEVANCE

Scientific rationale for the study: *Lactobacillus* probiotics have been investigated for the treatment of periodontitis. However, the effects of the genus *Bifidobacterium* on periodontitis are poorly known.

Principal findings: *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) HN019 probiotic significantly improved clinical periodontal parameters, eliminated periodontal pathogens more effectively, and reduced the levels of proinflammatory cytokines in the gingival crevicular fluid.

Practical implications: The use of *B. lactis* HN019 as an adjunct to scaling and root planing may reduce the need for additional periodontal therapies after non-surgical treatment of chronic periodontitis.

INTRODUCTION

Scaling and root planing (SRP) is the gold standard for the treatment of periodontitis (Berezow & Darveau, 2011). However, recolonization by periodontopathogenic bacteria and recurrence of the disease are quite common after the treatment of severe cases of periodontitis (Berezow & Darveau, 2011). Given the limitations of SRP in the treatment of periodontitis (Berezow & Darveau, 2011), new adjuvant therapies – antibiotic therapy, antimicrobial photodynamic therapy, and probiotic therapy – have been proposed.

The Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO) defined probiotics as “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” (FAO/WHO, 2002). 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 proinflammatory cytokines, and potentiate the effects of SRP (Ince et al., 2015; Shah et al., 2013; Tekce et al., 2015; Teughels et al. 2013; Vivekananda et al., 2010).

To date, studies on the effects of probiotics on periodontal diseases have used mainly microorganisms of the genus *Lactobacillus*. However, other potential probiotics should be investigated. Hojo et al. (2007) observed that *Bifidobacterium* species and their counts could be associated with periodontal health and with treatment success in patients with periodontitis. In an *in vitro* study, Jasberg et al. (2016) demonstrated that species of the genus *Bifidobacterium* can adhere strongly to the subgingival biofilm and significantly reduce the count of *Porphyromonas gingivalis*.

Only three studies evaluated the *in vivo* effect of bacteria of the genus *Bifidobacterium* on periodontal disease (Oliveira et al., 2017; Ricoldi et al., 2017; Kuru et al., 2017).

Oliveira et al. (2017) demonstrated that the topical use of *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 promotes a protective effect against alveolar bone loss and connective tissue attachment loss attributable to experimental periodontitis in rats. Ricoldi et al. (2017) concluded that the oral administration of *B. lactis* HN019 potentiates the effects of SRP on experimental periodontitis in rats. Kuru et al. (2017) concluded that the use of a probiotic yogurt supplemented with *Bifidobacterium animalis subsp lactis* DN-173010 can have a positive effect on plaque accumulation and gingival inflammatory parameters after oral hygiene abstinence.

So far, no study has investigated the effects of bacteria of the genus *Bifidobacterium* on non-surgical treatment of periodontitis. This randomized placebo-controlled clinical trial evaluated the effects of *B. lactis* HN019-containing probiotic lozenges as adjuvant to SRP in patients with generalized chronic periodontitis.

MATERIALS AND METHODS

Patient population

Forty-one patients were selected from the population referred to the Periodontal Clinic at the School of Dentistry of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo (FORP-USP, Ribeirao Preto, SP, Brazil). All eligible patients (ClinicalTrials.gov ID: NCT03408548) were thoroughly informed of the nature and potential risks and benefits of their participation in the study and signed an informed consent form. The study protocol was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of FORP-USP (protocol number: 06278012.1.0000.5419). The research was conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and additional requirements.

The sample size was determined using Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). An 80% power was adopted to recognize a significant difference of 1 mm (d) between groups with a 95% confidence interval ($\alpha = 0.05$) and standard deviation (SD) of 1.43 mm (Vivekananda et al., 2010) considering changes in mean clinical attachment level (CAL) as the primary outcome variable and $[Z_a (1.96) + Z_b (0.84)]^2 = 7.84$. Size was calculated using the following formula: $n = \{2[(s)^2/(SD)^2]\} \cdot (Z_a + Z_b)^2$. Therefore, a total of 32 patients were required. However, considering that some patients could be lost to follow-up, 41 patients were enrolled in this study.

Inclusion and exclusion criteria

All patients were diagnosed with generalized chronic periodontitis according to the classification of the American Academy of Periodontology (Armitage, 1999). The inclusion criteria were: (1) age over 30 years, (2) 30% or more of the sites with probing pocket depth (PPD) ≥ 4 mm and CAL ≥ 4 mm, (4) presence of bleeding on probing (BOP) and a minimum of five teeth with at least one site with CAL and PPD ≥ 5 mm. All patients had to be in good general health.

The exclusion criteria were: (1) cause-related periodontal therapy or antimicrobial therapy in the previous 6 months, (2) systemic conditions that could influence the progression of periodontitis or the treatment response, (3) smoking, (4) need of prophylactic antibiotic therapy for routine dental procedures, and (5) long-term administration of anti-inflammatory medications.

Experimental design, allocation concealment, and treatment protocol

According to a random numeric table generated by computer software, the study coordinator (M.R.M.) allocated each patient to one of the following groups: Control

(SRP; 21 patients) or Test (SRP + probiotic therapy, 20 patients). Before the study began, the selected individuals were identified by a numeric code that designated the experimental group to which they belonged. The study coordinator (M.R.M.) revealed the meaning of each code only after conducting the statistical analysis of the experimental data.

The patients received lozenges containing 10 mg of probiotic (Test group) or placebo (Control group). In the Test group, the lozenges had 10^9 colony-forming units (CFUs) of *B. lactis* HN019 (HOWARU® Bifido LYO 40 DCU-S, DuPont™ Danisco® Sweeteners Oy, Kantvik, Finland). The same pharmacy prepared identical probiotic and placebo lozenges. Identical plastic bottles containing the probiotic/placebos were sent to the study coordinator (M.R.M.), who wrote the number code of each patient on each bottle, according to the therapy they were assigned to. The coded bottles were given to the examiner (M.S.M.S.), who distributed them to the patients and did not have any access to information about the content of the lozenges. In addition, the patients were blinded to the content of the lozenges and treatment assignment during the study.

Seven days prior to the non-surgical periodontal therapy, all patients received supragingival plaque control and oral hygiene instructions. Within 24 hours, a specialist in periodontics (M.M.I.), who was blinded to the experimental groups, performed supragingival and subgingival SRP on all teeth with periodontal involvement, using hand (Gracey Curettes, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) and ultrasonic instruments. The patients were instructed (immediately after SRP) to take one lozenge twice a day (in the morning and before bedtime) for 30 days. They were also instructed not to take any other probiotic product during the study. The patients received 14 lozenges (placebo or probiotic) per week. At the end of each week, they had to be seen at the FORP-USP Periodontal Clinic. During their visit, they should bring the packs of lozenges taken during the week and then

they received new lozenges for the subsequent week. During the visit, the patients answered a questionnaire about their perception of any side effect observed during the consumption of the dietary supplement. One research assistant (P.H.F.S.) conducted these procedures and monitored the patient's compliance with medication dosage. This assistant was not the examiner or operator in this study.

All patients received microbiological, immunological, and clinical monitoring at baseline, at 30 days, and at 90 days. The evaluations (pre- and post-intervention) were conducted by a single trained and calibrated examiner (M.S.M.S.), who was blinded to the experimental groups.

Examiner calibration

The Kappa coefficient greater than or equal to 0.85 was used for examiner calibration. Ten patients with at least five teeth with PPD and CAL ≥ 5 mm on proximal sites were selected. Each patient was examined twice by a universal North Carolina-15 periodontal probe (PCPUNC156, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), at a 48-hour interval between the first and second assessments.

Clinical measurements

Plaque index (PI) (O'Leary et al., 1972) was employed to assess the patients' oral hygiene status. BOP (Ainamo & Bay, 1976) was recorded based on the presence or absence of bleeding up to 20 seconds after probing at the experimental sites. PI and BOP were scored as plaque and bleeding being absent or present (0 or 1, respectively). PPD was measured from the free gingival margin to the bottom of the periodontal pocket. CAL was measured from the cementoenamel junction to the base of the periodontal pocket. Gingival recession (GR) was measured from the cementoenamel junction to the free gingival

margin. BOP, PPD, CAL, and GR were measured at six sites per tooth. All probing measurements were performed using a manual periodontal probe (PCPUNC156, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

Immunological monitoring

Gingival crevicular fluid (GCF) was collected from four non-contiguous interproximal sites per patient using absorbent paper strips (Periopaper[®], Oralflo Inc., Amityville, NY, USA), as previously described by Luchesi et al. (2013). The amount of total protein of each sample was determined by conventional enzyme immunoassays (ELISA), using commercially available kits (DCTM Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc. Berkeley, CA, USA). IL-1 β , IL-10, and IL-8 levels in GCF samples were determined according to Moreira et al. (2015) using high sensitivity kits (LXSAHM-03 – Techne Corporation, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and the multiplexing instrument (MAGPIX[®] analyzer, Luminex Corporation, Austin, TX, USA). The concentrations of each cytokine were estimated from the standard curve using a five-parameter polynomial equation with specific software (Xponent[®] software, Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

Microbiological monitoring

According to Moreira et al. (2015) subgingival plaque samples were obtained from four non-contiguous interproximal sites from each patient, grouped according to the following PPD categories: moderate pockets (PPD = 4 to 6 mm) and deep pockets (PPD $\geq$ 7 mm). The samples were individually analyzed for the presence of 40 subgingival bacterial species using the checkerboard DNA-DNA hybridization technique (Socransky et al., 2004) at the Microbiology Laboratory of the Guarulhos University (UNG, Guarulhos, SP, Brazil).

B. lactis HN019 was detected and quantified by real-time polymerase chain reaction (q-PCR) using specific primers, as proposed by Junick & Blant (2012). Genomic DNA was extracted and the q-PCR technique was performed using the SYBRGreen system (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA) in StepOne Plus™ Real-Time (Thermo Fisher Scientific). The reactions were carried out in triplicate to amplify the *groEL* gene of the genus *Bifidobacterium* B_ani-f (5'-CACCAATGCGGAAGACCAG- 3') and B_ani-r (5'-GTTGTTGAGAATCAGCGTGG-3') (Junick & Blant, 2012).

Outcome variables

Changes in the mean CAL at 90 days post-SRP were defined as the primary outcome variable. All other parameters were considered secondary outcomes. Sub analyses were made considering PPD at baseline for clinical (PPD, CAL, and GR) and microbiological parameters. Periodontal pockets were classified at baseline as moderate (PPD = 4-6 mm) or deep (PPD $\geq$ 7 mm).

The “need for additional periodontal treatment” was determined according to Cionca et al. (2009). “Risk for periodontal disease progression” was defined at the patient level according to Lang & Tonetti (2003).

Statistical analysis

Each outcome was computed per participant and then averaged across patients in both groups. The significance level was set at 5%.

