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

RENATA SILVA CARDOSO DE CAMPOS

**Efeitos da administração de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*
HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos portadores
de artrite reumatoide experimental.**

PG-PERIO
FORP-USP

Ribeirão Preto

2018

RENATA SILVA CARDOSO DE CAMPOS

**Efeitos da administração de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*
HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos portadores
de artrite reumatoide experimental.**

Versão Original

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

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto Messoria

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

de Campos, Renata Silva Cardoso de Campos.

Efeitos da administração de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos portadores de artrite reumatoide experimental. / Renata Silva Cardoso de Campos ; orientadora Flávia Aparecida Chaves Furlaneto Messoria. - Ribeirão Preto, 2018.

159f. : il.

Dissertação (Mestrado)—Universidade de São Paulo, 2018.

1. Periodontite. 2. Artrite Reumatoide. 3. Probióticos. 4. Ratos.

de CAMPOS, R. S. C. Efeitos da administração de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos portadores de artrite reumatoide experimental:

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

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

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

Instituição:_____

Assinatura:_____

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

Instituição:_____

Assinatura:_____

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

Instituição:_____

Assinatura:_____

Dedicatória

DEDICO

A Deus,

“A Ele a glória,

A Ele o louvor,

A Ele o domínio,

Ele é o senhor.”

Inteiramente a ti ó Pai, dedico os meus dias de glória e sofrimento ao decorrer desta jornada. Obrigada por estar sempre ao meu lado mesmo quando eu já não merecia, obrigada por nunca desistir de mim mesmo nos momentos em que já não mantinha esperanças, obrigada pela vossa bondosa e infinita misericórdia, por me amar incondicionalmente, por ter cedido o vosso filho para que eu, pecadora, vivesse.

À minha mãe Simone Ap. Silva Cardoso,

Te dedico esta vitória por todos os dias em que passou em claro para cuidar de mim, por todos os sonhos e planos esquecidos para dar lugar aos meus e por todos os dias que a senhora trabalhou arduamente para garantir a minha educação e toda a extensão dos meus conhecimentos. Obrigada infinitamente por ter me ensinado a ser um Ser Humano decente, por me acolher nos momentos de alegrias e de tristezas com todo o seu amor. E, principalmente por apoiar minhas escolhas. Minha pequena Symon, meu amor e gratidão são infinitos pela senhora e por Deus, o criador de toda nossa trajetória.

À minha irmã Dalila C. S. Cardoso Pelegrine,

Que presente! Quanta bondade o Senhor teve comigo. Mais que uma irmã, uma mãe. Minha linda e amada Dali, que bom ter nascido para viver ao seu lado, para observar como uma pessoa pode ser tão meiga e delicada, mas ao mesmo tempo tão forte e determinada, que bom ser cuidada e mimada por você. Mais uma vez, em mais uma vitória, o meu tripé está firme e sólido para me encorajar a novas “aventuras”. Obrigada por ser uma das melhores partes que existem em mim.

Ao meu eterno companheiro Nelson D. de Campos Neto

Perto de pessoas como você fica fácil enxergar o amor. O caminho de repente ficou mais leve, cheio planos e sonhos. Nessa minha jornada você atuou como ator principal, com toda a sua compreensão, bondade, carinho, preocupação, cuidado e amor. Obrigada por ser luz na minha vida, por acreditar no meu potencial e me motivar a ser melhor a cada dia.

À toda minha **família** e meus **amigos**, que sempre acreditaram e torceram por mim.

.

Agradecimentos

AGRADEÇO

À minha orientadora Prof. Dra. Flávia Ap. Chaves Furlaneto Messoria,

Toda minha gratidão por a senhora ter aceitado-me como orientada, por toda orientação, oportunidades dadas, ajuda, paciência, tempo dedicado e contribuição ao decorrer do meu curso mestrado.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Periodontia **Dr. Arthur Belém Novaes Jr., Dra. Daniela Bazan Palioto Bulle, Dr. Mario Taba Jr., Dr. Michel Reis Messoria e Dr. Sérgio Luis Scombatti de Souza**, agradeço pelos anos de convívio e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo dos cursos de graduação, especialização e mestrado. Ao **Prof. Dr. Arthur** por ter me incentivado a não desistir do mestrado na FORP quando eu não havia sido aprovada em meu primeiro processo seletivo. Ao **Prof. Dr. Sérgio** pela prestatividade no início de meu ingresso no programa. Em especial ao **Prof. Dr. Michel**, meu muito obrigada por ser uma inspiração desde a graduação, pelos exemplos de aulas extremamente bem preparadas, pela forma tranquila de transmitir o conhecimento e organização. Agradeço também por todo auxílio neste trabalho, esclarecimentos às minhas dúvidas, motivação, oportunidades dadas, por nos mostrar infinitas possibilidades de crescer e também por muitas vezes nos ouvir.

À **Profª Dra. Mônica Graziela Corrêa**, obrigada por toda a atenção, disponibilidade, gentileza e auxílio para sanar as minhas múltiplas dúvidas quando tudo era muito novo.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Salvador**, obrigada pelas contribuições para este trabalho, por me receber tão bem no laboratório do senhor e por ser sempre tão agradável conosco.

À **Profa. Dra. Christie Passani Leite**, obrigada por ter me recebido de forma tão gentil, dispondo o laboratório e conhecimentos da senhora em minha função. Meus agradecimentos se estendem a toda equipe do laboratório, em especial ao pós-graduando Richard Spinelli por todo auxílio.

Ao **Prof. Dr. Prof. Dr. Renato Casarin** por todo o auxílio para a realização da análise imunoenzimática.

À **Profa. Dra. Flávia Suaid**, que prazer ter conhecido e convivido com a senhora. Obrigada pelos ensinamentos, pela maneira igual que sempre nos tratou, é totalmente digna de nosso respeito.

À **Profª. Dra. Raquel Barros**, obrigada por toda paciência, pela maneira louvável de ensinar, pelas dicas e toda disponibilidade ao longo da especialização.

À **Profa. Dra. Fernanda C. Panzeri Pires de Souza**, muito obrigada por ter me introduzido à pesquisa científica por meio da oportunidade na iniciação. Obrigada por todo incentivo para o mestrado mesmo quando eu havia escolhido uma área diferente a seguir. Meus agradecimentos se estendem à todos aqueles com quem convivi em meu período de LaBio, que foi um período de muito aprendizado.

Aos meus amigos do mestrado **Átila Nobre, Cristhiam Martinez, Kleber Suzuki, Marília Reis, Pedro Félix, Uislen Cadore e Yasmin Dal'Acqua**. Com vocês passei os dois anos mais desafiadores de minha vida. Com certeza ao lado de vocês foi tudo mais ameno e alegre. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos. Em especial **Kleber, Marília e Uislen**, que foram por muitas vezes os melhores professores clínicos que eu poderia ter, por dividirem o seu conhecimento de forma segura, mais leve e com muita paciência, muito obrigada.

Aos meus meninos, **Átila, Cristhiam e Pedro**, que presente! Amizades que levarei para a vida, quantos momentos únicos vivemos juntos! Momentos de ansiedade, apreensão, tristeza e angustias, mas quantos outros de felicidade uns pelos outros, de alegria, diversão compartilhada e de muita troca de conhecimento. Obrigada por estarem sempre comigo, fazendo meus dias mais leves e alegres.

À minha dupla do mestrado, do início ao fim. Passamos por muitas coisas juntos, muitas descobertas, muitos aprendizados, e sempre juntos. Um estendendo a mão para outro, um vibrando com o acerto do outro. Você e o seu jeito peculiar de ser ganharam meu respeito e carinho. Carrego enorme gratidão e faço votos que você tenha muito sucesso ao longo de sua trajetória, **Átila**.

Ao meu amigo **Cristhiam**, que alegria poder conhecê-lo verdadeiramente. Você é uma ótima pessoa e um ótimo profissional. Obrigada por toda a sua ajuda e preocupação comigo, pelos momentos fitness e por outros nem tanto, pelos momentos mais engraçados que serão lembrados sempre com carinho. Muito obrigada pela sua amizade.

Ao **Pedro Félix**, o meu muito obrigada de todo coração. Em momentos difíceis você sempre tentou me animar, apontar uma solução, tornar tudo menos desesperador com seu jeito motivador. Obrigada por toda a colaboração nessa pesquisa, seu papel foi ímpar. Você foi por diversas vezes o meu maior mestre, aprendi muitas coisas com você. Me orgulho do profissional, pesquisador, mas principalmente do ser humano que você é. O conhecimento não pode admitir mesquinha ou egocentrismo, essa é a maior lição. E outra que você também sempre me ensinou, a vida não cabe no currículo lattes. E, por isso vivemos assim apesar de todas as dificuldades, nos divertindo com pequenas coisas, nos alegrando dia após dia com nossos cafés na farmácia, compartilhando momentos únicos. Deus enviou a sua amizade como presente para mim, tenho toda certeza. Levarei você para vida toda.

À **Marina Barcellos**. Obrigada pelas férias deixadas de lado, pelo esforço dedicado dia após dia para conclusão do experimento, por toda a sua sensibilidade. Um grande prazer tê-la conhecido.

Ao **Luiz Fernando**. Agradeço toda sua contribuição no desenvolvimento desta pesquisa. Sua ajuda foi extremamente importante. Muito obrigada.

Àqueles que me ajudaram em algum momento da pesquisa, seja na eutanásia, ou alimentação dos animais, muito obrigada. Vocês, **Pedro, Marina, Livia, Átila, Cristhiam, Catarina, Kleber, Marquinhos, Luiz, Sérgio Lago, Felipe Torres, Felipe Anderson, Kelly, Gabriela, Nicole, Yasmin, Natasha, Uislen, Gustavo Apolinário, Prof. Michel, amigos italianos (Antonio, Cesare, Madalena e Margherita) e Pati Garanhos** mostraram o valor da generosidade, união e, principalmente que pesquisa é fruto do trabalho em equipe.

Aos meus colegas do doutorado que conviveram comigo ao longo desta trajetória, dividindo experiências e conhecimentos. Muito obrigada, **Barbará Masalskas, Catarina Tahim, Cristine Borges, Felipe Torres, Karine Figueredo, Kelly Villafuerte, Luiz Fernando, Marcos Invernici, Mariana Sales, Natacha Malu e Sérgio Lago**.

À minha **turma da especialização AORP 2016-2017**, gratidão por ter conhecido e convido com pessoas tão boas: Mariana, Marina, Valessa e Laura. Em especial a minha dupla, **Carolina Faccini**, muito obrigada por todos os momentos vividos, desde diversão até desespero. Foi uma jornada gratificante ao lado de vocês.

Às minhas amigas da graduação, **Isabela, Laura, Livia e Mariana**, obrigada por me acompanharem mesmo de longe nessa trajetória e por todo apoio nas vezes em que necessitei. Obrigado pela amizade incrível desde a graduação. Em especial à **Isabela e Livia** que me acompanharam de perto, me ajudaram inúmeras vezes, sempre tão queridas e não desistiram de mim quando eu já não podia dar tanta atenção.

À **Livia Fiorin**, mais que uma amiga, uma irmã. Um ser humano único, que até mesmo após 7 anos de convívio ainda continua me surpreendendo para o bem. Meu muito obrigada de coração, pelos anos de amizade, inúmeros momentos e crescimento juntas, por tudo que você tem feito por mim principalmente nesses últimos tempos, sua dedicação pelo meu bem-estar é comovente. Deus designa propósitos na nossa vida, tenho certeza que você foi um dos designados por Ele na minha.

À minha querida amiga **Pamela Brumatti**. Obrigada pelos anos de amizade, pela força nos momentos difíceis e por não desistir de mim em todos os momentos em que precisei me ausentar.

À técnica **Marina Del Arco**, muito obrigada por toda sua dedicação, disponibilidade, profissionalismo e ajuda nos momentos em que precisei. E principalmente, obrigada por ter me proporcionado sempre momentos agradáveis ao lado de sua companhia.

À técnica **Milla Ricoldi**, muito obrigada por todos os momentos compartilhados, por toda a sua ajuda no decorrer do desenvolvimento deste trabalho. Sua participação foi essencial.

Ao técnico **Dimitrius**, por toda sua ajuda na execução de análises e esclarecimento de dúvidas. Muito obrigada.

Ao técnico **Emerson Santos**, muito obrigada por sua colaboração e empenho para realização da avaliação microbiológica.

Aos técnicos de laboratório **Fábiola Singaretti, Roger Fernandes, Luis Gustavo e Paulinho** por dividirem seus conhecimentos comigo. Em especial a **Adriana Luisa** por me ajudar com as análises microtomográficas, operação dos equipamentos do LAB3DBIO.

Aos funcionários do Biotério I da FORP-USP, **Aline, Massaro, Marmita e Rafael**, muito obrigada por todo auxílio durante o desenvolvimento do experimento. Todos vocês foram extremamente importantes.

Às secretárias **Aparecida Dulce de Oliveira Negreti, Carla Daniela Lima da Silva** e em especial para **Maria Izabel Simonetti**, muito obrigada por toda ajuda, disponibilidade em nos orientar com documentações e deveres, mas principalmente, pelo carinho e respeito de sempre.

Às funcionárias da clínica de pós-graduação, **Joaninha, Renatinha** e em especial à nossa tão querida e competente **Dani**, muito obrigada por todo carinho e ajuda, e também a **Dra. Rose** que entrou para o nosso time e tanto tem nos ensinado e auxiliado.

À **Nara**, meu agradecimento por ter sido tão solícita e querida quando eu necessitei de seu auxílio.

Aos meus **pacientes**, obrigada por me proporcionarem tanto aprendizado. Por terem sido pacientes e compreensivos nos momentos de execução do meu experimento e de avaliações, nos quais necessitei me ausentar do atendimento clínico durante alguns períodos.

Aos **alunos de graduação**, obrigada pela convivência e por me ajudarem a consolidar a escolha pela docência. Aos **funcionários** da FORP pelo carinho, disponibilidade e respeito.

À minha casa nesses últimos 7 anos, **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo**, minha eterna gratidão. Eu entrei uma menina deslumbrada com a realização do sonho de ingressar no curso de Odontologia. Hoje, eu saio uma profissional e um ser humano com novos sonhos, e com vontade continuar aprendendo e ser melhor a cada dia... Momentos indescritíveis foram vividos nestelugar, que certamente impactaram minha vida para sempre. Instituição de conhecimento, sonhos e sorrisos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

Epígrafe

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível."

(Charles Chaplin)

Resumo

RESUMO

De CAMPOS, R. S. C. **Efeitos da administração de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos portadores de artrite reumatoide experimental.** 2018. 159f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (HN019) na periodontite (PE) induzida por ligadura em ratos com artrite reumatoide (AR) experimental. Foram utilizados 28 ratos, divididos em 4 grupos (n=7): AR (controle), AR/PROB (probiótico), AR/PE (periodontite experimental) e AR/PE/PROB. A partir do dia 0, HN019 foi adicionado diariamente à água dos animais dos grupos PROB, na concentração de $1,5 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia por mililitro, até o final do experimento. No dia 7, AR foi induzida por injeções subcutâneas de colágeno bovino tipo II (CII) emulsionado em Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) em múltiplos locais na base da cauda dos animais. No dia 14, foi realizada uma dose de reforço de CII com IFA. No dia 21, aplicações locais de Adjuvante Completo de Freund foram realizadas na superfície plantar das patas traseiras direitas e intra-articularmente nos joelhos direitos dos animais. No dia 28, nos grupos PE, foram posicionadas ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores, as quais permaneceram em posição durante 11 dias. Os animais foram submetidos à eutanásia no 39º dia. Foram realizadas análises microtomográficas, histomorfométrica, imunoenzimáticas (anticorpo anti-proteína citrulinada, TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10) e microbiológica. Os dados foram estatisticamente analisados ($p < 0,05$). O grupo AR/PE/PROB apresentou perda óssea alveolar reduzida quando comparado com o grupo AR/PE. Não houve diferença significativa em relação ao nível de inserção conjuntiva quando os animais com PE tratados e não tratados com PROB foram comparados. Os animais do grupo AR/PROB apresentaram níveis de anticorpo anti-proteína citrulinada diminuídos quando comparados com os animais dos grupos AR e AR/PE. Os animais com PE tratados com PROB apresentaram níveis de TNF- α e IL-6 reduzidos e níveis de IL-17 aumentados quando comparados com os animais com PE não tratados. Não houve diferença significativa em relação aos níveis de IL-10 entre os grupos AR/PE e AR/PE/PROB. O grupo AR/PE apresentou maior taxa de bactérias anaeróbias sobre aeróbias do que o grupo AR/PE/PROB. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a administração de HN019 promoveu um efeito protetor contra a destruição tecidual em ratos com AR e PE experimentais.

Palavras-chave: Periodontite. Artrite Reumatoide. Probióticos.