Within-group and between-group differences in PPD, CAL, GR, PI, BOP, and residual periodontal pockets were assessed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc* test and by Student's t test, respectively. The differences

between groups considering the outcomes “need for additional periodontal treatment” and “risk for periodontal disease progression” were assessed by the Chi-square test.

Microbiological data were presented as mean counts ($\times 10^5$) of individual bacterial species in both groups. Bacterial species were also grouped into complexes, according to Socransky et al. (1998). Friedman’s test was used to detect significant differences within each group. The analyses were performed after adjustments for multiple comparisons (Socransky et al., 1991). The between-group differences in the changes observed at 90 days regarding the mean counts of each bacterial species compared to baseline values were assessed by the Mann-Whitney test. The within-group and between-group differences in the number of copies of *B. lactis* HN019 genome were also assessed by the Mann-Whitney test.

Total protein values were converted to pg/mL. Final cytokine levels were obtained by dividing the initial values provided by the MAGPIX[®] system by the total protein content in GCF samples (pg/mL). Within-group and between-group differences in the mean levels of IL-1 β , IL-8, and IL-10 were assessed by ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test and Student’s *t* test, respectively.

RESULTS

This study started in December 2015 and ended in August 2016. Figure 1 shows the study design. All patients successfully completed the study. The demographic characteristics didn't show any difference between groups (for additional details, see online supplementary material). No adverse effects were observed after the use of probiotics.

Clinical monitoring

Table 1 shows the PI, BOP, PPD, CAL, and GR values for the Control and Test groups.

In moderate and deep pockets, the Test group had larger clinical attachment gain and lower PPD than the Control group at 90 days ($P<0.05$).

Regarding the number of residual pockets (Table 1), the Control group had a higher number of moderate (at 30 and 90 days) and deep (at 90 days) pockets than the Test group ($P<0.05$).

As to the risk of progression of periodontal disease (Table 2), while 55% of the patients in the Test group were at a low risk, only 30% of the patients in the Control group were classified as such. The Test group had a lower rate of patients in need for additional periodontal treatment on more than three sites when compared to the Control group at 90 days ($P<0.05$).

Microbiological monitoring

Figure 2 shows the mean total count ($\times 10^5$) of 40 subgingival species in moderate and deep periodontal pockets for the Control and Test groups, as well as changes in the mean counts of each bacterial species at 90 days relative to baseline values. The Test group exhibited a larger count of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus mitis* and a more pronounced reduction in the count of *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum vincentii*, *Campylobacter showae* and *Eubacterium nodatum* than the Control group ($P<0.05$) for deep periodontal pockets.

Figure 3 shows the mean cumulative proportions of microbial complexes observed in both groups in different experimental periods. Test group showed mean proportions of orange (at 30 days) and red (at 90 days) complexes significantly lower than those of the Control group ($P<0.05$). A significantly larger proportion of blue complex bacteria was also observed in the Test group when compared to the Control group at 90 days ($P<0.05$).

The q-PCR analysis (Figure 4) demonstrated that only the Test group had an increase in the number of copies/ μ L of the genome of *B. lactis* HN019 in subgingival biofilm samples at 30 and 90 days ($P<0.05$).

Immunological monitoring

IL-8, IL-1 β , and IL-10 levels are shown in Figure 5 (A-C). Only the Test group had higher levels of IL-10 than those at baseline at 30 days ($P<0.05$). Figure 5 (E-G) shows the mean ratios between the levels of each cytokine and those at baseline. The Control group had a higher ratio of IL-1 β (at 30 and 90 days) and of IL-8 (at 30 days) when compared to the Test group ($P<0.05$).

DISCUSSION

This double-blind, randomized controlled trial assessed the effects of *B. lactis* HN019 on the non-surgical treatment of individuals with advanced generalized chronic periodontitis by analyzing clinical, immunological, and microbiological parameters. The results show that probiotic therapy as an adjunct to SRP promoted additional benefits in assessments at 30 and 90 postoperative days.

The growing prevalence of antimicrobial resistance has prompted the development of new antimicrobial therapeutic approaches for the treatment of biofilm-related oral diseases. In the present study, the results obtained for PPD and CAL in deep pockets in the Test group at 90 postoperative days were similar to or higher to those obtained in some studies that used antibiotics as adjuvants to SRP for the treatment of chronic periodontitis (Silva et al., 2011; Feres et al., 2012; Saleh et al., 2016).

In the present study, whereas 58% of pockets diagnosed at baseline with PPD ≥ 7 mm decreased to PPD ≤ 3 mm at 90 days in the Test group, only 22% of deep pockets in the Control group were reduced. Teughels et al. (2013) also verified that the use of probiotics as adjuvants to SRP reduced the risk of progression of periodontitis and the number of patients, teeth, and sites with indication of surgical periodontal treatment. These findings demonstrate the clinical significance of periodontal treatment.

It should be emphasized that the outcomes obtained with probiotics can not be generalized (Teughels et al., 2011), as they depend on the strain, dosage, frequency, and mode of administration. In the present study, probiotic therapy with bacteria of the genus *Bifidobacterium* promoted a reduction of PPD (3.5 mm) in deep pockets larger than those obtained by Teughels et al. (2013) and Laleman et al. (2015) (2.88 and 2.37 mm, respectively) at 90 days, with the administration of probiotics of the genera *Lactobacillus* and *Streptococcus*, respectively.

Modulation of the host's microbiota is one of the basic mechanisms that may explain the beneficial effects of probiotics on periodontal health. The Test group presented higher rates of commensal bacteria on subgingival biofilm when compared with the Control group at 90 days. These commensal bacteria are associated with periodontal health (Aas et al., 2005; Lucas et al., 2000; Hajishengallis et al., 2012; Abusleme et al., 2013; Aruni et al., 2015) and they can help control inflammation and infection of periodontal tissues (Devine et al., 2015; Kumar & Mason, 2015). Compared with the Control group, the Test group presented lower proportions of some Gram-negative anaerobic bacteria species involved in the pathogenesis of periodontal diseases. In a preclinical study, Oliveira et al (2017) demonstrated that *B. lactis* HN019 reduces the amount of periodontopathogens on biofilm. The possible coaggregation of *Bifidobacterium* with *Fusobacterium nucleatum* can reduce the amount of binding sites for periodontopathogens on biofilm (Haukioja et

al., 2006). Furthermore, probiotic bacteria can produce several components that act as antimicrobial agents (Gillor et al., 2008; Gordon, 2009). Some in vitro studies have shown that *Bifidobacterium* can inhibit the growth of periodontopathogens such as *P. gingivalis* (Zhu et al., 2010; Jasberg et al., 2016).

In the present study, whereas no differences were observed between the Control and Test groups at 30 postoperative days regarding the proportions of red complex bacteria, the Control Group had higher percentual of these bacteria at 90 days. It could suggest that probiotic might have acted delaying the recolonization of periodontal pockets by these bacteria. This delay in recolonization was also observed in some studies that assessed the treatment of chronic periodontitis with adjuvant antibiotic therapy (Mdala et al., 2013; Bizzarro et al., 2016). However, some studies have shown that no differences were seen in the number of red complex pathogens between patients treated with SRP and those treated with SRP combined with antibiotic therapy after 3 months (Mdala et al., 2013; Bizzarro et al., 2016). On the other hand, Tekce et al. (2015) observed that patients treated with SRP and probiotics presented rates of strict anaerobic microorganisms on subgingival biofilm similar to those of the patients treated exclusively with SRP only at 360 postoperative days.

The Test group had a greater number of copies/ μ L of the genome of *B. lactis* HN019 in subgingival biofilm samples than the Control group at 30 and 90 days, which suggests exogenous translocation of the probiotic to the subgingival biofilm. *B. lactis* HN019 was detected in the Test group 60 days after discontinuation of probiotic therapy. This fact suggests that *B. lactis* HN019 might have temporarily integrated into the subgingival biofilm. Meurman et al. (1994), Iniesta et al. (2012), and Tekce et al. (2015) also noted the persistence of bacteria of the genus *Lactobacillus* in the oral cavity at 2, 8, and 9 weeks, respectively, after discontinuation of probiotic therapy.

The Control group presented higher levels of IL-1 β (30 and 90 days) and of IL-8 (30 days) when compared with the Test group. This finding demonstrates the possible effect of probiotic therapy on modulation of the periodontal inflammatory process. In a recent clinical study, administration of probiotic lactic acid bacteria to patients with chronic periodontitis decreased IL-1 β levels in GCF (Szkaradkiewicz et al., 2017). Kuru et al. (2017) demonstrated that patients with experimental gingivitis previously treated with *B.lactis* DN-173010 presented lower IL-1 β levels in GCF when compared to untreated patients. With respect to IL-10, only the Test group had higher levels of this cytokine when compared with baseline at 30 days. Ricoldi et al. (2017) also demonstrated that *B. lactis* HN019 can increase IL-10 levels at periodontal sites in rats.

The present study is the first one to demonstrate the potential effect of a probiotic bacterium of the genus *Bifidobacterium* on the non-surgical treatment of chronic periodontitis. The short period of assessment was a limitation of this study. A long-term follow-up of these patients would be important to evaluate whether the additional effects obtained with probiotic therapy as an adjunct to SRP are sustained over time. It is also important that future investigations evaluate the persistence of *B. lactis* HN019 in the oral cavity after discontinuation of probiotic therapy, new modes of administration, and other therapeutic regimens.

CONCLUSION

The use of *B. lactis* HN019 as an adjunct to SRP offers additional clinical, microbiological, and immunological benefits in the treatment of periodontal pockets in patients with generalized chronic periodontitis.

REFERENCES

1. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43(11), 5721-5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
2. Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J*, 7(5), 1016-1025. doi: 10.1038/ismej.2012.174
3. Ainamo, J., & Bay, I. (1976). [Periodontal indexes for and in practice]. *Tandlaegebladet*, 80(5), 149-152.
4. Aruni, A. W., Dou, Y., Mishra, A., & Fletcher, H. M. (2015). The Biofilm Community-Rebels with a Cause. *Curr Oral Health Rep*, 2(1), 48-56. doi: 10.1007/s40496-014-0044-5
5. Berezow, A. B., & Darveau, R. P. (2011). Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000*, 55(1), 36-47. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x
6. Bizzarro, S., Laine, M. L., Buijs, M. J., Brandt, B. W., Crielaard, W., Loos, B. G., & Zaura, E. (2016). Microbial profiles at baseline and not the use of antibiotics determine the clinical outcome of the treatment of chronic periodontitis. *Sci Rep*, 6, 20205. doi: 10.1038/srep20205
7. Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G., & Mombelli, A. (2009). Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *J Periodontol*, 80(3), 364-371. doi: 10.1902/jop.2009.080540

8. Devine, D. A., Marsh, P. D., & Meade, J. (2015). Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *J Oral Microbiol*, 7, 26941. doi: 10.3402/jom.v7.26941
9. FAOIWHO, J. (2002). Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London. *Ontario, Canada*.
10. Feres, M., Soares, G. M., Mendes, J. A., Silva, M. P., Faveri, M., Teles, R., Figueiredo, L. C. (2012). Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*, 39(12), 1149-1158. doi: 10.1111/jcpe.12004
11. Gillor, O., Etzion, A., & Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81(4), 591-606. doi: 10.1007/s00253-008-1726-5
12. Gordon, D. M. (2009). The potential of bacteriocin-producing probiotics and associated caveats. *Future Microbiol*, 4(8), 941-943. doi: 10.2217/fmb.09.78
13. Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 10(10), 717-725. doi: 10.1038/nrmicro2873
14. Haukioja, A., Yli-Knuuttila, H., Loimaranta, V., Kari, K., Ouwehand, A. C., Meurman, J. H., & Tenovuo, J. (2006). Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol*, 21(5), 326-332. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00299.x
15. Hojo, K., Mizoguchi, C., Taketomo, N., Ohshima, T., Gomi, K., Arai, T. & Maeda, N. (2007a) Distribution of salivary *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*

- species in periodontal health and disease. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 152-157.
16. Hojo, K., Nagaoka, S., Murata, S., Taketomo, N., Ohshima, T., & Maeda, N. (2007b). Reduction of vitamin K concentration by salivary *Bifidobacterium* strains and their possible nutritional competition with *Porphyromonas gingivalis*. *J Appl Microbiol*, 103(5), 1969-1974. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03436.x
 17. Ince, G., Gursay, H., Ipci, S. D., Cakar, G., Emekli-Alturfan, E., & Yilmaz, S. (2015). Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *J Periodontol*, 86(6), 746-754. doi: 10.1902/jop.2015.140612
 18. Iniesta, M., Herrera, D., Montero, E., Zurbriggen, M., Matos, A. R., Marin, M. J., Sanz, M. (2012). Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*, 39(8), 736-744. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01914.x
 19. Jasberg, H., Soderling, E., Endo, A., Beighton, D., & Haukioja, A. (2016). *Bifidobacteria* inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. *Eur J Oral Sci*, 124(3), 251-258. doi: 10.1111/eos.12266
 20. Junick, J., & Blaut, M. (2012). Quantification of human fecal *bifidobacterium* species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the *groEL* gene. *Appl Environ Microbiol*, 78(8), 2613-2622. doi: 10.1128/AEM.07749-11

21. Kumar, P. S., & Mason, M. R. (2015). Mouthguards: does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health? *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 35. doi: 10.3389/fcimb.2015.00035
22. Kuru, B. E., Laleman, I., Yalnizoglu, T., Kuru, L., & Teughels, W. (2017). The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol*, 88(11), 1115-1123. doi: 10.1902/jop.2017.170213
23. Laleman, I., Yilmaz, E., Ozcelik, O., Haytac, C., Pauwels, M., Herrero, E. R., Teughels, W. (2015). The effect of a streptococci containing probiotic in periodontal therapy: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol*, 42(11), 1032-1041. doi: 10.1111/jcpe.12464
24. Lang, N. P., & Tonetti, M. S. (2003). Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health Prev Dent*, 1(1), 7-16.
25. Lucas, V. S., Beighton, D., & Roberts, G. J. (2000). Composition of the oral streptococcal flora in healthy children. *J Dent*, 28(1), 45-50.
26. Luchesi, V. H., Pimentel, S. P., Kolbe, M. F., Ribeiro, F. V., Casarin, R. C., Nociti, F. H., Jr., Casati, M. Z. (2013). Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 40(8), 781-788. doi: 10.1111/jcpe.12121
27. Mdala, I., Olsen, I., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., de Blasio, B. F., & Thoresen, M. (2013). Multilevel analysis of bacterial counts from chronic periodontitis after root planing/scaling, surgery, and systemic and local antibiotics: 2-year results. *J Oral Microbiol*, 5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20939

28. Meurman JH, Antila H, & S, S. (1994). Recovery of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium. *Microb Ecol Health Dis*(7).
29. Moreira, A. L., Novaes, A. B., Jr., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B., Messori, M. R. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol*, 86(3), 376-386. doi: 10.1902/jop.2014.140392
30. O'Leary, T. J., Drake, R. B., & Naylor, J. E. (1972). The plaque control record. *J Periodontol*, 43(1), 38. doi: 10.1902/jop.1972.43.1.38
31. Oliveira, L. F., Salvador, S. L., Silva, P. H., Furlaneto, F. A., Figueiredo, L., Casarin, R., Messori, M. R. (2017). Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol*, 88(2), 197-208. doi: 10.1902/jop.2016.160217
32. Ricoldi, M. S. T., Furlaneto, F. A. C., Oliveira, L. F. F., Teixeira, G. C., Pischiottini, J. P., Moreira, A. L. G., Messori, M. R. (2017). Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One*, 12(6), e0179946. doi: 10.1371/journal.pone.0179946
33. Saleh, A., Rincon, J., Tan, A., & Firth, M. (2016). Comparison of adjunctive azithromycin and amoxicillin/metronidazole for patients with chronic periodontitis: preliminary randomized control trial. *Aust Dent J*, 61(4), 469-481. doi: 10.1111/adj.12415

34. Shah, M. P., Gujjari, S. K., & Chandrasekhar, V. S. (2013). Evaluation of the effect of probiotic (inersan(R)) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. *J Clin Diagn Res*, 7(3), 595-600. doi: 10.7860/JCDR/2013/5225.2834
35. Silva, M. P., Feres, M., Sirotto, T. A., Soares, G. M., Mendes, J. A., Faveri, M., & Figueiredo, L. C. (2011). Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 38(9), 828-837. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01763.x
36. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25(2), 134-144.
37. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C., & Dibart, S. (1991). Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol*, 18(10), 766-775.
38. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C., Martin, L., Haffajee, J. A., Uzel, N. G., & Goodson, J. M. (2004). Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*, 19(6), 352-362. doi: 10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x
39. Szkaradkiewicz, A. K., Stopa, J., & Karpinski, T. M. (2014). Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 62(6), 495-500. doi: 10.1007/s00005-014-0277-y
40. Tekce, M., Ince, G., Gursoy, H., Dirikan Ipci, S., Cakar, G., Kadir, T., & Yilmaz, S. (2015). Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the

- treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol*, 42(4), 363-372. doi: 10.1111/jcpe.12387
41. Teughels, W., Durukan, A., Ozcelik, O., Pauwels, M., Quirynen, M., & Haytac, M. C. (2013). Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*, 40(11), 1025-1035. doi: 10.1111/jcpe.12155
42. Teughels, W., Loozen, G., & Quirynen, M. (2011). Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11, 159-177. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01665.x
43. Vivekananda, M. R., Vandana, K. L., & Bhat, K. G. (2010). Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol*, 2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5344
44. Zhu, Y., Xiao, L., Shen, D., & Hao, Y. (2010). Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. *Acta Odontol Scand*, 68(5), 261-268. doi: 10.3109/00016357.2010.492235

Table 1 – Means and SD of clinical parameters (PPD, CAL, GR, PI, and BOP), number of moderate and deep pockets and follow-up of pockets detected at baseline in groups Test and Control.

VARIABLE	TIME POINT	EXPERIMENTAL GROUPS				INTERGROUP COMPARISONS		
		Test N=20		Control N=21		Mean difference	Student's <i>t</i> test <i>p</i> value	
		Mean ± SD	Delta± SD Δ 0-30 / 0-90	Mean ± SD	Delta± SD Δ 0-30 / 0-90		Mean	Delta
PPD (mm)								
Overall	Baseline	3.01±0.27		3.10±0.43		0.09	NS	
	30 days	2.53±0.25*	-0.48±0.30	2.78±0.37*	-0.32±0.27	0.25	≤0.05	0.1579
	90 days	2.49±0.27*	-0.52±0.32	2.85±0.34*	-0.25±0.22	0.36	≤0.05	0.0048
Moderate pockets	Baseline	4.47±0.20	-	4.44±0.27	-	0.02	NS	-
	30 days	3.29±0.47*	-1.18±0.37	3.33±0.42*	-1.11±0.41	0.04	NS	NS
	90 days	3.19±0.52*	-1.28±0.41	3.50±0.45*	-0.94±0.42	0.31	≤0.05	0.01
Deep pockets	Baseline	7.27±0.29	-	7.26±0.35	-	0.14	NS	-
	30 days	4.07±1.14*	-3.20±1.00	4.47±1.23*	-2.79±1.11	0.39	NS	NS
	90 days	3.75±1.32*	-3.52±1.19	4.64±1.00*	-2.62±0.88	0.90	0.019	0.0103
CAL (mm)								
Overall	Baseline	3.26±0.39		3.42±0.54		0.16	NS	
	30 days	2.77±0.44*	-0.49±0.37	3.13±0.50*	-0.29±0.26	0.36	≤0.05	0.0855
	90 days	2.77±0.38*	-0.49±0.37	3.24±0.51*	-0.18±0.23	0.47	≤0.05	0.0025
Moderate pockets	Baseline	4.63±0.42	-	4.70±0.45	-	0.07	NS	-
	30 days	3.51±0.65*	-1.12±0.44	3.69±0.56*	-1.01±0.44	0.18	NS	NS
	90 days	3.48±0.59*	-1.15±0.45	3.94±0.63*	-0.76±0.41	0.45	0.022	0.0082
Deep pockets	Baseline	7.48±0.53	-	7.62±0.72	-	0.13	NS	-
	30 days	4.36±1.45*	-3.12±1.27	5.08±1.49*	-2.54±1.33	0.72	NS	NS
	90 days	4.03±1.44*	-3.45±1.21	5.55±1.37*	-2.07±0.97	1.51	0.001	0.0004
GR (mm)								
Overall	Baseline	0.25±0.35	-	0.32±0.33	-	0.07	NS	NS
	30 days	0.23±0.32	-0.02±0.16	0.35±0.33	0.03±0.13	0.12	NS	NS
	90 days	0.27±0.87	0.02±0.12	0.38±0.97	0.06±0.19	0.11	NS	NS
Moderate pockets	Baseline	0.15±0.27	-	0.26±0.25	-	0.10	NS	-
	30 days	0.21±0.33	0.06±0.16	0.36±0.34	-0.10±0.24	0.14	NS	NS
	90 days	0.28±0.34	0.13±0.27	0.43±0.48	-0.17±0.31	0.15	NS	NS
Deep pockets	Baseline	0.26±0.45	-	0.50±0.77	-	0.24	NS	-
	30 days	0.28 ± 0.47	0.02±0.37	0.61±0.91	0.11±0.47	0.33	NS	NS
	90 days	0.28 ± 0.66	0.02±0.62	0.90±1.09	0.40±0.47	0.61	0.038	0.0360
PI after OHI								
Mean Number ± SD (%)								
	Baseline	23.85±15.33 (25.90)	-	26.71±16.60 (27.40)	-	2.71 (1.50)	NS	-
	30 days	14.20±12.73* (15.40)	-9.65±10.52	20.24±17.53* (20.80)	-6.47±11.59	6.51 (5.40)	≤0.05	NS
	90 days	21.65±13.13 (23.50)	-2.20±12.30	27.14±18.64 (27.90)	0.47±12.07	5.49 (4.40)	NS	NS