Abstract

ABSTRACT

de CAMPOS, R.S.C. **Effects of the administration of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 in ligature induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis.** 2018. 159f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The purpose of this study was to evaluate the effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (HN019) on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis (RA). 28 rats were divided into 4 groups (n = 7): RA (control), RA/PROB (probiotic), RA/EP (experimental periodontitis) and RA/EP/PROB. Starting from day 0, HN019 was added daily to the water of the animals of PROB groups (1.5×10^9 colony forming units per milliliter), until the end of the experiment. On day 7, RA was induced by subcutaneous injections of bovine collagen type II (CII) emulsified in Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) at multiple sites at the base of the animals tail. On day 14, a booster dose of CII was performed with IFA. On day 21, local applications of Complete Freund's Adjuvant were performed in the plantar surface of the right hind paws and intra-articularly in the right knees of the animals. On day 28, in EP groups, ligatures were positioned around mandibular first molars and remained in position for 11 days. The animals were euthanized on day 39. Microtomographic, histomorphometric, immunoenzymatic (anti-citrullinated protein antibodies, TNF- α , IL-6, IL-17 and IL-10) and microbiological analyses were performed. Data were statistically analyzed (p < 0.05). The RA/EP/PROB group presented reduced alveolar bone loss when compared to the RA/EP group. There was no significant difference regarding connective tissue attachment level when the treated and untreated EP animals were compared. Animals of the RA/PROB group showed decreased levels of anti-citrullinated protein antibodies when compared with the animals of RA and RA/EP groups. EP animals treated with PROB presented reduced levels of TNF- α and IL-6 and increased levels of IL-17 when compared with animals with untreated EP. There was no significant difference in IL-10 levels between RA/EP and RA/EP/PROB groups. Group RA/EP presented a higher rate of anaerobic/aerobic bacteria than group RA/EP/PROB. Within the limits of this study, it can be concluded that the administration of HN019 promoted a protective effect against tissue destruction in rats with experimental RA and EP.

Keywords: Periodontitis. Rheumatoid Arthritis. Probiotics.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Delineamento experimental.....	65
Figura 2 -	Mensuração do edema de pata.....	67
Figura 3 -	(A) Animal posicionado para a colocação das ligaduras; (B) Fio de seda em posição para indução de periodontite no 1º molar inferior. Foto cedida por Oliveira (2016).....	68
Figura 4 -	Medidas lineares das distâncias entre junção cimento-esmalte (JCE) e crista óssea alveolar (COA) (A, B, C) ou teto da furca e crista óssea alveolar (COA) inter-radicular (D), realizadas nos cortes microtomográficos visualizados no eixo transaxial (A -lingual; B - vestibular; C – interproximal) e no eixo sagital (D – bifurcação).....	70
Figura 5 -	Corte microtomográfico visualizado no eixo coronal, para realização de análise microtomográfica volumétrica. (A) A região de interesse analisada (ROI) foi delimitada por um retângulo que tangenciava as quatro raízes do primeiro molar inferior. (B) Para separação das estruturas ósseas e dentárias, as imagens foram binarizadas, por meio de uma escala de níveis de cinza.....	71
Figura 6 -	Microfotografia ilustrativa dos tecidos periodontais da região interproximal entre 1º e 2º molares inferiores. A linha vermelha representa a medida linear (mm) referente ao nível de inserção conjuntiva (NIC). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x. JCE = junção cimento-esmalte; IC = inserção conjuntiva; 1º MI = primeiro molar inferior; 2º MI = segundo molar inferior.....	72
Figura 7 -	Médias e desvios-padrão do NOA (µm), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).....	79
Figura 8 -	Médias e desvios-padrão do VO (%), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).....	79
Figura 9 -	Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das seções microtomográficas das hemi-mandíbulas dos animais dos grupos AR (A, B), AR/PROB (C, D), AR/PE (E, F) e AR/PE/PROB (G, H). Imagens das superfícies vestibulares externas (A, C, E e G). Imagens das seções sagitais demonstrando superfícies internas (B, D, F e H). CTVox® (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do <i>pixel</i> = 7.96 µm.....	80

Figura 10 -	Microfotografias dos tecidos periodontais na área de bifurcação dos 1 ^{os} MI. Grupos AR (A, B), AR/PROB (C, D), AR/PE (E, F) e AR/PE/PROB (G, H). Aumento original = 10x (A, C, E, G); 20x (B, D, F, H). Coloração: Hematoxilina e Eosina. TF = teto da bifurcação; OA = osso alveolar; seta preta = vaso sanguíneo; cabeça de seta preta preenchida = cementoclasto; asterisco = fibras colágenas desconexas com a presença de edema intersticial; cabeça de seta não preenchida = fibras colágenas interpostas entre osso alveolar e cemento radicular.....	82
Figura 11 -	Médias e desvios-padrão do NIC (mm), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).....	83
Figura 12 -	Microfotografias dos tecidos periodontais na área interproximal entre 1 ^o MI e 2 ^o MI. Grupos AR (A), AR/PROB (B), AR/PE (C) e AR/PE/PROB (D). Aumento original = 20x. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Seta preta = junção cimento-esmalte (JCE); seta branca = inserção conjuntiva (IC); MI = molar inferior.....	84
Figura 13 -	Médias e desvios-padrão dos níveis médios de TNF- α (pg/mL), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).....	85
Figura 14 -	Médias e desvios-padrão dos níveis médios de IL-6 (pg/mL), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).....	85
Figura 15 -	Médias e desvios-padrão dos níveis médios de IL-17 (pg/mL), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).....	86
Figura 16 -	Médias e desvios-padrão dos níveis médios de IL-10 (pg/mL), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).....	87
Figura 17 -	Médias e desvios-padrão das taxas do número total de UFC de bactérias anaeróbias/aeróbias presentes no biofilme das ligaduras dos grupos AR/PE e AR/PE/PROB. * indica diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p <$	

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros para avaliação da indução de AR.....	78
-------------------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPCs	Anticorpos antiproteína citrulinada
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
BDs	Beta-defensinas
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCI	Coefficiente de correlação intraclasse
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
CFA	Adjuvante completo de Freund
cm	Centímetro
COA	Crista óssea alveolar
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DMARDs	Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença periodontal
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFP	Federação Europeia de Periodontologia
ELISA	Imunoensaio enzimático
FCG	Fluido crevicular gengival
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Grama
g/mL	Grama/mililitro
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HOMA B	Modelo de avaliação da homeostase - função de células B
IFA	Adjuvante incompleto de Freund
IL	Interleucina
JCE	Junção cimento-esmalte

mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama/decilitro
mg/mL	Miligrama/mililitro
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
Micro-CT	Microtomografia computadorizada por transmissão de raios X
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases da matriz
ng	Nanograma
ng/dL	Nanograma/decilitro
NIC	Nível de inserção conjuntiva
nm	Nanômetros
NOA	Nível ósseo alveolar
NLRs	Receptores de domínio de oligomerização de ligação a nucleótideos
OPG	Osteoprotegerina
PAD	Pepitídeo-arginina-deiminase
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
PE	Periodontite
pg/mL	Picograma/mililitro
PGA	Enzima de hidrólise de poli-N-acetilglucosamina
pH	Potencial hidrogeniônico
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
q-PCR	Reação em cadeia da polimerase
ORCA	Organização europeia para pesquisas em cáries
OTUs	Unidades taxonômicas operacionais
RANK-L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-beta
RAR	Raspagem e alisamento radicular

ROI	Região de interesse
RNA	Ácido ribonucleico
TE	Tris-EDTA
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th	<i>T-helper</i>
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TNFr1	Receptor de TNF- α
Tregs	Células T reguladoras
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
UFC	Unidades formadoras de colônia
USP	Universidade de São Paulo
VHS	Velocidade de sedimentação de eritrócitos
VO	Volume ósseo
VOI	Volume de interesse
μg	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma/mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Menos
%	Por cento
°C	Graus Celsius
+	Mais
<	Menor
±	Mais ou Menos
=	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-** Certificado de aprovação da Comissão de Ética e Uso de Animais em Pesquisa.....
- Anexo 2 -** Artigo científico submetido para publicação no periódico *Journal of Periodontology*.....

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	37
1.1 Doença periodontal: etiopatogenia e relação com doenças sistêmicas.....	37
1.2 Artrite reumatoide (AR): etiopatogenia.....	40
1.3 Associação AR-PE	44
1.4 Tratamento da AR	52
1.5 Tratamentos da PE.....	52
1.6 Probióticos.....	53
2. PROPOSIÇÃO	61
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3.1 Apreciação ética	63
3.2 Cálculo do tamanho da amostra.....	63
3.3 Modelo experimental.....	63
3.4 Administração do agente probiótico.....	64
3.5 Indução da artrite reumatoide	65
3.5.1 Avaliação da indução de AR.....	66
3.5.1.1 Índice de Atividade de Doença (IAD)	66
3.5.1.2 Mensuração do edema de pata	67
3.5.1.3 Análise imunoenzimática de anticorpos anti-proteínas citrulinadas (AAPCs)	67
3.6 Indução da periodontite experimental	67
3.7 Eutanásia e coleta de materiais para análises	68
3.8 Análises por meio de microtomografias computadorizadas por transmissão de raios X (micro-TC)	69
3.9 Análise histomorfométrica	71
3.9.1 Análise histopatológica.....	71
3.9.2 Análise histométrica.....	72
3.10 Análises imunoenzimáticas das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10.....	72
3.11 Análise microbiológica.....	74
3.12 Análise estatística	74
4. RESULTADOS.....	77
4.1 Avaliação da indução de AR.....	77
4.1.1 Índice de Atividade da Doença (IAD)	77
4.1.2 Mensuração do edema de pata	77
4.1.3 Análise imunoenzimática de AAPCs.....	77
4.2 Análise por micro-TC.....	78
4.3 Análise histomorfométrica	81

4.3.1 Análise histopatológica	81
4.3.2 Análise histométrica.....	83
4.4 Análises imunoenzimáticas das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10	84
4.5 Avaliação microbiológica.....	87
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS	103
ANEXOS	126

1. *Introdução*

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é caracterizada por um processo inflamatório crônico que leva à destruição dos tecidos moles e duros que suportam as unidades dentárias. De forma geral, a DP pode ser classificada como gengivite ou periodontite. A gengivite é caracterizada por uma inflamação restrita aos tecidos periodontais de proteção e é frequentemente reversível após a remoção do biofilme e cálculo (OLIVER, BROWN; LÖE, 1998). Também uma doença inflamatória, a periodontite (PE) é resultante de uma complexa inter-relação entre a infecção bacteriana e a resposta do hospedeiro, sendo caracterizada pela perda de inserção e de osso ao redor do dente (OLIVER, BROWN; LÖE, 1998). Atualmente, estima-se que 10 a 15% da população mundial seja afetada pela forma severa da PE (FRENCKEN et al., 2017). Em um estudo realizado no período de 2009 a 2012, 46% da amostra de uma população adulta dos Estados Unidos, representando 64,7 milhões de pessoas, apresentava PE. Dentre essa amostra com PE, 8,9% apresentava a forma severa da doença (EKE et al., 2015). Nesse mesmo estudo, demonstrou-se uma associação positiva entre a prevalência da PE e o aumento da idade, e também com o sexo masculino (EKE et al., 2015).

1.1 Doença periodontal: etiopatogenia e relação com doenças sistêmicas

A PE é resultante de uma disbiose no microbioma oral (HAJISHENGALLIS, 2014). As mudanças patológicas no periodonto estão fortemente relacionadas a um pequeno grupo de bactérias, definido como complexo vermelho, o qual engloba *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) e *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*). Este complexo, juntamente com a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), são presenças indesejáveis no diverso microbioma presente sobre a superfície dental (POTEMPA; MYDEL; KOZIEL, 2017). Quando essas bactérias colonizam de forma estável a área do sulco gengival, elas perturbam o equilíbrio da microbiota comensal existente e iniciam o processo de mudança na composição da microbiota. A partir dessa colonização subgengival, desencadeia-se uma resposta imune inata do hospedeiro (POTEMPA; MYDEL; KOZIEL, 2017). Uma vez bem estabelecidos no interior do biofilme disbiótico, esses patógenos tornam-se resistentes às defesas do hospedeiro, o que pode ser exemplificado pela resistência ao ataque de fagócitos e proteínas bactericidas, peptídeos antimicrobianos e espécies de oxigênio reativas, sendo dificilmente erradicados e levando a uma reação inflamatória crônica (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2012). A destruição dos tecidos periodontais ocorre como consequência desse processo, e provavelmente está mais

relacionada a uma resposta imune inata desregulada contra as bactérias do que às bactérias por si só (POTEMPA; MYDEL; KOZIEL, 2017). É importante destacar que novos modelos de patogênese das doenças periodontais sugerem que outros micro-organismos também podem levar a uma desregulação da microbiota homeostática (DARVEAU, 2010) e desencadear uma resposta inflamatória do hospedeiro aumentada (GROSS et al., 2017).

Conforme mencionado anteriormente, em resposta ao agente agressor, ocorre inicialmente uma reação inflamatória local, que ativa o sistema imune inato (GRAVES; COCHRAN, 2003; GARLET et al., 2006; COCHRAN, 2008). A resposta imune inata é caracterizada pela ativação de células residentes e pela migração de neutrófilos, monócitos e macrófagos (BERGLUNDH et al., 2002). Os peptídeos antimicrobianos, primeiramente liberados por células epiteliais e neutrófilos, são componentes importantes do sistema imune inato, com efeitos antibacterianos sobre os patógenos (DIAMOND et al., 2009; LAST; SCHALAMADINGER; MIRANKER, 2013). Esses peptídeos, juntamente com proteínas derivadas de células epiteliais, neutrófilos e fibroblastos, promovem a proteção do periodonto (MEYLE et al., 2017). Além disso, os lipídeos bioativos, como as resolvinas, e também as mucinas e aglutininas existentes na saliva e no fluido gengival crevicular e outros fatores antimicrobianos contribuem para a proteção do periodonto (HASTURK; KANTARCI, 2015; SANZ et al., 2017).

A amplificação da resposta inflamatória inicial localizada resulta na liberação de uma grande quantidade de citocinas e outros mediadores, levando à propagação da inflamação nos tecidos gengivais e promovendo o desenvolvimento de resposta humoral e mediada por células (GRAVES; COCHRAN, 2003; GARLET et al., 2006; COCHRAN, 2008). A resposta imune adaptativa inclui o influxo de células T e B para o local do processo inflamatório (BERGLUNDH et al., 2002). De fato, a PE é caracterizada pela ativação de células dendríticas de Langerhans e linfócitos intraepiteliais, como as células T-CD. Essas células imunes capturam e apresentam os antígenos bacterianos para as células T CD4 e CD8 do sistema imune adaptativo (SANZ et al., 2017).

Tanto as doenças periodontais como vários de seus fatores de risco estabelecidos envolvem perturbações no eixo imune-inflamatório (LI et al., 2018). Há extensas evidências epidemiológicas e experimentais fundamentando o papel de vários fatores de risco na iniciação, progressão e severidade da DP (GENCO; BORGNAKKE, 2013). Os fatores de risco podem exercer efeitos na resposta fisiológica, no sistema vascular, na resposta imunoinflamatória, nos mecanismos de estresse oxidativo e até mesmo na microbiota do biofilme. Como consequência, os fatores de risco podem modificar a susceptibilidade à

doença, influenciar a apresentação clínica e a progressão da mesma e interferir no reparo tecidual, modificando a resposta ao tratamento (PALMER; SOORY, 2010; GENCO; BORGNAKKE, 2013).

Os fatores de risco para a PE podem ser classificados em dois tipos: modificáveis e não modificáveis. Os fatores de risco que não podem ser modificados incluem gravidez, alterações hormonais femininas, osteoporose, artrite reumatoide (AR), predisposição genética, desordens hematológicas (leucemia e quimioterapia), alterações da imunidade, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, e também a idade e o sexo (ALBANDAR, 2005; GENCO; BORGNAKKE, 2013; AIJEHANI, 2014; REYNOLDS, 2014; LI et al., 2018). Já os fatores de risco modificáveis incluem o tabagismo, diabetes mellitus pobremente controlado, obesidade e síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, estresse psicológico, condições induzidas por drogas e consumo dietético inadequado de cálcio e vitamina D. Para o tratamento e controle da DP, é importante a busca pela eliminação ou modificação destes fatores de risco modificáveis (GENCO; BORGNAKKE, 2013; WARREN et al., 2014; REYNOLDS, 2014; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

Diversas evidências sugerem que inflamações crônicas, como as que acontecem na PE, levam a uma sobrecarga inflamatória sistêmica significativa, o que pode afetar outras condições sistêmicas (HASTURK; KANTARCI, 2015). Dessa forma, embora a inflamação periodontal seja aparentemente localizada, suas consequências são disseminadas para além do ambiente da bolsa periodontal, o que pode ser exemplificado pela presença de neutrófilos hiper-reativos e altos níveis de moléculas inflamatórias, como citocinas e proteína C-reativa, no soro sanguíneo de pacientes com PE (GOMES et al., 2013; HAJISHENGALLIS et al., 2015). De fato, a presença de inflamação sistêmica, como consequência da PE, pode estar implicada na etiopatogenia e/ou agravamento do quadro de diversas doenças crônicas e inflamatórias (DESTEFANO et al., 1993; GARCIA; KRALL; VOKONAS, 1998; LINDEN et al., 2012; GROSS et al., 2017).

Nesse contexto, diversas investigações tem estabelecido evidências para que a PE seja considerada um fator de risco independente para arteriosclerose, incluindo Acidente Vascular Cerebral (WU et al., 2000) e doença cardíaca coronária (BAHEKAR et al., 2007; HUMPHREY et al., 2008; FRIEDEWALD et al., 2009; KESCHULL; DEMMER; PAPAPANOU, 2010; BUHLIN et al., 2011), e também para desfechos adversos da gravidez (CHAMBRONE et al., 2011a; CHAMBRONE et al., 2011b; MATEVOSYAN, 2011) e diabetes mellitus (DEMMER; JACOBS; DESVARIEUX, 2008; ALLEN et al., 2011; IDE et al., 2011; PRESHAW et al., 2012). Também há evidências de que a PE esteja associada com

o desenvolvimento de algumas formas de câncer (GENCO; GENCO, 2014), doença de Alzheimer (PRITCHARD et al., 2017), doenças do trato respiratório (LEUCKFELD et al., 2008; SI et al., 2012; ZENG et al., 2012), doença de Crohn e colite ulcerosa (FIGUEREDO et al., 2011; BRITO et al., 2013; BAL et al., 2014; SURLIN et al., 2014; HUSSAIN; STOVER; DUPONT, 2015; SAFFI et al., 2015). Ainda, acredita-se que pacientes com doenças periodontais apresentam risco elevado para desenvolver AR ou apresentar agravamento da AR existente e que pacientes portadores de AR também estejam em maior risco para o desenvolvimento de doenças periodontais (RIBEIRO; LEÃO; NOVAES, 2005; HAVEMOSE-POULSEN et al., 2006).

1.2 Artrite reumatoide (AR): etiopatogenia

A AR pode ser definida como uma desordem inflamatória autoimune e crônica, caracterizada por sinovite erosiva inflamatória, que pode levar à deterioração de cartilagens, osso e tecidos moles, resultando em destruição articular grave, com deformidades e perda da função articular em longo prazo (SACKS; LUO; HELMICK, 2010; MYASOEDOVA et al., 2010; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). A sinovite é caracterizada pela presença de infiltração leucocitária, proliferação da camada de sinoviócitos, ativação de osteoclastos, presença de mastócitos, células B e células T helper (Th) 17 (Th17) (VANDOOREN et al., 2008; WANG et al., 2011). No fluido sinovial, há várias citocinas pro-inflamatórias, tais como: Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-15 e IL-17 (ASTRY; HARBERTS; MOUDGIL, 2011), bem como o ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANKL) (ROMAS; GILLESPIE; MARTIN, 2002).

O início da AR tipicamente acontece entre os 25 e 50 anos, embora possa ocorrer em qualquer idade (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). O curso da doença normalmente é progressivo e persistente, podendo haver também períodos de exacerbação e remissão (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Para muitos, trata-se de uma doença dolorosa e incapacitante (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). A AR é uma poliartrite inflamatória crônica, apresentando o comprometimento de cinco ou mais articulações (SACKS; LUO; HELMICK, 2010; MYASOEDOVA et al., 2010). Além disso, é uma doença sistêmica e pode afetar múltiplos tecidos, sendo as manifestações extra articulares mais comuns as encontradas nos pulmões (doença intersticial pulmonar/fibrose), coração (arritimias e endocardite) e olhos (inflamação ocular e síndrome de Sjogren secundária) (COJOCARU et al., 2010; PRETE et al., 2011; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015).

A prevalência da AR varia de 0,5 a 1% entre adultos em todo o mundo, afetando mais mulheres, em uma proporção de 2:1 a 3:1 em relação aos homens (MARCHESAN et al., 2013; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015; MOHAMMED et al., 2017).

A etiopatogenia da AR ainda não foi totalmente elucidada, mas acredita-se no papel da susceptibilidade genética e de estímulos ambientais levando à alteração da função imune e desencadeando a autoimunidade (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). De fato, em diversas populações do mundo, a associação entre a susceptibilidade à AR e alelos dos antígenos leucocitários humanos (HLA) DRB1 específicos tem sido demonstrada (SILMAN; PEARSON, 2002). Há uma maior frequência de alelos HLA DRB1 específicos em pacientes com AR quando comparados a pacientes saudáveis (McINNES; SCHETT, 2007). Esses alelos apresentam uma sequência comum, denominada epítipo compartilhado, que está presente em aproximadamente 90% dos pacientes portadores de AR (GREGERSEN; SILVER; WINCHESTER, 1987; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Com os estudos de associação genômica, tem sido reconhecidos alelos de susceptibilidade que influenciam a diferenciação de células T. Variações genéticas em HLA-DRB podem definir repertórios de antígenos estranhos e autoantígenos apresentados aos linfócitos T CD4+. Isso pode se dar por meio da ligação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II com peptídeos que contenham citrulina ao invés de arginina por meio da codificação de HLA-DRB1*04 (SCALLY et al., 2013; SPURLOCK et al., 2015). Sabe-se que as células T CD4+ tem um papel importante na patogênese da AR, devido à presença de grande quantidade de células T nas articulações de pacientes com AR e à associação da AR com o MHC classe II, que tem a função de apresentar antígenos peptídeos para as células T CD4+ (JANOSSY et al., 1981; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Contudo, é provável que um fator ambiental desencadeador seja necessário para desencadear a doença em indivíduos com uma predisposição genética (ROGERS, 2015).

Um fator que pode ser um desencadeador potencial para a AR são as variações no microbioma (JETHWA; ABRAHAM, 2017). De fato, o conceito de envolvimento bacteriano na patogênese da AR surgiu no século XIX, quando Bannatyne e Wohlmann (1986) sugeriram que a doença poderia ser causada por uma micobactéria (JETHWA; ABRAHAM, 2017). A disbiose, isto é, alterações na diversidade de composição e níveis de abundância da microbiota, tem sido associada ao risco e severidade da AR particularmente em três sítios: trato gastrointestinal, pulmões e cavidade oral (HORTA-BAAS et al., 2017).

Recentemente, a microbiota intestinal tem sido reconhecida como um fator ambiental indispensável na progressão da AR (TOIVANEN et al., 2002; SCHER et al., 2013; ZHANG

et al., 2015; CHEN et al., 2016; LEE; KIM, 2017; LIU et al., 2013; HORTA-BAAS et al., 2017). Estudos em humanos tem demonstrado evidências de uma relação entre a microbiota intestinal alterada e a iniciação e perpetuação da artrite inflamatória (HORTA-BAAS et al., 2017; MOHAMMED et al., 2017; CAMINER; HABERMAN; SCHER, 2017). Se a composição da comunidade bacteriana perturbada não for contida, a inflamação sistêmica pode se desenvolver em indivíduos suscetíveis (YEOH et al., 2013). A disbiose microbiana pode estar envolvida na patogênese da AR por meio de diversos fatores, incluindo a alteração da permeabilidade epitelial e de mucosas, o que permite que mais micro-organismos alcancem a corrente sanguínea (MIELANTS et al., 1996). A disbiose microbiana também pode levar à perda da tolerância imune aos componentes da microbiota indígena e ao tráfico de células imunes ativadas e material antigênico para as articulações (CAMINER; HABERMAN; SCHER, 2017). Outros mecanismos propostos são a ativação de células apresentadoras de antígenos por meio de um efeito sobre receptores toll- like (TLRs) ou receptores de domínio de oligomerização de ligação a nucleótídeos (NLRs), capacidade de produzir citrulinização de peptídeos por ação enzimática, mimetismo antigênico, controle do sistema imune do hospedeiro (desencadeamento da diferenciação de células T) e aumento da inflamação da mucosa mediada por células Th tipo 17 (HORTA-BAAS et al., 2017). Quando a disbiose intestinal ocorre, células T pró-inflamatórias (células Th1 e Th17) são ativadas por diferentes moléculas, e causam diferenciação das células B em células plasmáticas produtoras de autoanticorpos. Essas células e anticorpos migram para os tecidos sinoviais, e posteriormente tendem a ativar macrófagos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α . Por sua vez, essas estimulam fibroblastos sinoviais e condrócitos na cartilagem articular, liberando o proteoglicano degradante e a colagenase, que finalmente levam à destruição tecidual (VITETTA; SALI, 2008; SARTOR, 1997; ABHARI et al., 2016).

Algumas evidências apontam para a presença abundante de bactérias Gram-negativas no intestino como um fator que pode levar a um aumento de metabólitos tóxicos na circulação sanguínea e posteriormente à inflamação de articulações (CAMINER; HABERMAN; SCHER, 2017). Tem sido sugerido que a presença de bactérias segmentadas filamentosas pode alterar a regulação de células T CD4+, resultando em uma regulação positiva de IL-17 e células Th17, e isso tem sido recentemente implicado na patogênese das artrites autoimunes (IVANOV et al., 2009).

Nesse contexto, é importante ressaltar que foi observado que pacientes com AR apresentam diferenças significativas na microbiota intestinal em comparação a pacientes saudáveis. Pacientes com AR apresentam diminuição significativa em espécies de

Bifidobacterium e bactérias produtoras de ácido lático (LAB), com variações nas presenças de espécies de *Clostridium* (VITETTA; SALI, 2008). Além disso, o potencial papel da microbiota intestinal na etiopatogênese da AR é suportado, indiretamente, pelos efeitos da dieta e de probióticos no grau de atividade inflamatória da doença (HORTA-BAAS et al., 2017). Alguns estudos indicaram que o jejum e a dieta vegana são associados com uma diminuição na atividade da AR, o que pode ser atribuído à microbiota intestinal alterada também (MIELANTS et al., 1996; PELTONEN et al., 1997).

O interesse no papel da microbiota do trato respiratório na AR surgiu recentemente. Tem sido sugerido que, em virtude da exposição constante a antígenos bacterianos, os pulmões podem ser um local potencial de eventos iniciais que facilitam a iniciação e progressão da AR (KARLSON; DEANE, 2012; CATRINA et al., 2014). Recentemente, foi mostrado que existe uma disbiose microbiana da via aérea distal em pacientes com AR inicial não tratados, achados que são semelhantes aos detectados na inflamação pulmonar da sarcoidose. Esses achados também sugerem que o tabagismo pode levar à geração de auto-antígenos e à alteração de outros fatores inflamatórios que, na presença de predisposição genética, podem levar ao desenvolvimento da autoimunidade relacionada à AR (HORTA-BAAS et al., 2017).

Outros fatores ambientais que podem estar relacionados à etiopatogênese da AR são café, obesidade, bactérias e infecções por vírus (PEDERSEN et al., 2006; HORTA-BAAS et al., 2017; CAMINER; HABERMAN; SCHER, 2017).

É importante ressaltar que algumas infecções por vírus, como HIV, parvovírus, vírus da hepatite C (HCV) e vírus alfa emergidos mais recentemente, como o chikungunya (HORTA-BAAS et al., 2017), podem desencadear formas agudas ou crônicas de artrite e, em alguns casos, os sintomas mimetizam a AR (HORTA-BAAS et al., 2017). As infecções por vírus também podem ser consideradas fatores ambientais que levam à AR em indivíduos geneticamente predispostos (BROOKS et al., 2010).

Uma rede complexa de citocinas está diretamente envolvida em processos imunológicos específicos que promovem autoimunidade, inflamação crônica e, consequentemente, destruição tecidual na AR (McINNES; SCHETT, 2007). Essa quebra da tolerância imunológica manifesta-se também nas superfícies de mucosas, especificamente nos pulmões, intestino e periodonto (MIKULS et al., 2016; ROSENBAUM; ASQUITH, 2016).

A patogênese da AR está relacionada a células T regulatórias (T regs) (CD4 +, CD25 +, FOXP3 +), que estão defeituosas na AR (EHRENSTEIN et al., 2004). Essas células apresentam capacidade reduzida para suprimir a produção de citocinas inflamatórias,

ocorrendo também um aumento da apoptose (TOUBI et al., 2005). Outros fatores que desempenham um papel importante na patogênese da AR incluem TNF- α , IL-6, IL-1 β e células Th17 auto reativas que produzem IL-17 (MANICOURT et al., 1993; van HAMBURG et al., 2011; AMDEKAR et al., 2013; MEYLE; CHAPPLE, 2015). Uma rede interdependente de citocinas, prostanoídes e enzimas proteolíticas media o processo que leva à proliferação das células sinoviais e a presença de fibrose, além de erosão da cartilagem e de ossos das articulações. Devido à hiperplasia, aumento da vascularização e infiltração de células inflamatórias na área das articulações, há liberação de mediadores inflamatórios a partir de macrófagos, células T CD4+, células sinoviais e fibroblastos (AMDEKAR et al., 2013; QUINTEIRO et al., 2012).

A presença de autoanticorpos é uma característica predominante da AR (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). A resposta autoimune caracteriza-se pela produção de fator reumatoide (FR) e anticorpos antiproteínas citrulinadas (AAPCs) (MANKIA; EMERY, 2015). O FR é encontrado em 70 a 90% dos pacientes com AR, mas também é detectado em indivíduos saudáveis e em pacientes com outras doenças auto imunes (DORNER et al., 2004; DORNER; HANSEN, 2004). A presença de AAPCs também é altamente específica para a AR (mais de 90%) e está associada a uma artrite mais destrutiva e progressiva (SILVEIRA et al., 2007; KLARESKOG et al., 2008; SNIR et al., 2010). É interessante ressaltar que a presença de AAPCs tem sido encontrada em até 10 anos antes do início da doença e também está correlacionada com fatores de risco para AR, como tabagismo e doença periodontal (MAHDI et al., 2009; WEGNER et al., 2010; HENSVOLD et al., 2015).

1.3 Associação AR-PE

Na última década, tem sido crescente o interesse da comunidade científica nas investigações epidemiológicas e patológicas que inter-relacionam PE e AR, pois diversos estudos tem demonstrado que há uma significativa relação bidirecional entre essas duas patologias (MERCADO et al., 2000; LUNDBERG et al., 2010, de PABLO; DIETRICH; McALINDON, 2008; CHEN et al., 2013; MIKULS et al., 2012). Sugere-se que a PE pode ser um importante fator para o início e a manutenção das respostas inflamatórias autoimunes que ocorrem na AR (LUNDBERG et al., 2010) e que, por outro lado, a AR pode funcionar como um fator desregulador da resposta imune no periodonto do hospedeiro, aumentando a suscetibilidade à PE destrutiva em adultos (MERCADO et al., 2000; MERCADO et al., 2001).

Estudos transversais e caso-controle tem demonstrado maior prevalência e severidade de PE, além de maior frequência de perda dentária, em pacientes adultos e jovens portadores de AR do que em pacientes saudáveis (Al-SHAMMARI et al., 2005; BOZKURT et al., 2006; ARKEMA; KARLSON; COSTENBADER, 2010; SCHER et al., 2012; MIKULS et al., 2014). Além disso, observou-se que a maior severidade da PE em pacientes com AR independe de idade, gênero, etnia ou histórico de tabagismo (MIKULS et al., 2014). Também foi demonstrado que pacientes com artrite idiopática juvenil possuem maior suscetibilidade à PE destrutiva quando comparados a indivíduos saudáveis da mesma faixa etária (HAVEMOSE-POULSEN et al., 2007; FABRI et al., 2014).

Por outro lado, estudos observacionais, baseados em coortes clínicos, tem sugerido que a prevalência de AR também é maior em pacientes com periodontite do que em pacientes sem periodontite (KASSER et al., 1997; MERCADO et al., 2001; PISCHON et al., 2008; GARIB; QARADAXI, 2011; de SMIT et al., 2012; SCHER et al., 2012; POTIKURI et al., 2012; JOSEPH et al., 2013). De fato, recentemente, Fuggle e colaboradores (2016) realizaram uma revisão sistemática com metanálise que deu suporte à presença de uma associação significativa entre AR e PE.

Nesse contexto, as destruições periodontal e articular da AR tem em comum uma resposta do hospedeiro direcionada aos tecidos duros decorrentes de uma inflamação crônica nos tecidos adjacentes. Tal fato leva a uma degradação excessiva dos tecidos ricos em colágeno: gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar na PE, e cartilagem, tecido periarticular e erosão óssea na AR (de AQUINO et al., 2014).

Alguns estudos demonstraram também melhora nos parâmetros de uma das doenças (AR ou PE) quando terapias voltadas para a outra patologia foram aplicadas. Como exemplo, verificou-se que os parâmetros clínicos de PE apresentaram melhora quando os pacientes portadores de AR receberam um tratamento com terapia anti-linfócito B (COAT et al., 2015). Também demonstrou-se que pacientes com AR tiveram sucesso em seu tratamento com o uso de antibioticoterapia contra bactérias anaeróbias (OGRENDIK, 2009). Além disso, estudos clínicos demonstraram que, após a realização de tratamento periodontal em pacientes com AR, houve uma diminuição na taxa de sedimentação de eritrócitos, proteína C-reativa, níveis de TNF- α e melhora nos Escores de Atividade da Doença em 28 articulações, apontando para um efeito direto da PE na AR estabelecida (Al-KATMA et al., 2007; ORTIZ et al., 2009; ERCIYAS et al., 2013).

Embora os estudos epidemiológicos tenham demonstrado uma forte correlação entre PE e AR, eles apresentam limitações, como o fato de vários deles serem transversais,

apresentarem variabilidade na definição de PE e nos desfechos periodontais considerados, a extensão do exame oral realizada e limitadas informações coletadas sobre a AR presente (FUGGLE et al., 2016). Nesse contexto, tem sido muito importante, no estudo da associação AR-PE, o uso de modelos pré-clínicos.

Os modelos animais para estudo da AR complementam as investigações em humanos e são facilmente reproduzíveis e bem definidos (KANNAN; ORTMANN; KIMPEL, 2005; DINSER, 2008). O primeiro modelo animal de artrite foi desenvolvido em ratos quando Stoerk et al. (1954) e Pearson e Wood (1959) descobriram que a injeção de adjuvante completo nos animais induzia uma poliartrite. Vários modelos animais surgiram com o tempo, incluindo os modelos de artrite induzida, como a artrite induzida por colágeno, artrite induzida por anticorpo anti-colágeno, artrite induzida por antígeno, artrite induzida por parede celular bacteriana, artrite induzida por zimosan, o modelo de albumina sérica bovina (BSA) metilado, e também os modelos de artrite em animais geneticamente manipulados ou modelos espontâneos, tais como o camundongo TNF- α -transgênico, o camundongo K/BxN e o camundongo Skg (ASQUITH et al., 2009; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Apesar das limitações inerentes a todos os modelos animais, esses tem sido fundamentais para a geração de novos conhecimentos sobre a etiopatogenia da AR e para a identificação de novas medicações e abordagens terapêuticas (DINSER, 2008; ASQUITH et al., 2009; KOLLIAS et al., 2011; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015).