Table 1 (continued)

BOP after OHI								
Mean Number $\pm$ SD (%)								
	Baseline	30.80 $\pm$ 22.07 (22.10)	-	35.00 $\pm$ 25.84 (24.10)	-	4.20 (2.00)	NS	-
	30 days	17.05 $\pm$ 14.60* (12.20)	-13.75 $\pm$ 14.16	24.05 $\pm$ 19.83* (16.50)	-10.50 $\pm$ 16.17	7.00 (4.30)	≤ 0.05	NS
	90 days	18.80 $\pm$ 16.14* (13.50)	-12.00 $\pm$ 15.49	30.71 $\pm$ 27.86 (21.10)	-4.29 $\pm$ 18.61	11.91 (7.60)	≤ 0.05	NS
Moderate pockets								
Mean Number $\pm$ SD (%)								
	Baseline	28.45 $\pm$ 9.72 (20.40)	-	33.90 $\pm$ 13.12 (23.30)	-	5.45 (2.90)	NS	-
	30 days	13.90 $\pm$ 7.64* (10.00)	-14.55 $\pm$ 8.63	22.86 $\pm$ 14.1* (15.70)	-11.04 $\pm$ 10.35	8.96 (5.70)	≤ 0.05	NS
	90 days	12.50 $\pm$ 6.95* (9.00)	-15.95 $\pm$ 10.58	23.67 $\pm$ 11.6* (16.30)	-10.23 $\pm$ 8.82	11.17 (7.30)	≤ 0.05	0.0674
Deep pockets								
Mean Number $\pm$ SD (%)								
	Baseline	5.60 $\pm$ 3.69 (4.00)	-	6.00 $\pm$ 5.25 (4.10)	-	0.40 (0.10)	NS	-
	30 days	1.25 $\pm$ 2.26* (0.90)	-4.35 $\pm$ 3.66	1.90 $\pm$ 3.41* (1.30)	-4.10 $\pm$ 4.27	0.65 (0.40)	NS	0.8391
	90 days	1.25 $\pm$ 2.42* (0.90)	-4.35 $\pm$ 3.95	2.90 $\pm$ 4.14* (2.00)	-3.10 $\pm$ 2.40	1.65 (1.10)	≤ 0.05	0.2242
Follow-up of moderate pockets detected at baseline								
Mean Number $\pm$ SD (%)								
PPD $\leq$ 3mm	90 days	19.60 $\pm$ 9.33 (68.90)	-	18.38 $\pm$ 8.80 (54.20)	-	1.22 (14.70)	≤ 0.05	-
PPD $\geq$ 4 $\leq$ 6 mm	90 days	8.40 $\pm$ 5.39 (29.10)	-	14.81 $\pm$ 10.54 (43.70)	-	6.41 (14.60)	≤ 0.05	-
PD $\geq$ 7 mm	90 days	0.45 $\pm$ 1.23 (1.60)	-	0.71 $\pm$ 1.30 (2.10)	-	0.26 (0.40)	NS	-
Follow-up of deep pockets detected at baseline								
Mean Number $\pm$ SD (%)								
PPD $\leq$ 3mm	90 days	3.25 $\pm$ 2.50 (58.00)	-	1.33 $\pm$ 1.20 (22.20)	-	1.92 (35.80)	≤ 0.05	-
PPD $\geq$ 4 $\leq$ 6 mm	90 days	1.65 $\pm$ 1.53 (29.50)	-	2.8 $\pm$ 2.56 (46.80)	-	1.15 (17.30)	≤ 0.05	-
PPD $\geq$ 7 mm	90 days	0.7 $\pm$ 1.42 (12.50)	-	1.86 $\pm$ 2.85 (31.00)	-	1.16 (18.50)	≤ 0.05	-

PPD = probing pocket depth; CAL = clinical attachment level; GR=gingival recession; PI = plaque index; BOP = bleeding on probing; SD = standard deviation; OHI = oral hygiene instructions; Moderate pockets = PPD $\geq$ 4 $\leq$ 6 mm; Deep Pockets = PPD $\geq$ 7 mm; NS = no significant difference; *Significant difference when compared to baseline (repeated measures ANOVA, Bonferroni *post hoc* test, $P < 0.05$).

Table 2 – Number and percentage of subjects presenting low (≤ 4 sites with PPD ≥ 5 mm), moderate (5-8 sites with PPD ≥ 5 mm) or high (≥ 9 sites with PPD ≥ 5 mm) risk for disease progression, as well as presenting 0, 1-2 or ≥ 3 sites in need for additional therapy.

VARIABLE	TIME POINT	EXPERIMENTAL GROUPS		INTERGROUP COMPARISONS
		Test N=20 Number (%)	Control N=21 Number (%)	Chi-square for trend <i>p</i> value
Risk for disease progression				
Low	90 days	11 (55.00)	6 (28.60)	0.0863
Moderate	90 days	3 (15.00)	4 (19.00)	
High	90 days	6 (30.00)	11 (52.40)	
Need for additional therapy				
0 sites	90 days	4 (20.00)	1 (12.20)	0.0306
1-2 sites	90 days	9 (45.00)	6 (36.60)	
≥ 3 sites	90 days	7 (35.00)	14 (51.20)	

Table 1S – Demographic characteristics at baseline

VARIABLE	EXPERIMENTAL GROUPS		INTERGROUP COMPARISONS (Chi-square test) <i>P</i> value
	Test N=20	Control N=21	
Number of subjects	20	21	NS
Age (Mean $\pm$ SD)	48.40 $\pm$ 9.87	47.29 $\pm$ 10.24	NS
Gender (F/M)	13/7	13/8	NS
Number of teeth	23.20 $\pm$ 2.83	24.23 $\pm$ 2.99	NS
Sites with PPD ≤ 3 mm (Mean number $\pm$ SD)	105.15 $\pm$ 17.86	105.22 $\pm$ 24.14	NS
Sites with PPD $\geq 4 \leq 6$ mm (Mean number $\pm$ SD)	28.45 $\pm$ 9.72	33.9 $\pm$ 13.12	NS
Sites with PPD ≥ 7 mm (Mean number $\pm$ SD)	5.60 $\pm$ 3.69	6.00 $\pm$ 5.25	NS

F = Female; M = Male; PPD = probing pocket depth; SD = standard deviation; NS = no significant difference.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Flow chart of the study design.

Figure 2. Profiles of the mean counts ($\times 10^5$) of 40 taxa in subgingival biofilm samples at baseline and at 30 and 90 days post-treatment. The panel at the far right presents the changes in the mean counts of each species between baseline and 90 days post-treatment. The species were ordered according to the microbial complexes described by Socransky et al. (1998). The significance of differences among time points was determined using Friedman test (* $P < 0.05$ at 30 days and # $P < 0.05$ at 90 days) and between groups at 90 days using Mann–Whitney test (& $P < 0.05$). All the analyses were adjusted for multiple comparisons (Socransky et al. 1991).

Figure 3. Cumulative mean proportions of microbial complexes in subgingival biofilm samples taken from subjects at baseline and at 30 and 90 days post treatment. The colors represent different microbial complexes (SOCRANSKY et al. 1998). The light green color represents the proportion of Aa. The gray color represents species that did not fall into any complex, and Actinomyces species are represented in blue. The significance of differences among time points was determined using Friedman and Dunn multiple-comparison tests (different letters represent significant differences between time points, $P < 0.05$). The significance of differences between the 2 groups at 30 days and 90 days was determined by using Mann–Whitney test (* $P < 0.05$ at 30 days and ** $P < 0.05$ at 90 days).

Figure 4. Number of copies/ μ L of *B. lactis* HN019 genome and standard deviations (numbers above the columns) in samples of subgingival biofilm of Test and Control groups at baseline, 30 days and 90 days, as well as intra and inter group comparisons. Different majuscule letters indicate significant differences in each group over experimental time (Friedman test, Dunn, $P < 0.05$). Different minuscule letters indicate inter group differences within the same time point (Mann-Whitney test, $P < 0.05$).

Figure 5. Levels (pg/mL) of IL-8 (A), IL-1 β (B), and IL-10 (C) for each subject of groups Test and Control at baseline and at 30 and 90 days post-treatment. The mean changes in cytokines levels in relation to baseline values for Control and Test groups can be observed in E-G. *Significant difference in Test group when compared with baseline values (Repeated Measures ANOVA, Bonferroni, $P < 0.05$). †Significant difference in Control group when compared with baseline values (Repeated Measures ANOVA, Bonferroni, $P < 0.05$). ‡Significant difference among groups in the same time point (Student t test, $P < 0.05$).

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 5

Anexo 4 - Artigo científico submetido para publicação no periódico *Clinical Oral Investigations*.

Clinical and immunological benefits of probiotic *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 as part of the active phase of periodontal therapy.

Marcos M. Invernici, DDS, Ms¹; Sérgio L. Salvador, Pharm.D, PhD²; Flávia A. C. Furlaneto, DDS, PhD¹; Arthur C. Ouwehand, PhD³; Seppo Salminen, PhD⁴; Anastasia Mantziari, Ms⁴; Gabriel Vinderola, PhD⁵; Edilson Ervolino, DDS, PhD⁶; Luiz F.F Oliveira, DDS, Ms¹; Sérgio L.S. Souza, DDS, PhD¹; Michel R. Messoro, DDS, PhD¹.

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto / SP, Brazil.

²Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto / SP, Brazil.

³Dupont, Nutrition and Health, Sokeritehtaanatie 20, 02460 Kantvik, Finland.

⁴University of Turku, Functional Foods Forum, 20014 University of Turku, Finland.

⁵Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET), National University of the Litoral, Santa Fe, Argentina.

⁶Department of Basic Sciences, Division of Histology, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Michel R. Messoro

Av. Café s/n Ribeirão Preto-SP 14020-150

Telephone number: +55 16 3315 4135 Fax number: +55 16 3315 4788

Email address: m.messoro@forp.usp.br

Running title: Probiotic in the treatment of periodontitis

Keywords: Probiotics; Root Planing; Periodontitis; *Bifidobacterium lactis*

Source of Funding and Conflict of Interest: The study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – process #480982/2013-9) awarded to Michel R. Messoro. E.I. DuPont de Nemours & Co. Danisco Sweeteners Oy (Kantvik, Finland) donated the probiotics. The authors report no conflicts of interest related to this study.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) HN019-containing probiotic lozenges in the active phase of periodontal treatment of patients with generalized chronic periodontitis (GCP).

Materials and Methods: Thirty chronic periodontitis patients were recruited and monitored clinically and immunologically at baseline (before scaling and root planing - SRP) and 30 and 90 days after SRP. Patients were randomly assigned to a Test (Probiotic+SRP, n=15) or Control (Placebo+SRP, n=15) group. The probiotic lozenges were used twice a day for 30 days. The adhesion of *B. lactis* HN019 associated or not with *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells (BEC) and its antimicrobial properties were investigated in *in vitro* assays. The data were statistically analyzed.

Results: The Test group presented a lower plaque index (30 days) and lower marginal gingival bleeding (90 days) when compared to the Control group ($p<0.05$). Higher beta defensin-3 (BD-3) and Toll-like receptor 4 (TLR4) expressions were observed in gingival tissues in the Test group than in the Control group ($p<0.05$). There were no differences in immunoglobulin A levels in the saliva between the groups ($p>0.05$). *B. lactis* HN019 reduced the adhesion of *P. gingivalis* to BEC and showed antimicrobial potential against periodontopathogens.

Conclusion: The use of *B. lactis* HN019 in the active phase of periodontal therapy helps control dental plaque accumulation and gingival inflammation in GCP patients.

Clinical Relevance: *B. lactis* HN019 may be a potential probiotic to improve the effects of non-surgical periodontal therapy.

INTRODUCTION

In periodontal diseases, the first triggering mechanism is dental plaque accumulation as a result of poor oral hygiene [1]. Some studies have suggested that several periodontal pathogens may colonize supragingival biofilm, which can contribute to subgingival recolonization of recently treated sites [2-5]. This finding has led to strict professional plaque control (PPC) as part of the periodontal treatment. Different groups of researchers have suggested that the removal of supragingival plaque every 2 weeks for prolonged periods of time would enhance the clinical and microbiological outcomes of periodontal therapy [6-10]. Maintenance of gingival health after non-surgical periodontal therapy (NSPT) could prevent the increase of gingival crevicular fluid and, consequently, of proteins that act as a source of nutrients for periodontopathogens [1].

One limitation of the PPC protocol is the difficulty in ensuring that patients return to the dental office to have their teeth cleaned once a week for prolonged periods of time. Therefore, a possible alternative for the prevention of gingival inflammation and dental plaque accumulation in the active phase of periodontal therapy is the use of probiotics. This could be useful in activating health-maintaining mechanisms, thus improving health status rather than reducing disease.

Probiotics are defined as “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” [11]. Probiotics might play a possible role in oral health by suppressing and displacing harmful bacteria and indirectly by producing immunomodulatory effects [12].

A number of *in vivo* studies have focused on the role of probiotics in the prevention and treatment of periodontal diseases [13-19]. It has been shown that probiotics are useful in reducing gingival inflammation [13-17] and plaque accumulation [14,15], improving

periodontal health [13,18,19] and reducing proinflammatory cytokines in patients with gingivitis [16].

To be effective against oral infections, probiotic bacteria need to adhere to the oral mucosa and to dental tissues as part of the biofilm and compete with the growth of dental pathogens. Haukioja et al. 2006 demonstrated a trend of *Bifidobacterium* to bind to buccal cells and intestinal mucus [20]. This ability suggests that probiotics might modulate innate and adaptive immune defenses by releasing soluble factors which can trigger signaling cascades in epithelial cells [21,22]. In short, different immune components actively kill, inhibit, and agglutinate microbes [lysozyme, defensins, histatins, immunoglobulin (Ig) A, deprive them of iron (lactoferrin)], prevent their adhesion (IgA, IgG, IgM), or act as opsonins (complement, IgG, IgM) that increase phagocytosis by immune cells [23].

Bifidobacteria occur naturally in the oral cavity [24] and among the predominant anaerobic bacteria within the intestinal lumen. A body of evidence suggests that bifidobacteria play a critical role in maintaining the normal balance of the gut flora [25], and a number of probiotic-induced benefits to general health have been proposed. The possible impact on oral health has been poorly explored.

Kuru et al. (2017) demonstrated that the use of a probiotic yogurt supplemented with *B. animalis* could have a positive effect on plaque accumulation and on gingival inflammation after abstinence from oral hygiene practices [26]. Ricoldi et al. (2017) observed that *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) HN019 increased the expression of anti-inflammatory cytokines and reduced the expression of proinflammatory cytokines in rats with experimental periodontitis [27]. Oliveira et al. (2017) verified greater osteoprotegerin and beta-defensins (BD) expressions in

periodontal tissues of rats with experimental periodontitis treated with *B. lactis* HN019 when compared to untreated rats [28]. However, to the authors' knowledge, no studies have examined the clinical effects and immunomodulatory properties of *Bifidobacterium*-supplemented probiotics in patients with periodontitis.

The aim of this study was to evaluate the effects of *B. lactis* HN019 on clinical periodontal parameters (plaque accumulation and gingival bleeding), on the immunocompetence of gingival tissues [expression of BD-3 and Toll-like receptor 4 (TLR4)], and on immunological properties of saliva (IgA levels) in the active phase of periodontal therapy in GCP patients. Adhesion to buccal epithelial cells and the antimicrobial properties of *B. lactis* HN019 were also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Patient population

Thirty patients were selected from the population referred to the Periodontal Clinic at the School of Dentistry of Ribeirão Preto – University of São Paulo (FORP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil). Patients who fulfilled the inclusion criteria were invited to participate in the study. All eligible patients were thoroughly informed of the nature and potential risks and benefits of their participation in the study and signed an informed consent form. The study protocol was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of FORP-USP (process number: 06278012.1.0000.5419). The research was conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and additional requirements.

Inclusion and exclusion criteria

All patients were diagnosed with GCP according to the current classification of the American Academy of Periodontology [30]. The inclusion criteria were: (1) age over 30 years, (2) 30% or more of the sites with probing pocket depth (PPD) ≥ 4 mm and clinical attachment level (CAL) ≥ 4 mm, (4) presence of bleeding on probing (BOP) and a minimum of five teeth with at least one site with CAL and PPD ≥ 5 mm. All patients had to be in good general health. The exclusion criteria were: (1) cause-related periodontal therapy in the previous 6 months, (2) antimicrobial therapy in the previous 6 months, (3) systemic conditions that could influence the progression of periodontitis or the treatment response (i.e., diabetes mellitus, immunological disorders), (4) pregnancy, (5) smoking, (6) extensive prosthetic appliances, (7) need of prophylactic antibiotic therapy for routine dental procedures, and (8) long-term administration of anti-inflammatory medications.

Experimental design, allocation concealment, and treatment protocol

According to a random numeric table generated by computer software, the study coordinator (M.R.M.) allocated each patient to one of the following groups: Control (Scaling and root planing – SRP + placebo; 15 patients) or Test (SRP + probiotic therapy, 15 patients). Before the study began, the selected individuals were identified by a numeric code that designated the experimental group to which they belonged. The study coordinator (M.R.M.) revealed the meaning of each code only after conducting the statistical analysis of the experimental data.

The patients received lozenges containing 10 mg of probiotic (Test group) or placebo (Control group). In the Test group, the lozenges had 10^9 colony-forming units (CFUs) of *B. lactis* HN019 (HOWARU® Bifido LYO 40 DCU-S, DuPont™ Danisco® Sweeteners Oy, Kantvik, Finland). The same pharmacy prepared identical probiotic and placebo

lozenges (i.e., same aspect, taste, and color). Identical plastic bottles containing the probiotic/placebos were sent to the study coordinator (M.R.M.), who wrote the number code of each patient on each bottle, according to the therapy they were assigned to. The coded bottles were given to the examiner (M.S.M.S.), who distributed them to the patients and did not have any access to information about the content of the lozenges. In addition, the patients were blinded to the content of the lozenges and treatment assignment during the study.

Seven days prior to NSPT, all patients received supragingival plaque control and oral hygiene instructions. Within 24 h, a specialist in periodontics (M.M.I.), who was blinded to the experimental groups, performed supragingival and subgingival SRP on all teeth with periodontal involvement, using hand (Gracey Curettes, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) and ultrasonic instruments. The patients were instructed (immediately after SRP) to take one lozenge twice a day (in the morning and before bedtime) for 30 days. They were also instructed not to take any other probiotic product during the study. The patients received 14 lozenges (placebo or probiotic) per week. At the end of each week, they had to be seen at the FORP-USP Periodontal Clinic. During their visit, they should bring the packs of lozenges taken during the week and then they received new lozenges for the subsequent week. During the visit, the patients answered a questionnaire about their perception of any side effect observed during the consumption of the dietary supplement. One research assistant (P.H.F.S.) conducted these procedures and monitored the patient's compliance with medication dosage. This assistant was not the examiner or operator in this study.

All patients received immunological and clinical monitoring at baseline, at 30 days, and at 90 days. The evaluations (pre- and post-intervention) were conducted by a single trained and calibrated examiner (M.S.M.S.), who was blinded to the experimental groups.

Examiner calibration

The Kappa coefficient was used to evaluate examiner calibration regarding the collection of clinical periodontal parameters for calculation of intra-examiner agreement. Ten patients with gingivitis (with both bleeding and non-bleeding on probing) not included in the study were evaluated by the examiner on two separate occasions 48 h apart. Plaque index (PI), PPD, and BOMP were measured. Calibration was accepted if measurements at baseline and at 48 h were consistent in 90% of the measurements.

Clinical measurements

PI [31] was employed to assess the patients' oral hygiene status. The BOMP value was described 30 s after gently running a periodontal probe into the gingival sulcus. PI and BOMP were scored as absent or present plaque and bleeding (0 or 1, respectively). BOMP and PI were measured at four sites per tooth. PPD was measured from the free gingival margin to the bottom of the periodontal pocket. CAL was measured from the cementoenamel junction to the base of the periodontal pocket. PPD and CAL were measured at six sites per tooth. All probing measurements were performed using a manual periodontal probe (PCPUNC156, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

Analysis of salivary Immunoglobulin A (IgA) levels

At *baseline*, and also at 30 and 90 days after NSPT, unstimulated saliva was collected in the morning, after a fasting period of at least 8 h. The patients were instructed not to move the tongue, cheeks, or lips during saliva collection. Two minutes after the instructions, the patients spat into the spit sink, thus eliminating initial residues. After that, collection began. Three 3-minute cycles were run, during which the patients kept the saliva in the

oral cavity. At the end of that period, the patients' residual saliva was collected into a 50-mL polypropylene Falcon tube (Corning Inc, Corning, NY, USA). The procedure was repeated twice and total collection time was 9 min. The saliva samples were then transferred into two graduated Eppendorf tubes using a handheld micropipette. Each tube with 1 mL of saliva was stored at -80 °C. IgA levels (mg/dL) were measured in a clinical analysis laboratory by way of nephelometry at 1.59 to 41.45 mg/dL.