O modelo de AR induzida por colágeno (CIA), um modelo comumente utilizado em pesquisas de AR, compartilha muitas similaridades com a AR humana, como edema e degeneração em múltiplas articulações (poliartrite), sinovites, formação de pannus na cartilagem, erosão óssea, dor crônica, distúrbios de marcha (caminhada), comprometimentos extra-articulares (fibrose pulmonar, envolvimento cardíaco, inflamação ocular) e geração de AAPCs e FR, autoanticorpos muito estudados no diagnóstico da AR (ASQUITH et al., 2009; BILLIAU; MATTHYS, 2011; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Nesse modelo, a AR é induzida em linhagens de ratos e camundongos susceptíveis por meio de injeção subcutânea de colágeno tipo II em adjuvante incompleto de Freund (IFA) (HOLMDAHL et al., 1989) ou adjuvante completo de Freund (CFA) (TRENTHAM, 1982). Duas características fazem desse modelo o padrão ouro em modelos in vivo para estudos de AR: a quebra da tolerância e a geração de auto-anticorpos contra o próprio organismo e contra o colágeno (ASQUITH et al., 2009). Tanto a resposta Th 1 como a resposta Th17 são induzidas no modelo de CIA; contudo, as células Th17 parecem desempenhar o papel patológico dominante (MURPHY et al., 2003).

Estudando a associação entre AR e PE, com base principalmente em estudos pré-clínicos, os quais permitem a investigação de mecanismos biológicos que associam ambas as patologias, percebe-se que, assim como a etiopatogênese da AR não é completamente elucidada, tampouco é totalmente esclarecida a associação AR-PE. As etiologias da AR e PE são distintas: uma é autoimune e a outra é infecciosa. Entretanto, elas compartilham várias características comuns, incluindo infiltrado de células inflamatórias, liberação de citocinas-chave, como o TNF- α , nos tecidos afetados e destruição óssea (QUEIROZ-JR et al., 2011). Assim, por causa dessas semelhanças, foi sugerido um modelo denominado "two-hit", no qual o biofilme oral comensal (primeiro "hit") pode interagir com doenças ósseas destrutivas em outro local do corpo (segundo "hit") para induzir a PE (GOLUB et al., 2006). Outros pesquisadores hipotetizaram a existência de uma via causal (AR desencadearia periodontite e vice-versa) e uma via não causal (envolvendo fatores genéticos, ambientais e comportamentais) (de PABLO et al., 2009).

Recentemente, o consenso de um encontro entre a Federação Europeia de Periodontologia (EFP) e da Organização Europeia para Pesquisas em Cáries (ORCA) estabeleceu a AR como sendo um fator de risco para as doenças periodontais (CHAPPLE et al., 2017). De fato, diversos estudos em animais, aplicando diferentes modelos de indução de AR, demonstraram que a PE é exacerbada pela AR induzida experimentalmente (RAMAMURTHY et al., 2005; TROMBONE et al., 2010; PARK et al., 2011; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2011; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2012; CORRÊA et al., 2017).

É interessante observar ainda que alguns estudos demonstraram que a indução da AR em animais levou espontaneamente ao desenvolvimento de PE, com a presença de atividade osteoclástica aumentada, formação óssea diminuída, perda óssea alveolar, mobilidade dental e presença de alguns mediadores inflamatórios aumentados no tecido gengival (RAMAMURTHY et al., 2005; Park et al., 2011; MARCHESAN et al., 2013; CORRÊA et al., 2016). Queiroz-Junior et al. (2011) também observaram perda óssea alveolar espontânea em camundongos com AR induzida por antígeno, mas ressaltaram que é necessária a participação da microbiota comensal oral para que a PE se desenvolva. De fato, esses resultados podem indicar que, após as imunizações para indução da AR, as células ósseas alveolares desenvolvem um comportamento alterado que leva à destruição óssea alveolar (PARK et al., 2011; MARCHESAN et al., 2013). Nesse contexto, recentemente um estudo comparou a microbiota oral de camundongos com AR induzida à microbiota de outros camundongos com PE induzida por inoculação de *A. actinomycetemcomitans* (CÔRREA et al., 2016). Ambos os grupos apresentaram perda óssea alveolar e contagens elevadas da

maioria das espécies bacterianas analisadas, com predominância de espécies Gram-negativas. Dessa forma, pode-se sugerir que a AR induzida pode levar a uma mudança na microbiota oral dos animais, o que levaria à PE (MARCHESAN et al., 2013; CÔRREA et al., 2016).

Por outro lado, vários estudos também demonstram o agravamento da AR devido à presença da periodontite (CANTLEY et al., 2011; MARCHESAN et al., 2013). Um estudo demonstrou que a PE induzida por ligaduras agravou os parâmetros clínicos da AR induzida por colágeno, com aumento significativo do edema de pata quando os animais com DP e AR foram comparados aos animais com AR somente (CORRÊA et al., 2017). Neste estudo, inclusive, a PE levou a um aumento nos níveis sorológicos de FR e nos níveis de AAPCs nos tecidos gengivais (CORRÊA et al., 2017). Estudos em animais, em diferentes modelos experimentais, demonstraram que a *P. gingivalis* influenciou o início e a gravidade da AR induzida, em níveis macroscópico e/ou histológico, sendo também um fator importante para a manutenção das respostas inflamatórias autoimunes que ocorrem na AR (BARTOLD et al., 2010; LUNDBERG et al., 2010; CANTLEY et al., 2011; MARCHESAN et al., 2013). A presença de outras bactérias relacionadas à DP também foi associada ao agravamento da AR em modelos animais (de AQUINO et al., 2014). Quando uma cepa de *P. nigrescens* foi inoculada em animais com AR induzida por IFA ou CFA, observou-se um início mais rápido da AR, além de maiores incidência e severidade da doença (de AQUINO et al., 2014). Nesse contexto, é interessante observar os achados de um estudo populacional nos EUA, que avaliou a microbiota subgengival de pacientes com diagnóstico de AR recente, AR crônica e de indivíduos saudáveis por meio de sequenciamento metagenômico (SCHER et al., 2012). Foi demonstrado que pacientes com AR inicial apresentavam maior abundância de algumas unidades taxonômicas operacionais (OTUs) periodontopatogênicas, como *Tannerella*/OTU13 e *Treponema*/OTU32. Além disso, espécies de *Prevotella* (OTU60) e de *Leptotrichia* (OUT87) foram associadas ao surgimento de AR, e a espécie *Anaeroglobus geminatus* foi relacionada a um aumento dos marcadores sorológicos AAPCs e FR (SCHER et al., 2012). Dessa forma, é possível que a disbiose microbiana que acontece na população portadora de AR seja distinta, e que outras bactérias periodontais mereçam ser investigadas nessa população (MARCHESAN et al., 2013). É interessante ressaltar também que estudos em animais demonstraram que o controle da microbiota oral com um tratamento antimicrobiano interrompeu a perda óssea alveolar tanto no modelo de AR induzida por pristano (TROMBONE et al., 2010) como no modelo de AR induzida por antígeno (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2011).

Conforme mencionado anteriormente, alguns pesquisadores também estabelecem a hipótese de que a relação entre AR e PE seja permeada por uma via não causal, envolvendo fatores que predispõe a ambas as doenças (de PABLO et al., 2009). Esses fatores incluem os relacionados ao hospedeiro e genéticos, como a expressão de alguns genes inflamatórios (polimorfismos) e o envelhecimento, fatores ambientais, como as condições socioeconômicas, e comportamentais, como o fumo (BERGSTROM, 2006; PINCUS, 2007; KLARESKOG PADYUKOV; ALFREDSSON, 2007; DIETRICH et al., 2007; BORRELL; CRAWFORD, 2008; LEE et al., 2008a; LEE et al., 2008b; POTEMPA; MYDEL; KOZIEL, 2017). De fato, essas características apresentam-se como fatores de confusão no estabelecimento de uma associação entre ambas as doenças (de PABLO et al., 2009).

Vários mecanismos biológicos tem sido propostos para explicar a associação entre AR e PE. A AR e a PE apresentam similaridades em relação à patogênese, já que ambas envolvem inflamação crônica alimentada por um conjunto semelhante de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-17) (QUEIROZ-JÚNIOR et al., 2011; KOBAYASHI; YOSHIE et al., 2015; ZENOBIA; HAJISHENGALLIS, 2015), altas concentrações de marcadores inflamatórios, como a proteína C-reativa, na circulação (PARASKEVAS; HUIZINGA; LOOS, 2008; RHODES; FURNROHR; VYSE, 2011), além de destruição óssea impulsionada por células pró-inflamatórias Th17 (de PABLO et al., 2009). O papel das células Th17 tem sido amplamente estudado em ambas as doenças. Nas articulações inflamadas, as células Th17 produzem citocinas inflamatórias que ativam osteoclastos e macrófagos, bem como provocam recrutamento de leucócitos. O infiltrado leucocitário produz citocinas, quimiocinas e enzimas que levam à erosão óssea, danos à cartilagem e inflamação crônica (AZIZI; JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2013; MIOSSEC, 2003; MIOSSEC, 2009). Luo et al. (2014) demonstraram que as células Th17 e a expressão de suas citocinas também podem estar relacionadas com a progressão da DP. A atividade de tais células está relacionada com a perda de inserção e aumento da profundidade de sondagem, indicando que pode haver um potencial mecanismo para as células Th17 na PE (LUO et al., 2014). As células B também parecem ter um papel chave na reabsorção óssea da AR e da PE (COAT et al., 2015). Em ambas as doenças, os osteoclastos são principalmente ativados por mecanismos dependentes da supra regulação de RANKL, um membro da família TNF de citocinas (BARTOLD; MARSHALL; HAYNES, 2005). Estudando as vias que associam ambas as doenças, Queiroz -Jr et al. (2011) demonstraram que, quando a AR foi induzida em camundongos, houve um aumento dos níveis de TNF- α , os quais contribuíram para o desenvolvimento de perda óssea alveolar espontânea. Por outro lado, quando uma terapia de

bloqueio de TNF- α foi utilizada, a perda óssea alveolar espontânea não foi observada (QUEIROZ-JR et al., 2011). O papel da IL-1 também foi salientado na associação AR-PE, já que a IL-1 β é essencial no processo de diferenciação de células T (AKITSU et al., 2015). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF - α amplificam os efeitos da IL-17 (WEAVER et al., 2007; GAFFEN; HAJISHENGALLIS, 2008).

Como mencionado previamente, vários estudos tem apontado a presença de bactérias orais, com destaque para *P. gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), como um possível fator etiológico para a AR (TÉMOIN et al., 2012; REICHERT et al., 2013). É interessante ressaltar também que foi observada a presença de DNA de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia* no fluido sinovial de pacientes com AR. Além disso, foram encontradas altas concentrações de anticorpos contra essas bactérias no soro e no fluido sinovial de pacientes com AR (CAMINER; HABERMAN; SCHER, 2017).

De modo geral, *P. gingivalis* é o micro-organismo mais claramente envolvido no desenvolvimento da AR, e estudos utilizando modelos animais demonstraram o potencial dessa bactéria pró-inflamatória em promover o desenvolvimento de artrite experimental e aumento dos níveis séricos de proteína C-reativa, TNF- α , IL-1 β , IL-17, MMP (metaloproteinase de matriz)-13 e RANKL (CANTLEY et al., 2011). De fato, foi observado que, quando a *P. gingivalis* foi inoculada oralmente em animais, houve um agravamento da AR induzida, com influxo massivo de leucócitos, acúmulo de osteoclastos e erosões óssea e de cartilagem, levando a uma exacerbação da incidência e da severidade do edema e eritema em patas traseiras e dianteiras (MARCHESAN et al., 2013; de AQUINO et al., 2014; GULLY et al., 2014; CHUKKAPALLI et al., 2016). Em alguns estudos, verificou-se que esse processo foi mediado pela via de sinalização Th17/IL-17 (MARCHESAN et al., 2013; de AQUINO et al., 2014, de AQUINO et al., 2017). Também foi demonstrado, em um estudo clínico, uma associação significativa entre anticorpos anti-*P. gingivalis* e AR, após ajustes para idade, sexo e tabagismo (OKADA et al., 2013). Os autores sugeriram inclusive que os níveis desse anticorpo podem influenciar os níveis sorológicos do FR (OKADA et al., 2013).

Uma das explicações para o possível papel da *P. gingivalis* na etiopatogenia da AR diz respeito ao seu potencial para citrulinização de proteínas. A citrulinização de proteínas é essencial para diversos processos fisiológicos, tais como queratinização da pele, desenvolvimento cerebral e regulação de expressão gênica por meio da remodelação da cromatina. Além disso, a citrulinização de proteínas também apresenta um papel importante no funcionamento normal do sistema imune (GYORGY et al., 2006; WANG et al., 2009). Por outro lado, a citrulinização de proteínas também pode ocorrer em condições inflamatórias

patológicas associadas a necroses e apoptoses celulares excessivas (KOZIEL; MYDEL; POTEMPA, 2014; POTEMPA; MYDEL; KOZIEL, 2017). O processo de citrulinização pode levar a alterações nas interações intra e inter-moleculares de alvos proteicos que possuem resíduos de arginina essenciais para sua estrutura. Isso pode alterar a arquitetura tridimensional de proteínas modificadas e sua solubilidade em água, e pode levar à geração de neo-epítomos, quebrando a tolerância imunológica às proteínas citrulinadas (KOZIEL; MYDEL; POTEMPA, 2014). A *P. gingivalis* é o único micro-organismo capaz de produzir uma enzima bacteriana, denominada *P. gingivalis* peptidil arginina deaminase (PPAD), com a capacidade de citrulinizar proteínas endógenas e humanas, consequentemente criando antígenos que podem iniciar uma resposta de autoanticorpos na AR (de SMIT et al., 2015). De fato, tem sido sugerido que a autoimunidade contra proteínas citrulinadas exerce um importante papel no desenvolvimento de AR (KOZIEL; MYDEL; POTEMPA, 2014). Assim, a exposição crônica a proteínas citrulinadas em sítios com PE pode predispor ao desenvolvimento de autoanticorpos e a iniciação de AR em indivíduos susceptíveis (KOZIEL; MYDEL; POTEMPA, 2014). Investigações tem indicado que a infecção por *P. gingivalis* precede a AR e que essa bactéria é um provável fator na iniciação, desenvolvimento, progressão e manutenção das respostas inflamatórias autoimunes que ocorrem na AR (LUNDBERG et al., 2010). Dessa forma, tem sido evidenciado que a PPAD pode representar uma ligação mecânica entre PE e AR (KOZIEL; MYDEL; POTEMPA, 2014).

Além da *P. gingivalis*, outras bactérias periodontais tem sido relacionadas com a presença de AAPCs. A bactéria *A. actinomycetemcomitans* produz leucotoxinas formadoras de poros que levam à morte de neutrófilos humanos e induzem a hipercitrulinização dos mesmos, contribuindo para uma citrulinização desregulada (KONIG et al., 2016). A exposição de pacientes com AR e PE a cepas de *A. actinomycetemcomitans* leucotóxicas foi associada a níveis aumentados de AAPCs e FR (KONIG et al., 2016). Um estudo em humanos com avaliação da microbiota subgengival de pacientes com AR demonstrou também uma relação entre a espécie *Anaeroglobus geminatus* e um aumento dos marcadores sorológicos AAPCs e FR (SCHER et al., 2012).

De fato, muitos achados clínicos e laboratoriais associam a microbiota da cavidade oral e do trato gastrointestinal com a citrulinização de proteínas e também com alterações imunológicas que podem contribuir para o risco de desenvolvimento de AR (SCHORPION; KOLASINSKI, 2017). Dessa forma, terapias voltadas para a modulação das microbiotas oral e intestinal e da resposta imunoinflamatória do hospedeiro podem ser de grande valor no manejo da AR associada à PE. Nesse contexto, sabe-se que a inter-relação entre AR e PE

ainda não é totalmente esclarecida. De qualquer forma, independentemente do fato de haver ou não uma relação de causalidade entre as duas doenças, como ambas apresentam vias mediadoras em comum, é possível que terapias direcionadas para uma das doenças leve à melhora nos parâmetros da outra.

1.4 Tratamento da AR

O objetivo primário no tratamento de pacientes portadores de AR consiste no controle do processo inflamatório para melhorar a qualidade de vida dos mesmos. A terapêutica medicamentosa convencional adotada inclui o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), corticoides e medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs) (GOTZSCHE; JOHANSEN, 2000; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Os DMARDs promovem alívio dos sintomas e também apresentam o potencial de alterar a evolução da AR (OKADA et al., 2011). Um dos DMARDs é o metotrexato, que atua na inibição de uma enzima envolvida no metabolismo do ácido fólico (SUAREZ-ALMAZOR et al., 2000). Drogas antimaláricas, como a hidroxicloroquina, também tem sido utilizadas no tratamento da AR, atuando sobre a resposta imune inata (BEN-ZVI et al., 2012). Como uma alternativa aos pacientes que não respondem adequadamente a essas terapias, existem os biofarmacêuticos, principalmente os inibidores de TNF- α , que reduzem os sinais e sintomas da AR e retardam os seus danos teciduais estruturais (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Contudo, embora as terapias anti-TNF- α possam ter muito sucesso, apenas um quarto dos pacientes tratados com inibidores de TNF- α associados ao metotrexato obtém remissão da doença, definida como um escore DAS-28 menor que 2,6. Além disso, até 50% dos pacientes que respondem à terapia inicialmente perdem a sua resposta em até 12 meses após início da terapia (BUCH; BINGHAM; EMERY, 2007). Dessa forma, existe a necessidade de tratamentos para AR que sejam mais efetivos (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015).

1.5 Tratamentos da PE

A raspagem e alisamento radicular (RAR) é amplamente considerada o padrão ouro para o tratamento da PE, visando a remoção de depósitos bacterianos subgengivais (BEREZOW; DARVEAU, 2011; MOMBELLI, 2018). Entretanto, a RAR sozinha pode não produzir os resultados clínicos desejados em casos severos de PE, onde a recolonização dos sítios por bactérias periodontopatogências e a recorrência da doença são comuns (BEREZOW; DARVEAU, 2011). O tratamento padrão-ouro também pode apresentar limitações em casos onde existem fatores sistêmicos, genéticos ou ambientais que aumentam

a susceptibilidade do paciente à periodontite e prejudicam sua resposta à terapia (STABHOLZ; SOSKOLNE; SHAPIRA, 2010; BEREZOW; DARVEAU, 2011). Ao longo dos anos, muitos estudos clínicos tem investigado terapias adjuvantes à RAR, tais como antimicrobianos sistêmicos e de liberação local, antissépticos, terapia fotodinâmica, bisfosfonatos e probióticos (WILSON, 1994; KIRKWOOD et al., 2007; MOMBELLI, 2018).

Devido ao aumento da incidência de resistência a antibióticos e aos efeitos colaterais das drogas sintéticas utilizadas para tratamento da AR, os probióticos emergem como um promissor recurso terapêutico no tratamento da PE e da AR (MESSORA et al., 2013; FOUREAUX et al., 2014; AMDEKAR et al., 2014).

1.6 Probióticos

A compreensão da relação entre as bactérias presentes na cavidade bucal, em todo o trato gastrointestinal e em outros locais do corpo humano, ou seja, o microbioma humano, e o estado de saúde e doença, tornou-se significativamente mais sofisticada nas últimas décadas (SCHORPION; KOLASINSKI, 2017). Dessa forma, o uso de probióticos tem atraído o interesse da comunidade científica como uma nova alternativa para o tratamento das doenças periodontais (TEUGHELIS et al., 2013). Probióticos podem ter ação tanto sobre o meio bacteriano como sobre o hospedeiro, modulando a resposta imunoinflamatória (TEUGHELIS; LOOZEN; QUIRYNEN, 2011).

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos, principalmente bactérias, seguros para o consumo e capazes de produzir efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades suficientes (FAO/WHO, 2002). Geralmente, os probióticos são regulamentados como suplementos dietéticos e comercializados com o objetivo de melhorar ou manter a saúde (TSUBURA et al., 2009). Os principais micro-organismos utilizados para fins probióticos são bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (DEEPA; MEHTA, 2009). Uma série de estudos tem examinado o efeito do uso de probióticos na prevenção e/ ou tratamento de diversas condições e doenças, como infecções intestinais, infecções do trato respiratório, doenças cardiovasculares, osteoporose, infecções urogenitais, halitose, reações alérgicas, AR, cáries e DP, dentre outras (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015).

Vários mecanismos tem sido sugeridos para explicar a ação dos probióticos na saúde sistêmica (MEURMAN, 2005; HOMAYOUNI RAD et al., 2013; BEDAIWI; INMAN, 2014). Esses mecanismos relacionam-se com modulação imunológica, modulação dos mecanismos imunológicos intestinais, produção de mucinas, regulação negativa de respostas inflamatórias,

secreção de substâncias antimicrobianas, competição com outras microbiotas, incluindo patógenos potenciais, por bloqueio competitivo de sítios de adesão em superfícies epiteliais e mucosas, inibição da invasão epitelial pela regulação da permeabilidade intestinal e estimulação da produção de imunoglobulina (SAAVEDRA et al., 2004; van NIEL, 2005).

A introdução de probióticos visando promover a saúde periodontal considera três fatores etiológicos determinantes da PE: 1) a suscetibilidade do hospedeiro, 2) a presença de bactérias patogênicas e 3) a redução ou ausência das então chamadas bactérias benéficas (SLOTS; RAM, 1991; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1992; WOLFF; DAHLÉN; AEPLI, 1994). Nesse contexto, recuperar a quantidade de bactérias benéficas bucais por meio do uso de probióticos parece ser uma estratégia válida na prevenção e tratamento das doenças periodontais relacionadas ao biofilme dental.

Os micro-organismos utilizados como probióticos podem desencadear efeitos diretos sobre os patógenos periodontais, afetando seu crescimento, adesão e colonização (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). Bactérias probióticas podem produzir diversos componentes que agem como agentes antimicrobianos, tais como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (GILLOR; ETZION; RILEY, 2008; GORDON, 2009; OELSCHLAEGGER, 2010). Sookkhee et al. (2001) isolaram bactérias produtoras de ácido láctico da cavidade oral de voluntários saudáveis tailandeses e demonstraram que as mesmas desenvolvem atividade antimicrobiana contra *P. gingivalis* e *Streptococcus mutans* (*S. Mutans*). Van Hoogmoed et al. (2000) observaram que um biosurfactante produzido pelo *Streptococcus mitis* é capaz de diminuir a adesão de *S. mutans* e de vários periodontopatógenos.

Outro mecanismo sugerido para justificar os efeitos dos probióticos no tratamento das doenças periodontais refere-se à modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). Alguns estudos tem demonstrado que algumas espécies probióticas podem atenuar a expressão de IL-8 induzida por periodontopatógenos nas células epiteliais orais (COUSSEAU et al., 2008; ZHANG; CHEN; RUDNEY, 2008; SLIEPEN et al., 2009) e reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-1 β e TNF- α) no fluido crevicular gengival (FCG) (TWETMAN et al., 2009). Shimauchi et al. (2008) verificaram que o consumo de probióticos diminuiu significativamente os níveis de lactoferrina salivar, uma proteína indicativa de inflamação periodontal, em indivíduos fumantes, altamente susceptíveis à periodontite. Staab et al. (2009) demonstraram que a ingestão de probióticos pode reduzir a atividade de elastase de polimorfonucleares, bem como os níveis de mieloperoxidase e MMP-3 no FCG de indivíduos com gengivite.

Szkaradkiewicz, Stopa e Karpinski (2014) verificaram que *Lactobacillus reuteri* pode reduzir os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-17 no FCG de pacientes com periodontite crônica (PC). Os estudos que avaliaram os efeitos dos probióticos na prevenção, controle ou tratamento das doenças periodontais demonstraram que os mesmos podem promover redução dos periodontopatógenos (ZAHRADNIK et al., 2009; TSUBURA et al., 2009; MAYANAGI et al., 2009), melhorar os parâmetros clínicos periodontais (RICCIA et al., 2007; SHIMAUCHI et al., 2008; TSUBURA et al., 2009), reduzir os níveis salivares de prostaglandina E2 e MMP e os níveis de citocinas pro-inflamatórias no FCG (RICCIA et al., 2007; SZKARADKIEWICZ; STOPA; KARPINSKI, 2014), inibir o desenvolvimento de gengivite (STAAB et al., 2009) e potencializar os efeitos da RAR (VIVEKANANDA; VANDAN; BHAT, 2010; TEUGHELIS et al., 2013; SHAH et al., 2013; INCE et al., 2015; TEKCE et al., 2015). Ince e colaboradores (2015), avaliaram os efeitos adjuvantes da suplementação probiótica com *Lactobacillus reuteri* à terapia periodontal inicial em pacientes com PC, por meio de parâmetros clínicos e bioquímicos. O grupo teste recebeu RAR e pastilhas contendo probiótico enquanto o grupo controle recebeu RAR e pastilhas placebo. Todas as avaliações foram realizadas no início do estudo e nos dias 21, 90, 180 e 360. As comparações inter-grupos do índice de placa bacteriana, índice gengival, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem demonstraram alterações significativas favorecendo o grupo teste em todos os tempos avaliados. Houve diminuição nos níveis de MMP-8 e aumento nos níveis do inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP)-1 significativos no FCG até o dia 180 no grupo teste. Os valores médios de ganho de inserção foram significativamente maiores no grupo teste do que no grupo controle nos dias 90, 180 e 360.

Os efeitos dos probióticos são dependentes da cepa, dose, frequência e via de administração utilizada (RICOLD et al., 2017). Os estudos que avaliaram os efeitos de probióticos nos tecidos periodontais tem usado predominantemente micro-organismos do gênero *Lactobacillus* (INCE et al., 2015; TEKCE et al., 2015; MORALES et al., 2016). Contudo, outras cepas em potencial merecem ser investigadas, como por exemplo espécies de *Bifidobacterium*, que se integram de forma satisfatória aos biofilmes subgengivais (JÄSBERG et al., 2016).

Bifidobacterium animalis subsp. lactis (*B. lactis*) faz parte da microbiota humana e apresenta uma relação simbiótica com o hospedeiro. É considerado um probiótico em potencial devido às suas propriedades imunomoduladoras (PRASAD et al., 1988; BIAVATI et al., 2000; GILLS et al., 2000) e antimicrobianas (CAGLAR et al., 2008; SINGH; DAMLE; CHAWLA, 2011; TOIVIAINEN et al., 2015). No que se refere aos efeitos no biofilme bucal,

Haukioja et al. (2006) demonstraram que *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* pode sobreviver na saliva e se ligar à hidroxiapatita coberta por *F. nucleatum*. Esse achado pode ser um passo crítico para o sucesso da terapia periodontal, já que essa co-agregação pode reduzir o número de periodontopatógenos no biofilme oral. De fato, a mais importante função do *F. nucleatum* na biomassa bacteriana subgengival parece ser sua capacidade de facilitar a co-agregação de outros patógenos periodontais, como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* (PERIASAMY; KOLENBRANDER, 2009).

Os efeitos da cepa *B. lactis* HN019 (HN019) foi investigado em camundongos saudáveis, tendo sido demonstrado que a suplementação dietética com essa bactéria probiótica é capaz de melhorar a resposta imune inata e adquirida (GILLS et al., 2000). Os achados de estudos realizados em humanos tratados com HN019 corroboram esses resultados imunológicos (ARUNACHALAM; GILL; CHANDRA, 2000; CHIANG et al., 2000; GILLS et al., 2001). O consumo de HN019 levou a uma melhora da imunidade celular em adultos e idosos saudáveis (ARUNACHALAM; GILL; CHANDRA, 2000; CHIANG et al., 2000; GILLS et al., 2001).

O potencial da cepa HN019 na PE foi primeiramente estudado por Oliveira e colaboradores (2017), que a administraram topicamente em ratos com PE induzida por ligaduras. Nos animais tratados, os autores observaram significativa redução nas perdas óssea alveolar e de inserção do tecido conjuntivo, aumento da expressão de beta defensinas (BDs) nos tecidos periodontais, níveis aumentados de citocinas anti-inflamatórias e mudanças na proporção de complexos microbianos presentes no biofilme oral, favorecendo espécies bacterianas compatíveis com saúde (OLIVEIRA et al., 2017). Em outro estudo, foram avaliados os efeitos da administração oral de HN019 em associação à RAR em ratos com PE induzida por ligadura (RICOLDI et al., 2017). Verificou-se que o probiótico potencializou os efeitos da terapia mecânica, pois influenciou positivamente o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e quimioatraente de neutrófilos induzido por anti-citocina - CINC) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β 1), reduziu o número de osteoclastos, as perdas óssea alveolar e de inserção, a inflamação local e ainda favoreceu o reparo tecidual (RICOLDI et al., 2017). Recentemente, essa cepa foi avaliada como adjuvante à RAR em um estudo clínico controlado randomizado, em pacientes com periodontite crônica (INVERNICI, 2018). O tratamento com a cepa probiótica, administrada oralmente, promoveu redução de profundidade sondagem e ganho de inserção clínica significativamente maiores que o grupo controle (RAR + placebo), bem como levou a menos sangramento à sondagem, menor índice de placa e maior redução de bolsas periodontais moderadas e profundas. A terapia também

reduziu espécies microbianas dos complexos vermelho e laranja e promoveu aumento nas proporções de espécies microbianas do complexo azul. Em relação aos parâmetros imunológicos, a terapia probiótica levou à diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-8, promoveu aumento de IL-10 e levou à maior expressão de beta-defensina 3 (INVERNICI, 2018).

Na AR, os probióticos emergem como uma terapia em potencial, na tentativa de reduzir os riscos de desenvolvimento da doença, bem como de tratá-la uma vez diagnosticada (SCHORPION; KOLASINKI, 2017). Vários estudos em animais e em humanos tem sido realizados para investigar o impacto da terapia com probióticos na AR (AMDEKAR et al., 2013; ALIPOUR et al., 2014; VITETTA et al., 2013).

Amdekar e colaboradores (2011, 2013) demonstraram que a administração de *Lactobacillus casei* reduziu o dano inflamatório articular relacionado à artrite induzida por colágeno em ratos. Em outro estudo utilizando o modelo de artrite experimental induzida pelo CFA em ratos, foi verificado que a administração, tanto profilática como curativa, do *Lactobacillus acidophilus* reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias e protegeu órgãos, como rins, fígado e articulações (AMDEKAR et al., 2014).

Em um estudo recente, Yamashita e colaboradores (2017) avaliaram os efeitos da bactéria probiótica *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (SBT2171), administrada intraperitoneal e oralmente, em camundongos portadores de AR induzida por CIA. A SBT2171, administrada intraperitonealmente, reduziu a incidência e a severidade dos sintomas clínicos da AR, bem como diminuiu a perda de peso corporal e a espessura da pata traseira dos animais. A terapia intraperitoneal também diminuiu os níveis de anticorpos anti-colágeno tipo II, IL-6 e TNF- α no soro. Quando a SBT2171 foi administrada oralmente, também foi observada supressão significativa dos sintomas da AR, como a perda de peso corporal e o aumento da espessura das patas traseiras. Os autores concluíram que a administração dessa terapia probiótica pode ser útil como um efeito preventivo em pacientes com doenças autoimunes, incluindo a AR (YAMASHITA et al., 2017). Outros autores também observaram que a terapia com *Lactobacillus plantarum* levou à diminuição de mediadores inflamatórios e sinais relacionados à AR, como níveis de proteína C-reativa, FR, TNF- α e velocidade de sedimentação de eritrócitos (VHS), em ratos com AR via CIA. A terapia também melhorou parâmetros relacionados ao peso corporal, volume da pata, índice artrítico, rigidez articular, marcha e mobilidade desses animais (GOHIL et al., 2018).

Outro achado interessante em animais é que tratamentos utilizando dietas prebiótica, probiótica e simbiótica, realizados antes e após a indução da AR em ratos, foram capazes de

inibir significativamente a produção de TNF- α , além de diminuir níveis de fibrinogênio, glicoproteínas alfa 1-ácida e amiloide A no plasma. Os efeitos dessas terapias foram similares aos efeitos anti-inflamatórios produzidos pelo uso da indometacina neste estudo (ABHARI et al., 2016).

Considerando estudos em humanos, o primeiro a evidenciar um efeito positivo da terapia probiótica na AR foi executado por Peltonen e colaboradores (1997). Neste estudo, pacientes com AR que consumiram uma dieta vegetariana rica em lactobacilos por 1 mês apresentaram melhora na atividade da AR, o que foi atribuído a mudanças observadas em sua microbiota fecal (PELTONEN et al., 1997). No estudo de Hatakka e colaboradores, a cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG foi administrada para pacientes com AR, e também foi sugerido que existe uma relação entre a manipulação da microbiota intestinal e o nível de atividade da AR (HATAKKA et al., 2003).

Em um estudo piloto, pacientes portadores de AR que receberam tratamento com *Bacillus coagulans* apresentaram melhoras significativas em parâmetros relacionados à dor, mobilidade e níveis de proteína C-reativa (MANDEL; EICHAS; HOLMES, 2010). Estudos clínicos duplo-cegos randomizados foram realizados para analisar os efeitos da suplementação com *Lactobacillus casei* na atividade inflamatória em pacientes com AR. Concluiu-se que a suplementação probiótica pode ser uma terapia adjuvante nesses pacientes, causando alívio dos sintomas, redução da atividade da doença, diminuição da expressão de algumas citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-12) e aumento da expressão da citocina regulatória IL-10 (ALIPOUR et al., 2014; VAGHEF-MEHRABANY et al., 2014).

A combinação de probióticos também parece ser uma estratégia potencial como terapia de suplementação adicional ao uso de medicamentos na AR. Combinando as cepas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium bifidum* durante 8 semanas, Zamani e colaboradores (2016) observaram melhoras significativas no índice DAS-28, níveis séricos de insulina, modelo de avaliação da homeostase - função de células B (HOMA B), níveis séricos de proteína C-reativa e níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade em pacientes com AR, quando comparados aos indivíduos que receberam apenas placebo.

Outro estudo, em que uma dieta restritiva foi associada à suplementação com *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus rhamnosus*, demonstrou que a terapia probiótica apresenta baixo risco e parece promover efeitos benéficos na saúde de pacientes portadores de artrite inflamatória (MÄKELÄ; MÄKILÄ; PELTOMAA, 2017). A maioria dos pacientes (88,6%) relatou necessidade diminuída de medicações convencionais e melhora na saúde

geral. Além disso, 83,5% dos pacientes relataram melhora moderada ou significativa em seus sintomas em articulações.