Gingival biopsies and immunohistochemical analysis

At baseline, and also at 30 days after NSPT, samples of gingival tissues (epithelial and connective tissues) were collected from a healthy site (PPD < 3 mm) and from an infected site (PPD > 5 mm). The gingival biopsies were embedded in paraffin. Serial sections (4 µm) were performed for visualization of the epithelial and connective tissues. The histological sections were deparaffinized in xylol and hydrated in a decreasing ethanol series (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). Antigen retrieval was performed by immersion of the histological slides in Diva Decloaker buffer (Biocare Medical, Inc., Concord, CA, USA), in a pressurized chamber (Decloaking Chamber, Biocare Medical, Inc., Concord, CA, USA) at 95° C for 10 min. The samples were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) 0.1M - pH 7.4 between each immunohistochemical step. The histological sections were immersed in 3% hydrogen peroxide for 1 h and in 1% bovine serum albumin for 12 h to block endogenous peroxidase activity and nonspecific sites, respectively. Histological slides with samples from all experimental groups were categorized into four lots. Each lot was incubated for 24 h using either of the following primary antibodies: anti-BD-3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) or anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Universal LSAB™+ Kit/HRP (Dako North America, Inc., Carpinteria CA, USA) was used in the subsequent stages. The histological sections

were incubated in biotinylated secondary antibody for 2 h and treated with a streptavidin–horseradish peroxidase conjugate for 1 h. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (Liquid DAB+, Dako North America, Inc., Carpinteria CA, USA) was used as chromogen, and the histological sections were counterstained with Harris hematoxylin. As negative control, the specimens were subjected to the procedures described earlier, without primary antibodies.

The histological sections were analyzed semiquantitatively by a researcher who was blinded to the experimental groups. The immunolabeled areas were standardized using 250x magnification in a 400 µm x 600 µm area at the center of the histological section. The long axis of this rectangle was perpendicular to an imaginary line at the interface between the epithelial and connective tissues. The rectangle was positioned in such a way that its upper half contained predominantly epithelial tissue, whereas its lower half contained predominantly connective tissue. Immunolabeling was defined as a brownish precipitate in cells and/or in the extracellular matrix captured by a digital camera coupled to a light microscope and later saved in a computer file. Immunolabeling scores were used as follows: 0 – no immunolabeling (no immunoreactivity at all in the area); score 1 – extremely low immunoreactivity (around 1/5 of the area was immunoreactive); score 2 – low immunoreactivity (around 2/5 of the area were immunoreactive); score 3 – moderate immunoreactivity (around 3/5 of the area were immunoreactive); score 4 – high immunoreactivity (around 4/5 of the area were immunoreactive); score 5 – extremely high immunoreactivity (almost the whole area was immunoreactive).

In vitro assay of the adhesion of *B. lactis* HN019 and *Porphyromonas gingivalis* to buccal epithelial cells (BEC)

The assay followed [20], with some slight modifications as follows: BEC were collected from one healthy male volunteer. Cells were washed and suspended in buffered KCl to obtain an optical density (OD)₆₀₀ of 0.500. Bacterial suspensions were made from overnight cultures in buffered KCl to obtain an OD₆₀₀ of 0.1 [= 2×10^7 colony forming units (CFU)/mL]. Equal amounts of BEC and bacterial suspensions were incubated for 60 min. Control cells were treated with buffer only. After washing, the cells with adherent bacteria were stained with crystal violet and safranin solutions. All bacteria (indigenous bacteria, *B. lactis* HN019, and *P. gingivalis* - ATCC 33277) adhered to BEC were counted under a light microscope. Thirty cells were counted from each sample. All bacterial strains were tested in parallel and the experiments were repeated twice.

In vitro analysis of the antimicrobial activity of B. lactis HN019

The *in vitro* antimicrobial activity of *B. lactis* HN019 was assessed against the following periodontopathogens using the agar diffusion method, as described by Zhu et al. [32]: *P. gingivalis* (W83), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 33393). For that purpose, 200-μL aliquots (10^9 CFU/mL) of *B. lactis* HN019, previously grown on MRSA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), were inoculated into 15-mm wells in Tryptic soy agar - TSA (Difco), supplemented with 5 μg/mL of hemin, 1 μg/mL of menadione, and 5% of defibrinated sheep blood, previously seeded (1.5×10^8 CFU/mL) with indicator microorganisms. After pre-incubation for 30 min at room temperature, TSA plates were incubated at 37° C for 72 h, respectively, under anaerobic (BD GasPak™ EZ container systems, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, and *F. nucleatum*) and microaerophilic (*A. actinomycetemcomitans*)

conditions. Thereafter, the diameter (mm) of inhibition halos was measured using a digital caliper. Each indicator strain was tested three times in duplicate.

The means and standard deviations of the zones of inhibition observed in the sensitivity of different periodontopathogens to *B. lactis* HN019 were calculated.

Outcome variables

Changes in the mean BOMP at 90 days post-SRP were defined as the primary outcome variable. All other parameters were regarded as secondary variables.

Statistical analysis

Each variable was computed per participant and then averaged across patients in both groups. The significance level was set at 5%.

The within-group and between-group differences for i) number of sites with different PPD; ii) PI; iii) BOMP; and iv) IgA levels were assessed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc* test and by Student's t test, respectively.

The within-group and between-group differences for sites with PPD ≥ 5 mm (at baseline) that obtained a PPD reduction and CAL gain ≥ 2 mm at 30 and 90 days were assessed by Student's t test.

The medians, interquartile range, and maximum and minimum values of the scores were calculated for the analysis of immunohistochemical data on BD-3 and TLR4 immunolabeling, at baseline and at 30 days for each experimental group, considering healthy and unhealthy sites separately. Significant differences between the groups were determined by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* test.

The between-group and within-group differences for adhesion of the strains to BEC were evaluated by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* test.

RESULTS

This study started in December 2015 and ended in August 2016. Figure 1 shows the study design. All subjects successfully completed the study (Figure 1). The sample was comprised of 15 patients in the control group with mean age $\pm$ standard deviation (SD) of 47.67 ± 9.49 years and 15 patients in the test group with mean age $\pm$ SD of 47.60 ± 9.97 years. The Test group presented 10 female and 5 male. The control group presented 7 female and 8 male. The means of teeth in the mouth $\pm$ SD were 22.86 ± 2.85 and 24.53 ± 2.97 respectively in the groups Test and Control, respectively. There were no statistically significant differences between these variables. Postoperative healing was uneventful in all cases. No adverse effects of probiotic therapy were observed.

Clinical monitoring

Mean number and mean percentage of sites with different PPD at baseline, at 30 days, and at 90 days are presented in Table 1. The Test group had the smallest number of sites with $PPD \geq 8$ mm at 90 days when compared to the Control group ($p < 0.05$). Only the Test group showed a reduction in the number of sites with $PPD \geq 8$ mm compared to baseline at 90 days ($p < 0.05$).

Table 2 presents the mean percentage of sites with $PPD \geq 5$ mm (at baseline) that obtained a PPD reduction and CAL gain ≥ 2 mm at 30 and 90 days after therapy. The Test group showed a larger percentage of sites with PPD reduction and CAL gain when compared with the control group at 90 days ($p = 0.0045$).

Table 3 shows the mean percentage rates for BOMP and PI. The Test group had a lower

BOMP at 90 days and lower PI at 30 days when compared to the Control group ($p<0.05$).

Analysis of salivary IgA levels

IgA levels are shown in Figure 2A. No significant changes were observed in IgA levels at 30 and 90 days, compared to baseline, for the Test and Control groups ($p>0.05$). Figure 2B shows the mean IgA ratios at 30 and 90 days. There were no significant differences between the Test and Control groups at 30 and 90 days ($p>0.05$).

Gingival biopsies and immunohistochemical analysis

The median scores of the healthy and infected sites in the Control and Test groups before and after probiotic therapy are shown in Figure 3.

The immunohistochemical technique was highly specific for the detection of BD-3 (Fig. 4, A-H) and TLR4 (Fig. 5, A-H). No immunoreactivity was observed in the negative controls of immunohistochemical reactions. Immunoreactive cells were dark brown and circumscribed to the cytoplasm and, to a lesser extent, to the extracellular matrix. Immunolabeling of BD-3 was predominantly present in keratinocytes of the epithelial tissue and in fibroblasts of the connective tissue. Immunolabeling of TLR4 was predominantly present in cells of the connective tissue.

Only the healthy sites of patients treated with probiotics exhibited significantly higher BD-3 and TLR4 immunoreactivity (Figs. 4 and 5) at 30 days when compared to baseline ($p<0.05$). At infected sites, there was a significantly higher BD-3 and TLR4 immunoreactivity in both groups at 30 days when compared to baseline ($p<0.05$). The Test group exhibited significantly higher BD-3 and TLR4 expressions on infected sites at 30 days when compared to the Control group ($p<0.05$).

*In vitro assay of the adhesion of *B. lactis* HN019 and *P. gingivalis* to BEC*

Approximately 13 indigenous bacteria/cells were attached to washed and untreated BEC. Table 4 shows the mean adhesion of *B. lactis* HN019 and *P. gingivalis* to BEC alone and combined. There was a lower mean adhesion of *P. gingivalis* combined with *B. lactis* HN019 when compared to the mean adhesion of *P. gingivalis* alone ($p < 0.05$).

In vitro analysis of *B. lactis* HN019 antimicrobial activity

The means and standard deviations (mm) of the zones of inhibition obtained for the sensitivity of different periodontopathogens to *B. lactis* HN019 are displayed in Figure 6. The probiotic strain inhibited the growth of all periodontopathogens assessed.

DISCUSSION

This double-blind randomized controlled trial assessed the effects of *B. lactis* HN019 during the active phase of periodontal therapy in individuals with GCP. The findings demonstrate that probiotic therapy improved plaque control, reduced BOMP, and increased BD-3 and TLR4 expressions in periodontal tissues. *B. lactis* HN019 also inhibited the growth of periodontopathogens in *in vitro* tests and reduced the adhesion of *P. gingivalis* to BEC.

In the present study, the Test group had lower PI than the Control group at 30 days. Some previous studies revealed that *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* could quantitatively influence oral biofilm formation [26, 33]. Some probiotic strains may form biofilm on hard and soft tissues, preventing the adhesion of pathogenic bacteria, and they may also change the protein composition of the acquired salivary pellicle by binding and/or degradation of salivary proteins [20].

Bacterial coaggregation mechanisms are also likely to affect the quantity and quality of oral biofilm. The probiotic strain used in the present study can perfectly adhere to

subgingival biofilms containing *P. gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, and *F. nucleatum* [34] and can coaggregate with *F. nucleatum* [20]. The latter act as an actual “biological bridge” in oral biofilm formation, as they adhere to virtually all oral bacteria [20]. The possible coaggregation of *B. lactis* HN019 with *F. nucleatum* may have reduced the number of binding sites for other bacteria, affecting the quality and quantity of biofilm in patients from the Test group in the present study. Moreover, *B. lactis* HN019 may have directly inhibited the growth of different periodontopathogens. Previous *in vitro* studies demonstrated that *Bifidobacterium* could inhibit the growth of periodontopathogens [32, 34]. In the present study, *B. lactis* HN019 showed antimicrobial potential against *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, and *A. actinomycetemcomitans* in *in vitro* sensitivity tests.