Por outro lado, um estudo em que a suplementação probiótica com *Lactobacillus casei* foi administrada em pacientes com AR não demonstrou efeitos significativos da terapia no estresse oxidativo dos pacientes (VAGHEF-MEHRABANY et al., 2016). Em um estudo clínico, aleatorizado e duplo-cego, Pineda e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos da administração de *L. rhamnosus* e *L. reuteri* na atividade da AR. Ao final do estudo, em 90 dias, os autores observaram que, embora o tratamento com probióticos tenha sido bem tolerado e levado à diminuição da produção de diversas citocinas inflamatórias sistemicamente, não foram observadas melhoras clínicas significativas nos pacientes portadores de AR (PINEDA et al., 2011). De fato, recentemente, uma revisão sistemática com meta-análise concluiu que o tratamento com probióticos em pacientes com AR levou à diminuição nos níveis de IL-6, mas que seus efeitos clínicos são menos claros (MOHAMMED et al., 2017).

Dessa forma, embora existam muitas evidências positivas em relação ao uso de probióticos como adjuvantes no tratamento da AR, esses dados ainda precisam de confirmação, pois muitos estudos clínicos apresentaram pequeno número de participantes e curta duração (SCHORPION; KOLASINSKI, 2017; AQAEINEZHAD RUDBANE et al., 2018). Sendo assim, novos estudos deverão ser realizados para fornecer evidências suficientes para assegurar a eficácia dos probióticos na prevenção e/ou tratamento da AR. De qualquer forma, o interesse crescente, em todo o mundo, no papel protetor de micro-organismos que habitam o corpo humano certamente irá direcionar a busca por novas formas de manipular o microbioma humano, de forma a promover benefícios à saúde.

Com base no conhecimento atual fornecido pela literatura, os probióticos parecem ser uma terapia adjuvante promissora no tratamento da periodontite e de doenças autoimunes, como a AR (SCHORPION; KOLASINSKI, 2017). Como há evidências demonstrando uma estreita relação entre PE e AR, terapias direcionadas para controle dos fatores relacionados à etiopatogênese de ambas podem ser úteis no manejo das mesmas. É importante ressaltar que a terapia probiótica é um método natural, não-invasivo e pode evitar problemas relacionados a tratamentos farmacológicos, como o uso de antibióticos, o que a torna particularmente atraente (NISSEN et al., 2014). Nesse contexto, não são conhecidos estudos que tenham avaliado os efeitos da administração de probióticos na associação PE-AR.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

- ✓ Avaliar os efeitos da administração do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 na PE induzida por ligadura em ratos portadores de AR experimental.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a perda óssea alveolar por meio de análises com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-TC);
- ✓ Analisar a perda de inserção conjuntiva interproximal e as características histopatológicas dos tecidos periodontais, por meio de análise histomorfométrica;
- ✓ Investigar a expressão das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10 nos tecidos gengivais e de AAPCs no soro sanguíneo, por meio de ensaios imunoenzimáticos;
- ✓ Avaliar a proporção de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias anaeróbias em relação a bactérias aeróbias presentes nos biofilmes dos animais com periodontite experimental, tratados ou não com HN019.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Apreciação ética

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram conduzidos após a análise e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP) (Protocolo 2016.1.441.58.6.). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais, bem como o número de animais utilizados, em conformidade com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), respeitando-se os princípios éticos da experimentação em animais, as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos (Lei 11.794/2008), a Declaração Universal dos Direitos dos Animais da UNESCO (Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura) e normas internacionais (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Academy of Science, EUA, 1996).

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 para assegurar poder estatístico de 80% na análise estatística dos dados foi calculado para reconhecer diferenças de 20% entre os grupos, considerando as mudanças na média do Volume Ósseo (VO) da região de bifurcação do primeiro molar inferior (1ºMI) como variável primária de resultado, $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$, intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) e desvio-padrão (σ) de 17,5% (RICOLDI et al., 2017). 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 como resultado um número mínimo necessário de 6 animais para este estudo. Considerando possíveis perdas relacionadas à sensibilidade dos animais aos protocolos de indução de artrite reumatoide e periodontite experimentais, 8 animais foram incluídos em cada grupo experimental.

3.3 Modelo experimental

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar) machos, com idade entre 2 e 3 meses, pesando entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério da FORP-USP. Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno autoclaváveis, sob temperatura variando de 22 a 24°C, com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Os animais foram submetidos

a um período de 7 dias de aclimação com o ambiente e com a equipe de execução do projeto. Durante a realização do estudo, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Antes do início do estudo, os animais foram identificados por um código numérico e posteriormente, de acordo com uma tabela numérica gerada com uso de um *software* em computador, cada rato foi alocado em um dos seguintes grupos (n=8):

- Grupo AR: animais com AR induzida por colágeno, sem PE e não tratados com PROB;
- Grupo AR/PROB: animais com AR induzida por colágeno, sem PE e tratados com PROB;
- Grupo AR/PE: animais com AR induzida por colágeno, com PE e não tratados com PROB;
- Grupo AR/PE/PROB: animais com AR induzida por colágeno, com PE e tratados com PROB.

A sequência de alocação foi mantida oculta para todos os integrantes da equipe do estudo. Todas as análises foram realizadas por examinadores calibrados e cegos aos grupos experimentais do estudo.

3.4 Administração do agente probiótico

Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 liofilizado (HOWARU TM Bifido, E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE, EUA) foi cultivado a 37°C por 48 horas em meio MRS Ágar (Oxoid Australia Pty Ltd, Adelaide, Austrália) sob condição de anaerobiose (BD GasPak EZ TM). As colônias obtidas foram raspadas e depositadas em tubos tipo Falcon® e lavadas três vezes por centrifugação a 2000 g por 10 minutos com solução salina fosfatada tamponizada de Dulbecco (PBS), pH 7,0 (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA). A seguir, o *pellet* foi ressuspensionado em PBS e mantido sob refrigeração a 4°C como suspensão estoque do probiótico.

A suspensão do probiótico assim obtidas foram padronizadas por meio da determinação da densidade óptica (D.O) em espectrofotômetro (Micronal AJX-1000, São Paulo, SP, Brasil) no comprimento de onda de 625 nm. Aliquotas dessa suspensão foram diluídas pela técnica da diluição decimal seriada, e semeadas em duplicata em placas de MRS Ágar. Após a incubação em anaerobiose por 48 horas a 37°C, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Dessa forma, a D.O de 2,9-3,0 correspondeu ao inóculo padronizado de $1,5 \times 10^{11}$ UFC/mL. A fim de assegurar a viabilidade

do agente probiótico administrado aos animais, as suspensões estoque foram preparadas a cada 48 horas.

Nos grupos PROB, foi adicionada a suspensão estoque do *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 a cada 400 mL de água deionizada oferecida aos animais, de forma a atingir a dosagem de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL. Com o propósito de garantir a viabilidade bacteriana ao longo do estudo, a água com o probiótico HN019 oferecida aos animais era renovada a cada 24 horas. O período de utilização do probiótico foi de 39 dias, a partir do dia 0 (*baseline*). Para os grupos AR/PROB e AR/PE/PROB, a suplementação probiótica foi iniciada 7 dias antes da primeira indução de AR. No grupo AR/PE/PROB, a suplementação probiótica foi iniciada 28 dias antes da indução de periodontite com ligadura (Figura 1).

Figura 1 - Delineamento experimental.

3.5 Indução da artrite reumatoide

Para a indução da AR, foram realizadas duas imunizações com colágeno bovino tipo II (CII) (C9879-1g; Sigma-Aldrich, São Paulo, São Paulo, Brasil) emulsionado em IFA (F5506 – 10 mL; Sigma-Aldrich, São Paulo, São Paulo, Brasil) e uma terceira imunização com CFA (F5881 – 10 mL; Sigma-Aldrich, São Paulo, São Paulo, Brasil). A primeira dose de CII associado ao IFA foi administrada no 7º dia do experimento, consistindo em um total de 0,1 mL de emulsão, injetada em múltiplos locais na base da cauda dos animais subcutaneamente. A emulsão consistiu de 300 µg de CII dissolvido a 4 mg/mL em ácido acético a 0,05 M com agitação suave *overnight* a 4°C emulsionado em IFA. O IFA era adicionado lentamente em um volume igual de solução de CII. No 14º dia do experimento, após 7 dias da primeira sensibilização, os animais receberam uma injeção de reforço contendo 0,1 mL de emulsão (100 µg de CII dissolvido a 4 mg/mL em ácido acético a 0,05 M com agitação suave *overnight* a 4°C emulsionado em IFA, também injetada em múltiplos locais na

base da cauda dos animais subcutaneamente. A terceira imunização foi realizada no 21º dia do experimento, consistindo em duas injeções de CFA (1 mg/mL), sendo uma injeção aplicada na superfície plantar da pata direita traseira (0,1 mL) e a outra injeção aplicada intra-articularmente no joelho direito do animal (0,1 mL) (CORRÊA et al., 2017).

3.5.1 Avaliação da indução de AR

O desenvolvimento da AR foi observado por meio de escores clínicos visuais (Índice de Atividade de Doença) e mensuração do edema de pata. As avaliações foram realizadas semanalmente (a partir do *baseline* do experimento), sempre anteriormente às intervenções a serem realizadas em cada dia.

O estabelecimento da AR também foi avaliado por meio de análise imunoenzimática de AAPCs, presentes no soro sanguíneo no dia da eutanásia dos animais. Para avaliação da AAPCs, utilizou-se como referência um grupo de animais controle (grupo C), em que não houve administração de probiótico ou intervenções para indução de AR ou de PE.

3.5.1.1 Índice de Atividade de Doença (IAD)

Para avaliação do IAD, foram determinados escores (0-3) para a avaliação visual das patas traseiras do animal, com base nos seguintes parâmetros (LOHMAN et al., 2012):

- Inflamação: 0- sem vermelhidão/edema/sintomas artríticos; 1- leve vermelhidão e edema; 2- os sintomas de artrite começam a aparecer (apertamento dos dedos do pé), vermelhidão e edema moderados; 3- edema grave, vermelhidão e sintomas de artrite;
- Mobilidade: 0- sem mancar, sustentação completa de peso pelas patas traseiras; 1- leve mancar, mobilidade reduzida; 2- redução ou nenhuma sustentação de peso em uma das patas traseiras, mobilidade reduzida; 3- nenhuma sustentação de peso em ambas as patas traseiras, pouca mobilidade;
- Desconforto: 0- sem vocalização, comportamento normal; 1- somente vocalização suave; 2- aumento das vocalizações e leve recuo durante o manuseio; 3- vocalização espontânea durante o movimento.

O IAD foi expresso como a soma dos escores dos três parâmetros citados, em ambas as patas traseiras, o que poderia atingir o valor máximo de 18 pontos (adaptado de LOHMAN et al., 2012).

3.5.1.2 Mensuração do edema de pata

A mensuração do edema das patas de cada animal foi realizada medindo-se a espessura de ambas as patas traseiras por meio de micrômetro externo analógico (103-137 Mitutoyo®, Suzano, São Paulo, Brasil) (NOWAK et al., 2012). Foi realizada uma média das medidas das duas patas traseiras de cada animal, expressas em mm (Figura 2).

Figura 2 - Mensuração do edema de pata.

3.5.1.3 Análise imunoenzimática de anticorpos antiproteínas citrulinadas (AAPCs)

As amostras de soro sanguíneo, obtidas durante a eutanásia dos animais, foram centrifugadas a 3000g durante 10 minutos. Posteriormente, foram realizadas alíquotas de soro, estocadas em -80°C, para análise de AAPCs. A concentração de AAPCs no soro foi quantificada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kit comercialmente disponível (ELABSCIENCE E-EL-R1431 Rat ACCPA, MyBiosource, San Diego, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram analisadas por um leitor espectrofotômetro (TP-Reader, ThermoPlate®, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda 450 nm e os resultados foram expressos em UI por mililitro.

3.6 Indução da periodontite experimental

No 28º dia do experimento, os animais dos grupos AR/PE e AR/PE/PROB foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal com soluções de cloridrato de xilazina a 2% (2 mg/mL) (Rompum® - Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e cloridrato de

quetamina a 10% (10 mg/mL) (Dopalen® - Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil) nas dosagens de 10 mg/kg e 80 mg/kg, respectivamente. Após os animais atingirem o estado de anestesia geral, os mesmos foram posicionados em mesa operatória que permitiu a manutenção da abertura bucal, facilitando o acesso aos dentes posteriores da mandíbula. Com o auxílio de porta agulha tipo castroviejo (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil) e sonda exploradora odontopediátrica (Golgran, São Paulo, SP, Brasil), foi colocado um fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores (1^{os}MI) esquerdo e direito de cada animal (Figura 3). A ligadura foi mantida na área cervical dos 1^{os}MI dos animais dos grupos com PE durante 11 dias (LISBOA et al., 2015). A presença das ligaduras nos animais foi verificada periodicamente.

Figura 3 - (A) Animal posicionado para a colocação das ligaduras; **(B)** Fio de seda em posição para indução de periodontite no 1^o molar inferior. Foto cedida por Oliveira (2016).

3.7 Eutanásia e coleta de materiais para análises

Os animais foram submetidos à eutanásia 39 dias após o início do experimento. Primeiramente, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal, conforme descrito previamente. Então foi realizada coleta de sangue por meio de punção cardíaca para a realização de análise imunoenzimática para AAPCs. A eutanásia foi realizada pela administração de uma dose letal (150 mg/kg) de tiopentato de sódio (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

Após a eutanásia, foram coletadas amostras de biofilme bacteriano presentes juntamente com as ligaduras posicionadas ao redor dos 1^{os}MI dos grupos AR/PE e AR/PE/PROB, para realização das análises microbiológicas. Com auxílio de bisturi estéril, biópsias gengivais foram removidas das regiões vestibular e lingual dos 1^{os}MI direitos de cada animal, para realização de imunoenaios enzimáticos. As hemimandíbulas direitas e esquerdas

foram dissecadas e coletadas para análises por meio de microtomografias computadorizadas e histomorfométricas, respectivamente.

3.8 Análises por meio de microtomografias computadorizadas por transmissão de raios X (micro-TC)

Espécimes não desmineralizados (hemimandíbulas direitas) foram armazenados em solução de formol tamponado até o momento do escaneamento por um sistema de micro-TC de feixe cônico (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raios X foi operado a um potencial de aceleração de 60 kV, com corrente de 165 μ A e tempo de exposição de 650 ms por projeção. As imagens foram produzidas com um tamanho de voxel de 6x6x6 μ m (OLIVEIRA et al., 2017).

Usando um software apropriado (Data Viewer®, versão 1.5.0, Bruker, Kontich, Bélgica), os modelos tridimensionais gerados foram rotacionados até atingirem posições padrão de análise, de acordo com os seguintes critérios: (1) no plano transaxial, o 1º MI foi posicionado verticalmente, (2) no plano coronal, o osso mandibular foi orientado verticalmente, com a raiz mesial do 1º MI posicionada na parte mais superior da imagem e (3) no plano sagital, a superfície oclusal do 1º MI foi posicionada horizontalmente. Mensurações lineares foram realizadas em quatro sítios: vestibular, lingual, interproximal e bifurcação. Para as faces vestibular, lingual e interproximal, foram medidas distâncias lineares (μ m) entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) (LISBOA et al., 2015). Na região de bifurcação, foi mensurada a distância (μ m) entre o teto da bifurcação e a COA inter-radicular. Essa distância foi medida em três pontos diferentes da região de bifurcação: área mais mesial, centro e área mais distal da região de bifurcação. Uma média dessas três medidas foi realizada para obter a medida linear final da área de bifurcação. A soma das quatro medidas lineares (vestibular, lingual, interproximal e bifurcação) foi realizada para obter o valor do nível ósseo alveolar (NOA) de cada animal (Figura 4) (OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 4 - Medidas lineares das distâncias entre junção cimento-esmalte (JCE) e crista óssea alveolar (COA) (A, B, C) ou teto da furca e crista óssea alveolar (COA) inter-radicular (D), realizadas nos cortes microtomográficos visualizados no eixo transaxial (A -lingual; B -vestibular; C - interproximal) e no eixo sagital (D - bifurcação).

Para a análise volumétrica, foi utilizado o *software* CT-Analyser® (versão 1.13.5.1+, Bruker, Kontich, Bélgica) para avaliação das imagens da região de bifurcação do 1º MI. As imagens foram visualizadas no eixo coronal e alguns parâmetros foram determinados para a escolha dos intervalos de cortes a serem analisados: utilizou-se como corte microtomográfico inicial aquele em que as quatro raízes do 1º MI estavam completamente separadas, e o corte microtomográfico final foi aquele em que não era mais possível visualizar o osso inter-radicular na região de bifurcação do 1º MI. A figura geométrica escolhida para representar a região de interesse a ser analisada foi um retângulo. Essa forma geométrica era ajustada por interpolação à área a ser medida e assim era determinado o volume de interesse (VOI) (Figura 5). Posteriormente, a binarização das imagens era realizada, visando a separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (limite inferior - 65 e limite superior - 255; *grayscale threshold* 0-255). O mesmo padrão de binarização foi usado para todos os espécimes. Por meio da análise volumétrica, determinou-se o volume ósseo (VO), definido como o percentual do VOI preenchido com tecido ósseo (OLIVEIRA et al., 2017).

Foram realizadas reconstruções renderizadas das seções microtomográficas para todos os grupos utilizando *software* adequado (CTVox®, versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica).

Figura 5 - Corte microtomográfico visualizado no eixo coronal, para realização de análise microtomográfica volumétrica. (A) A região de interesse analisada (ROI) foi delimitada por um retângulo que tangenciava as quatro raízes do primeiro molar inferior. (B) Para separação das estruturas ósseas e dentárias, as imagens foram binarizadas, por meio de uma escala de níveis de cinza.

3.9 Análise histomorfométrica

As hemimandíbulas esquerdas foram fixadas em formol neutro a 10% durante 48 horas e, posteriormente, descalcificadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 4% durante aproximadamente 90 dias. Após esse período, os espécimes foram desidratados em álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Secções seriadas de parafina (4 µm de espessura) foram obtidas na direção méso-distal e dispostas em lâminas histológicas. Dois cortes de cada espécime foram selecionados e corados por Hematoxilina e Eosina (H&E).

3.9.1 Análise histopatológica

Com auxílio de microscopia de luz (DFC295, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), as características histopatológicas dos tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º MI foram analisadas qualitativamente. Foram observadas as seguintes

características: intensidade e extensão do infiltrado inflamatório local, reabsorção externa da raiz (cimento e dentina), reabsorção do osso alveolar, padrão do tecido conjuntivo e padrão do osso alveolar (OLIVEIRA et al., 2017).

3.9.2 Análise histométrica

Para realização da análise histométrica, imagens provenientes dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz. As imagens dos cortes selecionados foram analisadas por meio de um sistema de avaliação de imagens computadorizado (Image J, versão 1.31p, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Na raiz distal do 1º MI, foram realizadas medidas lineares entre a JCE e a inserção conjuntiva (IC), obtendo-se o nível de inserção conjuntiva (NIC) (Figura 6). A partir da mensuração do NIC em dois cortes histológicos de cada animal do estudo, foi realizada uma média para obter o NIC de cada animal (OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 6 - Microfotografia ilustrativa dos tecidos periodontais da região interproximal entre 1º e 2º molares inferiores. A linha vermelha representa a medida linear (mm) referente ao nível de inserção conjuntiva (NIC). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x.

JCE = junção cemento-esmalte; IC = inserção conjuntiva; 1º MI = primeiro molar inferior; 2º MI = segundo molar inferior.

3.10 Análises imunoenzimáticas das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10

Os tecidos gengivais coletados foram armazenados em solução PBS associada a um coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Posteriormente, foram homogeneizados mecanicamente (Ultra-Stirrer ULTRA 80-II, Eikonal do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) em solução PBS associada a inibidores de proteases e homogeneizados.

Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi coletado e armazenado a -80°C (OLIVEIRA et al., 2017).

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

A quantificação dos níveis das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10 foi realizada utilizando-se kits disponíveis comercialmente (RECYTMAG 65K 06, – Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em um analisador MAGPIX® (Luminex® 100/200™ System, Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). A análise foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, a placa foi inicialmente umedecida com o *washing buffer* e, em seguida, a solução foi removida dos poços. *Beads* magnéticos revestidos com os anticorpos monoclonais para os quatro analitos (TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10) foram adicionados aos poços. As amostras e padrões (variando de 0,13 a 2000 pg/mL para cada analito) foram transferidas para os poços e incubadas *overnight* a 4°C. Os poços foram lavados novamente e uma combinação de anticorpos secundários biotinizados foi adicionada. Após a incubação por uma hora, adicionou-se aos poços a estreptavidina R- ficoeritrina e este conjunto foi incubado por mais 30 minutos. Após lavagem para a remoção de reagentes não ligados, foi acionado *sheat fluid* (Luminex, MiraiBio, Alameda, CA, EUA) aos poços e as placas analisadas pelo MAGPIX®, obtendo-se a intensidade de fluorescência média. Amostras abaixo do limite de detecção foram registradas como zero. Todas as amostras foram analisadas individualmente e os níveis de citocinas foram estimados a partir de uma curva polinomial de quinto grau utilizando-se o software xPONENT® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA) (OLIVEIRA et al., 2017).

Os valores de proteína total foram convertidos em pg/mL. Os níveis finais das citocinas analisadas (TNF- α , IL-6, IL-17 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. Em cada animal, foi calculada a média e o desvio-padrão dos níveis de TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10 (pg/mL) nos diferentes grupos.

3.11 Análise microbiológica

As amostras de biofilme coletadas juntamente com as ligaduras dos animais dos grupos AR/PE e AR/PE/PROB foram imediatamente depositadas em tubos esterilizados de microcentrífuga (AXYGEN®, cód. MCT-150-C, Union City, CA, EUA), contendo 150µL de 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, com pH 7,6 (solução TE). As amostras foram incubadas sob condições de aerobiose e anaerobiose durante 7 dias a 35°C para a contagem de UFC totais cultiváveis (MAEKAWA; HAJISHENGALLIS, 2014). A razão obtida pela divisão do número total de UFC de bactérias anaeróbias pelo número total de UFC de bactérias aeróbias foi calculada para os grupos AR/PE e AR/PE/PROB.

3.12 Análise estatística

O VO obtido na análise microtomográfica foi considerado a variável primária deste estudo. Os demais parâmetros microtomográficos (NOA), bem como os parâmetros histomorfométrico, imunoenzimáticos e microbiológicos foram considerados variáveis secundárias.

As análises foram realizadas com o *software* GraphPad (GraphPad Prism®, versão 7.0, GraphPad Software, Califórnia, EUA). O animal foi considerado como a unidade estatística ($n = 28$). O nível de significância de 5% foi adotado ($p < 0,05$). Os dados foram agrupados e apresentados como médias e desvios-padrão, no caso de serem variáveis contínuas, ou como medianas, desvios interquartílicos e valores máximos e mínimos, no caso de variáveis ordinais. O teste *Shapiro-Wilk* foi utilizado para avaliação da distribuição dos dados. Testes paramétricos foram aplicados para avaliar as diferenças intergrupos nos dados com distribuição normal, enquanto testes não paramétricos foram utilizados para os dados ordinais.

Para análise dos dados referentes à validação do modelo de indução de AR por meio do IAD, a significância das diferenças intergrupos (em cada tempo experimental) e intragrupos (ao longo do experimento) foi determinada pelo teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. Para os dados de edema de pata, a significância das diferenças intergrupos (em cada tempo experimental) e intragrupos (ao longo do experimento) foi determinada por ANOVA a dois critérios seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Para os níveis de AAPCs no soro, a significância das diferenças entre os grupos com AR e o grupo C (sem AR) foi verificada pelo Teste t. Considerando os grupos com AR, a significância das diferenças intergrupos foi determinada por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

A significância das diferenças entre os grupos para VO, NOA, NIC e níveis médios de TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10 foi determinada por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Para análise dos dados obtidos na avaliação microbiológica (razão obtida pela divisão do número total de UFC de bactérias anaeróbias pelo número total de UFC de bactérias aeróbias), as diferenças intergrupos (AR/PE e AR/PE/PROB) foram avaliadas pelo Teste t.

4. Resultados

4. RESULTADOS

No decorrer do estudo, quatro animais, sendo um de cada grupo experimental, foram à óbito. Dessa forma, o estudo foi concluído com 7 animais por grupo. Os demais animais toleraram bem todos os protocolos experimentais ao longo do estudo.

4.1 Avaliação da indução de AR

4.1.1 Índice de Atividade da Doença (IAD)

A Tabela 1 apresenta as medianas, variações interquartílicas e valores máximos e mínimos dos escores atribuídos aos grupos AR, AR/PROB AR/PE e AR/PROB referentes à avaliação do IAD. Nas comparações intragrupo, os grupos com AR apresentaram IAD significativamente maior nos dias 28 (21 dias após a 1ª indução de AR) e 35 (28 dias após a 1ª indução de AR) do experimento, quando comparados com o *baseline* ($p < 0,05$).

4.1.2 Mensuração do edema de pata

Os resultados da mensuração do edema de pata para os grupos AR, AR/PROB AR/PE e AR/PROB, incluindo médias e desvios-padrão, estão representados na Tabela 1. Nas comparações intragrupo, os grupos com AR apresentaram valores referentes ao edema de pata significativamente maiores nos dias 28 e 35 do experimento, quando comparados com o *baseline* ($p < 0,05$).

4.1.3 Análise imunoenzimática de AAPCs

As médias e desvios-padrão dos níveis de AAPCs no soro sanguíneo dos animais dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE, AR/PE/PROB e C estão apresentados na Tabela 1. Os grupos AR e AR/PE apresentaram níveis significativamente maiores de AAPCs quando comparados com o grupo C ($p < 0,05$). Os grupos AR e AR/PE também apresentaram maiores níveis de AAPCs do que o grupo AR/PROB ($p < 0,05$).

Tabela 1- Parâmetros para avaliação da indução de AR.

VARIÁVEL	PERÍODO	GRUPOS EXPERIMENTAIS				C
		AR	AR/PROB	AR/PE	AR/PE/PROB	
IAD (Escores) <i>Medianas-VI</i> ($V_{MA}-V_{MI}$)	<i>Baseline</i>	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	-
	7 dias	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	-
	14 dias	1-1 (3-0)	1-2 (0-2)	1-2 (0-2)	1- 2 (0-2)	-
	21 dias	5-2 (3-9)	3-1 (2-6)	5-2 (4-7)	5-3 (4-10)	-
	28 dias	12-4 (6-13) §	12-6 (6-13) §	8-5 (7-15) §	9-7 (5-16) §	-
	35 dias	10-2 (8-13) §	9-7 (6-14) §	9-3 (7-13) §	10-2 (7-13) §	-
Edema de Pata (mm) <i>Médias±DP</i>	<i>Baseline</i>	5.88±0.38	5.92±0.42	5.92±0.42	5.96±0.27	-
	7 dias	6.23±0.18	5.92±0.30	6.15±0.52	6.18±0.42	-
	14 dias	6.17±0.22	5.92±0.43	6.04±0.36	6.10±0.28	-
	21 dias	6.57±1.90	6.32±0.15	6.81±0.44	6.64±0.43	-
	28 dias	8.83±0.95†	8.17±0.91†	7.96±0.78†	7.84±0.72†	-
	35 dias	7.69±0.65†	7.76±0.64†	7.78±0.76†	7.45±0.42†	-
AAPCs (UI/mL) <i>Médias±DP</i>	39 dias	651.4±95.51*#	281.1±124.1	603.2±202*#	431.7±191.3	331.8±115.5

§ Diferença significativa quando comparado ao baseline (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0,05$).

† Diferença significativa quando comparado ao baseline (ANOVA a dois critérios, Tukey, $p < 0,05$).

* Diferença significativa quando comparado ao grupo C (Teste t, $p < 0,05$).

Diferença significativa quando comparado ao grupo AR/PROB (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

IAD = Índice de Atividade da Doença; VI = variação interquartilica; V_{MA} = valor máximo de escore atribuído; V_{MI} = valor mínimo de escore atribuído; DP = desvio-padrão; AAPCs = anticorpos antiproteínas citrulinadas.

4.2 Análise por micro-TC

As Figuras 7 e 8 apresentam as médias e desvios-padrão para NOA e VO, respectivamente, dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE e AR/PE/PROB. O grupo AR/PE/PROB apresentou menor NOA (Figura 7) e maior VO (Figura 8) quando comparado ao grupo AR/PE ($p < 0,05$). O grupo AR/PROB não apresentou diferenças significativas em relação a NOA e VO quando comparado ao grupo AR ($p > 0,05$; Figuras 7 e 8).

Na Figura 9, observam-se imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das seções microtomográficas das hemimandíbulas dos animais dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE e AR/PE/PROB.

Figura 7 - Médias e desvios-padrão do NOA (μm), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 8 - Médias e desvios-padrão do VO (%), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 9 - Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das seções microtomográficas das hemi-mandíbulas dos animais dos grupos AR (A, B), AR/PROB (C, D), AR/PE (E, F) e AR/PE/PROB (G, H). Imagens das superfícies vestibulares externas (A, C, E e G). Imagens das seções sagitais demonstrando superfícies internas (B, D, F e H). CTVox® (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do *pixel* = 7.96 μ m

4.3 Análise histomorfométrica

4.3.1 Análise histopatológica

As microfotografias que representam os cortes na região de bifurcação, utilizados na análise histopatológica dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE e AR/PE PROB, estão apresentadas na Figura 10.

No grupo AR, foi observada pouca quantidade de células inflamatórias, infiltrado inflamatório estendendo-se a todo tecido conjuntivo na região de bifurcação, poucas áreas de reabsorção radicular externa ativas, reabsorção óssea dentro dos padrões de normalidade, moderada quantidade de fibroblastos e de fibras colágenas, além de trabeculado ósseo com contorno irregular revestido por osteoblastos e osteoclastos ativos (Figura 10- A, B).

O grupo AR/PROB apresentou pouca quantidade de células inflamatórias, infiltrado inflamatório estendendo-se a uma parte do tecido conjuntivo na região de bifurcação, áreas de reabsorção radicular externa inativas, reabsorção óssea dentro dos padrões de normalidade, moderada quantidade de fibroblastos, grande quantidade de fibras colágenas e trabeculado ósseo com contorno irregular revestido por osteoblastos e osteoclastos ativos (Figura 10- C, D).

No grupo AR/PE, foi observada grande quantidade de células inflamatórias, infiltrado inflamatório estendendo-se a todo o tecido conjuntivo e ao tecido ósseo da região de bifurcação, muitas áreas de reabsorção radicular externa ativas, moderada quantidade de áreas de reabsorção óssea, pouca quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, presença de edema intersticial, áreas de osso necrótico e trabeculado ósseo com contorno irregular revestido por osteoclastos ativos (Figura 10- E, F).

O grupo AR/PE/PROB apresentou moderada quantidade de células inflamatórias, infiltrado inflamatório estendendo-se a uma parte do tecido conjuntivo da região de bifurcação, poucas áreas de reabsorção radicular externa ativas, pequena quantidade de áreas de reabsorção óssea, moderada quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, trabeculado ósseo com contorno irregular revestido com osteoblastos e osteoclastos ativos (Figura 10- G, H).

Figura 10 - Microfotografias dos tecidos periodontais na área de bifurcação dos 1^{os} MI. Grupos AR (A, B), AR/PROB (C, D), AR/PE (E, F) e AR/PE/PROB (G, H). Aumento original = 10x (A, C, E, G); 20x (B, D, F, H). Coloração: Hematoxilina e Eosina.

TF = teto da bifurcação; OA = osso alveolar; seta preta = vaso sanguíneo; cabeça de seta preta preenchida = cementoclasto; asterisco = fibras colágenas desconexas com a presença de edema intersticial; cabeça de seta não preenchida = fibras colágenas interpostas entre osso alveolar e cimento radicular.

4.3.2 Análise histométrica

A Figura 11 apresenta as médias e desvios-padrão do NIC dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE e AR/PE/PROB. O grupo AR/PE apresentou NIC significativamente maior quando comparado com os grupos AR e AR/PROB ($p < 0,05$). O grupo AR/PE/PROB apresentou uma tendência ($p = 0,0900$) de menor NIC quando comparado com o grupo AR/PE. As microfotografias que representam os cortes da região interproximal entre 1º MI e 2º MI, utilizados na análise histométrica para mensuração do NIC dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE e AR/PE/PROB, estão apresentadas na Figura 12.

Figura 11 - Médias e desvios-padrão do NIC (mm), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 12 - Microfotografias dos tecidos periodontais na área interproximal entre 1° MI e 2° MI. Grupos AR (A), AR/PROB (B), AR/PE (C) e AR/PE/PROB (D). Aumento original = 20x. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Seta preta = junção cimento-esmalte (JCE); seta branca = inserção conjuntiva (IC); MI = molar inferior.

4.4 Análises imunoenzimáticas das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10

As médias e desvios-padrão dos níveis de TNF- α nos tecidos gengivais dos animais dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE e AR/PE/PROB estão apresentados na Figura 13. O grupo AR/PE/PROB apresentou menores níveis de TNF- α quando comparado com o grupo AR/PE ($p < 0,05$).

Figura 13 - Médias e desvios-padrão dos níveis médios de TNF- α (pg/mL), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

A Figura 14 apresenta as médias e desvios-padrão dos níveis de IL-6 nos tecidos gengivais dos animais dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE e AR/PE/PROB. O grupo AR/PE/PROB apresentou níveis significativamente menores de IL-6 quando comparado ao grupo AR/PE ($p < 0,05$). Níveis maiores de IL-6 foram observados no grupo AR/PE, quando comparado com o grupo AR ($p < 0,05$).

Figura 14 - Médias e desvios-padrão dos níveis médios de IL-6 (pg/mL), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

A Figura 15 demonstra as médias e desvios-padrão dos níveis de IL-17 nos tecidos gengivais dos animais dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE e AR/PE/PROB. O grupo AR/PE/PROB apresentou maiores níveis de IL-17 quando comparado ao grupo AR/PE ($p < 0,05$).

Figura 15 - Médias e desvios-padrão dos níveis médios de IL-17 (pg/mL), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

A Figura 16 apresenta as médias e desvios-padrão dos níveis de IL-10 nos tecidos gengivais dos animais dos grupos AR, AR/PROB, AR/PE e AR/PE/PROB. O grupo AR/PE/PROB não apresentou diferença significativa em relação aos níveis de IL-10 quando comparado com o grupo AR/PE ($p > 0,05$). Níveis maiores de IL-10 foram observados no grupo AR, quando comparado com o grupo AR/PE ($p < 0,05$).