Probiotic therapy, even when administered for a short time period, seems to promote remarkable resilience of the oral microbiome to risk factors for periodontitis, such as bacterial plaque accumulation [35]. Notwithstanding a PI similar to that of the Control group at 90 days, the Test group had a lower BOMP, which indicates a possible delayed effect of probiotic therapy on gingival inflammation. Lee et al. (2015) showed that *Lactobacillus brevis* lozenges significantly delayed the onset of gingival inflammation in healthy individuals who refrained from oral hygiene [36].

The lower gingival inflammation observed in patients from the Test group in the present study can be explained in two ways. The first one is related to the possible competition between probiotic bacteria and periodontopathogens for binding sites. Mendi et al. (2016) conducted an *in vitro* study and demonstrated that *Lactobacillus rhamnosus* can adhere to mesenchymal stem cells in the gingiva, possibly protecting them from being colonized by *P. gingivalis* [37]. In the *in vitro* studies performed in this study, *B. lactis* HN019 was able to adhere to BEC and could reduce the adhesion of *P. gingivalis* to these cells. This

is the first study to assess the potential adhesion of *B. lactis* HN019 to BEC. The mean adhesion observed in the present study was similar to the one found by Haukioja et al. (2016) for *Lactobacillus rhamnosus* GG in BEC. The second explanation could be related to the possible interference of probiotic bacteria in the expression of markers involved in regulating the immunocompetence of the epithelial barrier. The gingival biopsies of infected sites showed an increase in BD-3 expression in the Test group. A previous study showed that *B. lactis* HN019 also increased BD-3 expression in periodontal tissues and reduced periodontal inflammation in rats with experimental periodontitis [28]. BD are antimicrobial peptides that play an important role in epithelial innate immunity and their differential expressions are associated with periodontal diseases [39]. Among BDs, BD-3 are differentially induced by infectious or inflammatory stimuli [39-41]. Some studies [42-44] demonstrated that inflamed periodontal sites have lower BD-3 levels than do healthy sites. In the present study, the Test group also exhibited higher TLR4 expression than the Control group. TLR4 is a recognition receptor that plays a crucial role in the host's innate response, as it helps identify lipopolysaccharides (LPS) of gram-negative bacteria [45]. The administration of *Lactobacillus casei* CRL 431 in healthy mice increased the number of TLR4-positive cells when compared to animals that were not treated with the probiotic. This finding, according to the authors, could indicate some improvement in physiological surveillance mechanisms against pathogenic bacteria [46].

IgA is an important defense factor found in the saliva and it influences the oral microbiota, interfering with bacterial adhesion and metabolism [47]. The probiotic therapy used in the present study did not change IgA levels in the saliva. Studies on immunoregulatory effects of probiotic bacteria involving IgA have shown contradictory and inconclusive outcomes [48]. While several studies showed that probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus* [49-53] did not increase IgA levels, other studies revealed high IgA

concentrations [54-58] in patients treated with probiotic strains of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, or *Enterococcus*. There could be many reasons for the conflicting findings, such as heterogeneous research models, type of saliva, and analytical methodology [48]. Furthermore, the assessed saliva might not fully indicate the composition of salivary glands.

B. lactis HN019 may be a potential probiotic for the treatment of patients with chronic periodontitis. Lower IP and BOMP, as well as higher BD-3 and TLR4 expressions detected in the Test group of this study allowed larger PPD reduction and clinical attachment gain at 90 days after surgery. Studies have clearly shown that the presence of residual pockets after treatment, especially those with PPD ≥ 5 mm, represent incomplete treatment and are important risk indicators for recurrence of periodontal disease in patients subjected to long-term periodontal maintenance [59].

The short period of assessment and the lack of microbiological analyses of the subgingival biofilm were limitations of this study. A long-term follow-up of the patients would be important to evaluate whether the additional effects obtained with probiotic therapy during the active phase of periodontal therapy will be sustained over time. The use of new DNA sequencing technologies would be useful for investigating the effects of *B. lactis* HN019 on subgingival biofilm and on the oral microbiome. It is also important that future investigations evaluate new modes of administration of *B. lactis* HN019 and other therapeutic regimens for the treatment of periodontal patients. The effect of *B. lactis* HN019 on patients with gingivitis should be investigated as well.

CONCLUSION

In conclusion, the use of *B. lactis* HN019 in the active phase of periodontal therapy helps control bacterial plaque accumulation and gingival inflammation in GCP patients.

REFERENCES

1. Marsh PD (2003) Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149 (Pt 2):279-294. doi:10.1099/mic.0.26082-0
2. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS (2000) The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *Journal of clinical periodontology* 27 (9):637-647
3. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M (2008) Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clinical oral implants research* 19 (10):975-982. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x
4. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X (2008) Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral microbiology and immunology* 23 (3):196-205. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x
5. Sanz-Sanchez I, Ortiz-Vigon A, Herrera D, Sanz M (2016) Microbiological effects and recolonization patterns after adjunctive subgingival debridement with Er:YAG laser. *Clinical oral investigations* 20 (6):1253-1261. doi:10.1007/s00784-015-1617-y
6. Nyman S, Rosling B, Lindhe J (1975) Effect of professional tooth cleaning on healing after periodontal surgery. *Journal of clinical periodontology* 2 (2):80-86
7. Rosling B, Nyman S, Lindhe J (1976) The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. *Journal of clinical periodontology* 3 (1):38-53
8. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L, Bratthall G (1982) Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. A clinical study. *Journal of clinical periodontology* 9 (2):115-128
9. Westfelt E, Nyman S, Socransky S, Lindhe J (1983) Significance of frequency of professional tooth cleaning for healing following periodontal surgery. *Journal of clinical periodontology* 10 (2):148-156
10. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B (1984) Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *Journal of clinical periodontology* 11 (3):193-207
11. FAO/WHO J (2002) Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London. Ontario, Canada
12. de Vrese M, Schrezenmeir J (2008) Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 111:1-66. doi:10.1007/10_2008_097
13. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC (2013) Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of clinical periodontology* 40 (11):1025-1035. doi:10.1111/jcpe.12155

14. Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G (2006) Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swedish dental journal* 30 (2):55-60
15. Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trinchieri V, Amicosante G, Cifone MG (2007) Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral diseases* 13 (4):376-385. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x
16. Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksen-Blicks C (2009) Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta odontologica Scandinavica* 67 (1):19-24. doi:10.1080/00016350802516170
17. Stensson M, Koch G, Coric S, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Birkhed D, Wendt LK (2014) Oral administration of *Lactobacillus reuteri* during the first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age. *Caries research* 48 (2):111-117. doi:10.1159/000354412
18. Tekce M, Ince G, Gursoy H, Dirikan Ipci S, Cakar G, Kadir T, Yilmaz S (2015) Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *Journal of clinical periodontology* 42 (4):363-372. doi:10.1111/jcpe.12387
19. Ince G, Gursoy H, Ipci SD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yilmaz S (2015) Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *Journal of periodontology* 86 (6):746-754. doi:10.1902/jop.2015.140612
20. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, Tenovuo J (2006) Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral microbiology and immunology* 21 (5):326-332. doi:10.1111/j.1399-302X.2006.00299.x
21. Corthesy B, Gaskins HR, Mercenier A (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *The Journal of nutrition* 137 (3 Suppl 2):781S-790S
22. Menard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2004) Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 53 (6):821-828
23. Wilson M (2005) *Microbial inhabitants of humans: their ecology and role in health and disease*. Cambridge University Press,
24. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL (2002) Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of clinical microbiology* 40 (3):1001-1009
25. Fuller R, Gibson GR (1997) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement* 222:28-31. doi:10.1080/00365521.1997.11720714
26. Kuru BE, Laleman I, Yalnizoglu T, Kuru L, Teughels W (2017) The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled

Clinical Trial. Journal of periodontology 88 (11):1115-1123. doi:10.1902/jop.2017.170213

27. Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, Ervolino E, de Oliveira MN, Bogsan CSB, Salvador SL, Messoria MR (2017) Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. PloS one 12 (6):e0179946. doi:10.1371/journal.pone.0179946

28. Oliveira LF, Salvador SL, Silva PH, Furlaneto FA, Figueiredo L, Casarin R, Ervolino E, Palioto DB, Souza SL, Taba M, Jr., Novaes AB, Jr., Messoria MR (2017) Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. Journal of periodontology 88 (2):197-208. doi:10.1902/jop.2016.160217

29. Slawik S, Staufenbiel I, Schilke R, Nicksch S, Weinspach K, Stiesch M, Eberhard J (2011) Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. European journal of clinical nutrition 65 (7):857-863. doi:10.1038/ejcn.2011.45

30. Armitage GC (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Annals of periodontology 4 (1):1-6. doi:10.1902/annals.1999.4.1.1

31. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE (1972) The plaque control record. Journal of periodontology 43 (1):38. doi:10.1902/jop.1972.43.1.38

32. Zhu Y, Xiao L, Shen D, Hao Y (2010) Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. Acta odontologica Scandinavica 68 (5):261-268. doi:10.3109/00016357.2010.492235

33. Penala S, Kalakonda B, Pathakota KR, Jayakumar A, Koppolu P, Lakshmi BV, Pandey R, Mishra A (2016) Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: A randomized controlled trial. Journal of research in pharmacy practice 5 (2):86-93. doi:10.4103/2279-042X.179568

34. Jasberg H, Soderling E, Endo A, Beighton D, Haukioja A (2016) *Bifidobacteria* inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. European journal of oral sciences 124 (3):251-258. doi:10.1111/eos.12266

35. Rosier BT, Marsh PD, Mira A (2017) Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. Journal of dental research:22034517742139. doi:10.1177/0022034517742139

36. Lee JK, Kim SJ, Ko SH, Ouwehand AC, Ma DS (2015) Modulation of the host response by probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 in experimental gingivitis. Oral diseases 21 (6):705-712. doi:10.1111/odi.12332

37. Mendi A, Kose S, Uckan D, Akca G, Yilmaz D, Aral L, Gultekin SE, Eroglu T, Kilic E, Uckan S (2016) *Lactobacillus rhamnosus* could inhibit *Porphyromonas gingivalis* derived CXCL8 attenuation. Journal of applied oral science : revista FOB 24 (1):67-75. doi:10.1590/1678-775720150145

38. Wang P, Duan D, Zhou X, Li X, Yang J, Deng M, Xu Y (2015) Relationship between expression of human gingival beta-defensins and levels of periodontopathogens in subgingival plaque. *Journal of periodontal research* 50 (1):113-122. doi:10.1111/jre.12187
39. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA (2000) 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. *Infection and immunity* 68 (5):2907-2915
40. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *The Journal of biological chemistry* 276 (8):5707-5713. doi:10.1074/jbc.M008557200
41. Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB, Jr. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 263 (1-2):211-218
42. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H (2007) Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *Journal of periodontal research* 42 (5):429-437. doi:10.1111/j.1600-0765.2006.00964.x
43. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB, Jr., Guthmiller JM (2004) Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 33 (5):278-285. doi:10.1111/j.0904-2512.2004.00143.x
44. Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, Romanos GE, Sorsa T (2008) Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Archives of oral biology* 53 (2):175-186. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.09.010
45. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388 (6640):394-397. doi:10.1038/41131
46. Castillo NA, Perdigon G, de Moreno de Leblanc A (2011) Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC microbiology* 11:177. doi:10.1186/1471-2180-11-177
47. Patil PB, Patil BR (2011) Saliva: A diagnostic biomarker of periodontal diseases. *Journal of Indian Society of Periodontology* 15 (4):310
48. Jorgensen MR, Keller MK, Kragelund C, Hamberg K, Ericson D, Nielsen CH, Twetman S (2016) *Lactobacillus reuteri* supplements do not affect salivary IgA or cytokine levels in healthy subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Acta odontologica Scandinavica* 74 (5):399-404. doi:10.3109/00016357.2016.1169439

49. Paineau D, Carcano D, Leyer G, Darquy S, Alyanakian MA, Simoneau G, Bergmann JF, Brassart D, Bornet F, Ouwehand AC (2008) Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *FEMS immunology and medical microbiology* 53 (1):107-113. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00413.x
50. Gleeson M, Bishop NC, Oliveira M, McCauley T, Tauler P, Lawrence C (2012) Effects of a *Lactobacillus salivarius* probiotic intervention on infection, cold symptom duration and severity, and mucosal immunity in endurance athletes. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 22 (4):235-242
51. Kekkonen RA, Lummela N, Karjalainen H, Latvala S, Tynkkynen S, Jarvenpaa S, Kautiainen H, Julkunen I, Vapaatalo H, Korpela R (2008) Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World journal of gastroenterology* 14 (13):2029-2036
52. Tiollier E, Chennaoui M, Gomez-Merino D, Drogou C, Filaire E, Guezennec CY (2007) Effect of a probiotics supplementation on respiratory infections and immune and hormonal parameters during intense military training. *Military medicine* 172 (9):1006-1011
53. Dong H, Rowland I, Thomas LV, Yaqoob P (2013) Immunomodulatory effects of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* Shirota in healthy older volunteers. *European journal of nutrition* 52 (8):1853-1863. doi:10.1007/s00394-012-0487-1
54. Surono IS, Koestomo FP, Novitasari N, Zakaria FR, Yulianasari, Koesnandar (2011) Novel probiotic *Enterococcus faecium* IS-27526 supplementation increased total salivary sIgA level and bodyweight of pre-school children: a pilot study. *Anaerobe* 17 (6):496-500. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.06.003
55. Rizzardini G, Eskesen D, Calder PC, Capetti A, Jespersen L, Clerici M (2012) Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12(R) and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. *casei* 431(R) in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The British journal of nutrition* 107 (6):876-884. doi:10.1017/S000711451100420X
56. Shimizu K, Sato H, Suga Y, Yamahira S, Toba M, Hamuro K, Kakumoto K, Kohda N, Akama T, Kono I, Kuno S (2014) The effects of *Lactobacillus pentosus* strain b240 and appropriate physical training on salivary secretory IgA levels in elderly adults with low physical fitness: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 54 (1):61-66. doi:10.3164/jcbrn.13-62
57. Kotani Y, Shinkai S, Okamatsu H, Toba M, Ogawa K, Yoshida H, Fukaya T, Fujiwara Y, Chaves PH, Kakumoto K, Kohda N (2010) Oral intake of *Lactobacillus pentosus* strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Immunity & ageing : I & A* 7:11. doi:10.1186/1742-4933-7-11
58. Asama T, Arima TH, Gomi T, Keishi T, Tani H, Kimura Y, Tatefuji T, Hashimoto K (2015) *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of applied microbiology* 119 (3):818-826. doi:10.1111/jam.12889

59. Lang NP, Tonetti MS (2003) Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). Oral health & preventive dentistry 1 (1):7-16

Table 1 - Mean number (mean percentage) $\pm$ SD of sites with PPD $\geq$ 5 mm, PPD $\geq$ 6 mm, PPD $\geq$ 7 mm and PPD $\geq$ 8 mm at baseline, 30 and 90 days.

PPD category (mm)	Treatment Groups / Time Points					
	Test Group			Control Group		
	Baseline	30 days	90 days	Baseline	30 days	90 days
PPD $\geq$ 5	15.60 $\pm$ 1.58 (11.23 $\pm$ 1.09)	6.40 $\pm$ 1.44* (4.45 $\pm$ 0.89)	5.30 $\pm$ 1.41* (3.65 $\pm$ 0.89)	18.14 $\pm$ 2.87 (12.49 $\pm$ 2.10)	8.66 $\pm$ 1.93* (5.95 $\pm$ 1.41)	10.90 $\pm$ 2.33* (7.50 $\pm$ 1.72)
PPD $\geq$ 6	9.05 $\pm$ 1.12 (6.42 $\pm$ 0.74)	3.05 $\pm$ 1.00* (2.07 $\pm$ 0.63)	2.35 $\pm$ 0.94* (1.57 $\pm$ 0.60)	9.66 $\pm$ 1.80 (6.57 $\pm$ 1.28)	4.57 $\pm$ 1.29* (3.12 $\pm$ 0.93)	4.81 $\pm$ 1.39* (3.26 $\pm$ 1.00)
PPD $\geq$ 7	5.60 $\pm$ 0.82 (4.09 $\pm$ 0.61)	1.25 $\pm$ 0.50* (0.85 $\pm$ 0.33)	1.25 $\pm$ 0.54* (0.85 $\pm$ 0.36)	6.00 $\pm$ 1.16 (4.12 $\pm$ 0.85)	1.90 $\pm$ 0.74* (1.31 $\pm$ 0.53)	2.90 $\pm$ 0.90* (1.98 $\pm$ 0.66)
PPD $\geq$ 8	1.35 $\pm$ 0.39 (0.95 $\pm$ 0.26)	0.45 $\pm$ 0.22 (0.31 $\pm$ 0.15)	0.30 $\pm$ 0.20* ^b (0.19 $\pm$ 0.13)	1.81 $\pm$ 0.60 (1.26 $\pm$ 0.47)	0.66 $\pm$ 0.43 (0.48 $\pm$ 0.31)	0.76 $\pm$ 0.26 ^a (0.51 $\pm$ 0.19)

PPD = probing pocket depth; SD = standard deviation; Different letters represent significant differences between treatment groups at same time point (Student's t test, $p < 0.05$); *Significant difference when compared to baseline (repeated measures ANOVA, Bonferroni *post hoc* test, $p < 0.05$).

Table 2 - Mean % ($\pm$ SD) of sites with PPD $\geq$ 5 mm at baseline that obtained a PPD reduction and CAL gain $\geq$ 2 mm at 30 and 90 days post-therapy.

Variable	Time point	Treatment groups		Integroup Comparison Student's t test <i>p</i> value
		Test	Control	
PPD reduction and CAL gain $\geq$ 2 mm	30 days	63.33 $\pm$ 4.50	58.25 $\pm$ 5.70	0.4909
	90 days	68.81 $\pm$ 4.95	47.49 $\pm$ 5.03	0.0045

PPD = probing pocket depth; CAL = clinical attachment level; SD = standard deviation.

Table 3 - Mean % ($\pm$ SD) of BOMP and PI at baseline, 30 days and 90 days.

Variables	Time point	Treatment groups		Intergroup Comparison Student's t test <i>p</i> value
		Test	Control	
BOMP	Baseline	9.17 $\pm$ 7.71 ^a	14.07 $\pm$ 7.99 ^a	<i>p</i> >0.05
	30 days	4.85 $\pm$ 5.2 ^b	9.38 $\pm$ 8.67 ^b	<i>p</i> >0.05
	90 days	5.92 $\pm$ 6.12 ^{ab}	12.10 $\pm$ 8.19 ^{ab}	<i>p</i>≤0.05
PI	Baseline	18.71 $\pm$ 12.14 ^a	22.50 $\pm$ 8.54 ^a	<i>p</i> >0.05
	30 days	9.58 $\pm$ 5.75 ^b	15.33 $\pm$ 9.47 ^b	<i>p</i>≤0.05
	90 days	18.27 $\pm$ 17.11 ^{ac}	22.66 $\pm$ 9.99 ^{ac}	<i>p</i> >0.05

BOMP = bleeding on marginal probing; PI = plaque index; SD = standard deviation; Different letters represent significant differences intragroups (repeated measures ANOVA, Bonferroni *post hoc* test, *p*<0.05).

Table 4 - Adhesion of *B. lactis* HN019 and *P. gingivalis* to buccal epithelial cells. Mean $\pm$ standard deviation of the bacteria counts.

Strains - Group	Mean $\pm$ SD
<i>B. lactis</i> HN019 alone	16.57 $\pm$ 16.21 ^a
<i>P. gingivalis</i> alone	7.21 $\pm$ 3.88 ^a
<i>B. lactis</i> HN019 with <i>P. gingivalis</i>	6.00 $\pm$ 12.66 ^b
<i>P. gingivalis</i> with <i>B. lactis</i> HN019	4.63 $\pm$ 6.48 ^{bc}

Different letters represent significant differences between groups (Kruskal-Wallis, Dunn's *post hoc* test, $p < 0.05$).

Binding to buccal epithelial cells = bacteria/cell – bacteria/cell in control (indigenous bacteria)

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Flowchart of the clinical trial.

Figure 2. IgA levels (A) of Test and Control groups at baseline and at 30 and 90 postoperative days. Mean changes in IgA levels relative to baseline values obtained for the Test and Control groups are shown in (B).

Figure 3. Medians, interquartile range, and minimum and maximum values for BD-3 and TLR4 immunolabeling scores for the Test and Control groups at healthy and infected sites at baseline and at 30 postoperative days, as well as within-group and between-group comparison results.
*Significant difference (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0.05$).

Figure 4. Photomicrographs showing BD-3 immunolabeling in gingival biopsies from healthy (A-D) and infected (E-H) sites in the Test (B, D, F, H) and Control (A, C, E, G) groups. Arrows = BD-3-positive cells; ep = Epithelial tissue; ct = Connective tissue. Scale = 25 μ m. Counterstaining: Hematoxylin.

Figure 5. Photomicrographs showing TLR4 immunolabeling in gingival biopsies (connective tissue) from healthy (A-D) and infected (E-H) sites in the Test (B, D, F, H) and Control (A, C, E, G) groups. Arrows = TLR4-positive cells. Scale = 25 μ m. Counterstaining: Hematoxylin.

Figure 6. Growth inhibition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Fusobacterium nucleatum* (by *Bifidobacterium animalis* subs. *Lactis* HN019 (agar diffusion method. (A) The clear areas around the wells indicate zones of inhibition. (B) Means and standard deviations of the zone of inhibition observed in sensitivity of different periodontopathogens to *B. lactis* HN019.

Figure 1

Figure 2

Figure 4

Figure 5