Figura 16 - Médias e desvios-padrão dos níveis médios de IL-10 (pg/mL), com comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.5 Avaliação microbiológica

As médias e desvios-padrão das taxas do número total de UFC de bactérias anaeróbias/aeróbias presentes, por mililitro, no biofilme das ligaduras dos grupos AR/PE e AR/PE/PROB são apresentadas na Figura 17. A taxa de bactérias anaeróbias/aeróbias foi significativamente maior no grupo AR/PE quando comparado com o grupo AR/PE/PROB ($p < 0,05$).

Figura 17 - Médias e desvios-padrão das taxas do número total de UFC de bactérias anaeróbias/aeróbias presentes no biofilme das ligaduras dos grupos AR/PE e AR/PE/PROB. * indica diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p < 0,05$).

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

No desenvolvimento da PE, sabe-se que a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, em resposta ao desafio bacteriano, apresenta papel fundamental, sendo responsável por grande parte da destruição tecidual presente (SANZ; QUIRYNEN, 2005; 2011; POTEMPA; MYDEL; KOZIEL, 2017). A etiopatogenia da AR ainda não foi totalmente elucidada, mas acredita-se no papel da susceptibilidade genética e de estímulos ambientais levando à alteração da função imune do hospedeiro, desencadeando a autoimunidade (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Existem evidências também sobre o papel da microbiota bacteriana na etiopatogenia da AR, incluindo bactérias orais (MOEN et al., 2006). Além disso, foi observado que a microbiota intestinal pode modular Th17 e, consequentemente, potencializar o desenvolvimento de AR (ABDOLLAHI-ROODSAZ et al., 2008; WU et al., 2010). De fato, sabe-se que a microbiota possui importante papel nas doenças autoimunes (de AQUINO et al., 2017). Dessa forma, observa-se que a AR e a PE apresentam similaridades em suas patogêneses (POTEMPA; MYDEL; KOZIEL, 2017), incluindo a característica de serem inflamações crônicas alimentadas por um conjunto similar de citocinas pró-inflamatórias (KOBAYASHI; YOSHIE, 2015; ZENOBIA; HAJISHENGALLIS, 2015). Ainda, diversos estudos tem demonstrado evidências de que a PE pode ter influência sobre o desenvolvimento da AR e vice-versa (MERCADO et al., 2000; de PABLO; DIETRICH; McALINDON, 2008; LUNDBERG et al., 2010; CHEN et al., 2013; MIKULS et al., 2012). Portanto, pode-se inferir que um tratamento com efeitos tanto sobre a resposta imuno-inflamatória como sobre a microbiota teria potencial aplicação em pacientes com PE e portadores de AR. Nesse contexto, os probióticos emergem como uma terapia que apresenta efeitos favoráveis tanto sobre o meio bacteriano como sobre o hospedeiro, modulando sua resposta imunoinflamatória (ROVENSKY et al., 2009; TEUGHEL; LOOZEN; QUIRYNEN, 2011).

Pelo conhecimento atual da literatura, este é o primeiro estudo a avaliar a ação de uma cepa probiótica na associação AR e PE. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (HN019) em ratos com PE induzida por ligadura e portadores de AR experimental.

O modelo animal utilizado para indução de AR no presente estudo, denominado artrite induzida por colágeno (CIA), é amplamente utilizado (MARCHESAN et al., 2013; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Ele apresenta semelhanças com a AR humana em relação a alguns parâmetros, dentre eles o infiltrado de células no tecido sinovial e destruições

óssea e de cartilagem (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Ao longo do presente estudo, os animais imunizados com colágeno tipo II e adjuvantes de Freund incompleto e completo desenvolveram sinais de AR bem distintos, avaliados por meio de sinais clínicos de atividade da doença (inflamação aumentada, mobilidade reduzida e desconforto aumentado) e edema de pata. Quando os níveis de AAPCs, um importante marcador de AR, foram avaliados no soro sanguíneo dos animais, observou-se um aumento significativo em relação a animais saudáveis (grupo controle).

O modelo utilizado para indução de PE no presente estudo, por meio do posicionamento de ligaduras na área cervical dos molares, é um dos mais comumente utilizados (BAKER; DIXON; ROOPENIAN, 2000; GRAVES et al., 2008; ABE; HAJISHENGALLIS, 2013.). Nesse modelo, a doença pode ser iniciada em um momento conhecido, apresentando uma sequência de eventos que culmina com a perda óssea alveolar em poucos dias em ratos (BEZERRA et al., 2000; GRAVES et al., 2008). No presente estudo, verificou-se que os animais com PE induzida por ligadura (grupo AR/PE) apresentaram maior perda óssea alveolar e maior perda de inserção conjuntiva quando comparados com os animais em que não foram posicionadas ligaduras (grupo AR).

No presente estudo, verificou-se que o uso de HN019 levou a menor perda óssea alveolar, o que foi evidenciado pelas avaliações microtomográficas de VO e NOA quando os grupos tratado (AR/PE/PROB) e não tratado (AR/PE) foram comparados. Esses resultados corroboram outros estudos pré-clínicos deste grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2017; RICOLDI et al., 2017), que também demonstraram redução significativa da perda óssea alveolar em animais com PE que receberam HN019, administrado local ou sistemicamente, quando comparados aos animais não tratados. De fato, várias cepas probióticas vem sendo utilizadas, com resultados positivos em relação à redução de perda óssea alveolar. Recentemente, a utilização de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), via administração local e também e via gavagem, reduziu significativamente a perda óssea periodontal em ratos com PE quando comparados a animais não tratados (GATEJ et al., 2018). Kobayashi e colaboradores (2015), administrando *Lactobacillus gasseri* via intubação oral em camundongos, encontraram redução significativa da perda óssea alveolar nos animais tratados. A administração local de *Lactobacillus brevis* em camundongos com PE também levou a uma redução significativa da perda óssea alveolar (MAEKAWA; HAJISHENGALLIS, 2014). Utilizando as cepas *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, Messoria e colaboradores (2013, 2016) observaram diminuição significativa da perda óssea

alveolar em ratos com PE experimental e tratados com os probióticos, associados ou não à RAR, quando comparados ao grupo de animais com PE não tratados com probióticos.

Em relação aos efeitos de probióticos sobre o nível de inserção periodontal, diversos estudos clínicos controlados tem demonstrado os benefícios do uso de probióticos como terapias adjuvantes à RAR na periodontite crônica (SHIMAUCHI et al., 2008; VIVEKANANDA; VANDAN; BHAT, 2010; SZKARADKIEWICZ; STOPA; KARPINSKI, 2014; INCE et al., 2015; TEUGHEL et al., 2013; TEKCE et al., 2015; MORALES et al., 2018). Nesse contexto, é interessante ressaltar o estudo de Invernici (2018), em que o HN019 foi administrado por via oral durante 4 semanas, imediatamente após início da terapia com RAR, em pacientes com PC, levando a um maior ganho de inserção clínica em comparação aos pacientes que receberam RAR e placebo. Alguns estudos pré-clínicos, que utilizaram os probióticos *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* associados ou não à RAR, demonstraram diminuição significativa da perda de inserção, avaliada histologicamente, em ratos com PE quando comparados aos ratos não tratados com probióticos (MESSORA et al., 2013; MESSORA et al., 2016). Outros estudos avaliaram os efeitos da administração da cepa HN019 nos níveis de inserção em animais com PE induzida por ligadura (OLIVEIRA et al., 2017; RICOLDI et al., 2017). Quando administrado local ou sistemicamente, associado ou não à RAR, o probiótico HN019 levou a uma redução significativa na perda de inserção histológica (OLIVEIRA et al., 2017; RICOLDI et al., 2017). Embora esses estudos tenham demonstrado o potencial do uso de probióticos, incluindo o HN019, no ganho de inserção periodontal, no presente estudo não houve diferença significativa no nível de inserção conjuntiva, avaliado histologicamente, entre os grupos tratado e não tratado com probiótico. Contudo, pela análise dos dados, pode-se verificar a presença de uma tendência em relação a uma diminuição do nível de inserção conjuntiva no grupo tratado com HN019 ($p = 0,0900$).

Na análise histopatológica do presente estudo, verificou-se que o grupo AR/PE/PROB apresentou menores extensão e severidade do processo inflamatório quando comparado ao grupo com PE não tratado. De fato, os efeitos de probióticos tem sido considerados vantajosos em relação a parâmetros inflamatórios periodontais histológicos em diversos estudos. Gatej e colaboradores (2018) utilizaram a cepa LGG tanto local como sistemicamente em camundongos com PE. Na análise histológica semi quantitativa, foi observado que o grupo de animais com PE não tratado apresentou escores relacionados à inflamação mais elevados, bem como mais células no infiltrado inflamatório e mais osteoclastos, quando comparados com os animais tratados com o probiótico (GATEJ et al., 2018). Em outro estudo, o uso de *Saccharomyces cerevisiae* favoreceu o reparo dos tecidos

periodontais de ratos com PE experimental (GARCIA et al., 2016). Nos animais tratados com o probiótico, observaram-se menor quantidade de células inflamatórias, maior número fibras colágenas e de vasos sanguíneos, menos áreas de reabsorção óssea, mais organização de tecido conjuntivo e posteriormente novo tecido ósseo nas áreas do septo radicular. Em camundongos com PE induzida pela inoculação com *P. gingivalis* e tratados com *Lactobacillus gasseri*, observaram-se melhoras em relação à desinserção e ao desarranjo do ligamento periodontal (KOBAYASHI et al., 2015). Efeitos positivos na redução da inflamação, da destruição periodontal e do número de células inflamatórias nos tecidos periodontais também foram reportados após a utilização dos probióticos *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* em ratos portadores de PE experimental, incluindo também ratos submetidos a estresse, associados ou não à RAR (MESSORA et al., 2013; FOUREAUX et al., 2014; MESSORA et al., 2016). Os achados histopatológicos do presente estudo corroboram resultados de estudos prévios com o HN019, administrado local ou sistemicamente, associado ou não à RAR, em ratos com PE experimental (OLIVEIRA et al., 2017; RICOLDI et al., 2017). O uso da cepa HN019 promoveu menos injúria aos epitélios sulcular e juncional na região interproximal entre 1º e 2º molares inferiores, bem como levou a menor extensão do infiltrado inflamatório (OLIVEIRA et al., 2017; RICOLDI et al., 2017).

Os efeitos da terapia probiótica observados no presente estudo podem ser explicados pelos mecanismos de ação antimicrobianos e anti-inflamatórios que os probióticos apresentam (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). Os probióticos podem atuar em uma ampla variedade de células para modular o sistema imunológico em direção a uma ação anti-inflamatória (TEUGHEL; LOOZEN; QUIRYNEN, 2011). Como exemplo, seus efeitos podem acontecer por meio do aumento da capacidade fagocitária de macrófagos (PERDIGÓN et al., 2002), regulação de receptores de fagocitose (PELTO et al., 1998), aumento da atividade de células natural killer (TAKEDA et al., 2006) e também pela modulação da imunidade adaptativa (LINK-AMSTER et al., 1994; BRAAT et al., 2004). Os efeitos microbiológicos dos probióticos incluem secreção de substâncias antimicrobianas, competição com outras microbiotas, incluindo patógenos potenciais, por bloqueio competitivo de sítios de adesão em superfícies epiteliais e mucosas, e inibição da invasão epitelial por micro-organismos, pela regulação da permeabilidade intestinal (SAAVEDRA et al., 2004; van NIEL, 2005). Na PE, os probióticos podem desencadear efeitos diretos sobre patógenos periodontais, influenciando seu crescimento, adesão e colonização (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). Além disso, bactérias probióticas podem produzir diversos componentes que agem como agentes antimicrobianos, tais como ácido lático, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e substâncias

inibitórias semelhantes a bacteriocinas (GILLOR; ETZION; RILEY, 2008; GORDON, 2009; OELSCHLAEGER, 2010). Alguns resultados prévios sobre os mecanismos de ação específicos da cepa HN019 também podem ajudar a elucidar os achados do presente estudo. O probiótico HN019 atua positivamente no sistema imune, podendo aumentar a atividade de linfócitos e a capacidade fagocitária de células mononucleares sanguíneas periféricas (GILL et al., 2001), bem como aumentar as proporções de células CD4⁺ auxiliares e CD25⁺ e a atividade tumoricida de células natural killer (GILL et al., 2001). Ademais, Oliveira e colaboradores (2017) observaram aumento na expressão de osteoprotegerina e BDs nos tecidos gengivais de ratos com PE que receberam administração de HN019, quando comparados aos animais com PE não tratados. Além disso, o potencial da cepa HN019 em influenciar positivamente a microbiota foi demonstrado *in vivo* (Oliveira e colaboradores 2017) e *in vitro* (dados não publicados). Foi demonstrado que o tratamento com HN019 levou a proporções menores de espécies compatíveis com bactérias anaeróbias Gram-negativas e proporções maiores de espécies compatíveis com saúde periodontal em animais com PE (OLIVEIRA et al., 2017). *In vitro*, observou-se que o HN019 apresentou efeitos antimicrobianos, inibindo o crescimento de periodontopatógenos como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* e *Prevotella intermedia* (dados não publicados).

Dentre as citocinas que desempenham um importante papel tanto na PE como na AR, encontram-se o TNF- α , a IL-6, a IL-17 e a IL-10 (Di BENEDETTO et al., 2013; KOBAYASHI; YOSHIE, 2015; ZENOBIA; HAJISHENGALLIS, 2015; MOHAMMED et al., 2017). O TNF- α desempenha um papel crítico na resposta do hospedeiro contra uma ampla gama de infecções bacterianas, o que contribui para as respostas imunológicas inata e adaptativa (PFIZENMAIER; WAJANT; GRELL, 1996; DINARELLO, 2000). Na PE, o TNF- α está intimamente relacionado à reação inflamatória, reabsorção óssea alveolar e perda de inserção do tecido conjuntivo (GRAVES; COCHRAN, 2003; GRAVES, 2008). Além disso, essa citocina pode exercer ações sinérgicas com a RANKL, levando à osteoclastogênese (Di BENEDETTO et al., 2013). Em pacientes com AR, sabe-se que níveis aumentados de TNF- α são preditivos de destruição óssea, por meio da indução de osteoclastogênese, e as terapias anti-TNF- α reduzem os sinais e sintomas da AR e retardam os seus danos teciduais estruturais (KIRKHAM et al., 2006; McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015; de AQUINO et al., 2017). Altos níveis intra-articulares de TNF- α foram encontrados em camundongos com PE e AR (de AQUINO et al., 2017). Além disso, a indução de AR por adjuvante em ratos e camundongos foi associada a perda óssea alveolar espontânea e a altos níveis de TNF- α (RAMAMURTHY et al., 2005; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2011). No

presente estudo, os níveis de TNF- α no tecido gengival dos animais do grupo AR/PE foram significativamente maiores quando comparados com os níveis presentes nos animais do grupo AR/PE/PROB, o que pode ser uma das explicações para a menor perda óssea observada nos animais tratados com o HN019. Esse resultado corrobora estudos prévios com outras cepas probióticas, como o de Maekawa e Hajishengallis (2014), que demonstrou menor expressão de TNF- α em animais com PE tratados com *Lactobacillus brevis* CD2, quando comparados com os animais que não receberam a terapia probiótica. Kobayashi e colaboradores (2015) também demonstraram que a utilização de *Lactobacillus gasseri* em camundongos com PE foi capaz de reduzir significativamente a expressão e a secreção de TNF- α nos tecidos gengivais e em células mononucleares gengivais, respectivamente, quando comparados aos animais com PE sem tratamento. Outro estudo, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* associada à RAR, demonstrou escores significativamente menores de imunomarcagem para TNF- α nos tecidos gengivais de ratos com PE (GARCIA et al., 2016). Em humanos, um estudo clínico controlado demonstrou diminuição significativa dos níveis de TNF- α no FCG de pacientes com PC tratados com RAR e administração do probiótico *Lactobacillus reuteri*, quando comparado com os níveis dos pacientes tratados com RAR e placebo (SZKARADKIEWICZ; STOPA; KARPINSKI, 2014). No estudo de Oliveira et al. (2017), em que o HN019 foi administrado localmente em ratos com PE experimental, a citocina TNF- α não foi avaliada. Contudo, verificou-se, por meio de análise imunohistoquímica, que o padrão de imunomarcagem para beta-defensina (BD) -3 foi significativamente maior no grupo com PE tratado com HN019 quando comparado com o grupo com PE não tratado. Esse resultado é relevante, pois o aumento da BD- 3 está diretamente relacionado à diminuição dos níveis de TNF- α nos tecidos periodontais (CUI et al., 2017).

A IL-6 pode atuar como um fator estimulador da osteoclastogênese, por meio da regulação indireta da expressão de RANKL (FENG et al., 2016). Patógenos periodontais, como a *P. gingivalis*, podem interagir com as células epiteliais gengivais e alterar a expressão de algumas citocinas, dentre elas a IL-6, e assim estimular a resposta inflamatória, com consequente destruição dos tecidos conjuntivo e ósseo (NJORGE et al., 1997; SANDROS et al., 2000; KESAVALU; CHANDRASEKAR; EBERSOLE, 2002). Na AR, a elevação de IL-6 está correlacionada com a destruição articular e progressão da doença (BRZUSTEWICZ; BRYL, 2015). Desse modo, AR e PE estão associadas a altos e persistentes níveis de IL-6 (BARTOLD; MARSHALL; HAYNES, 2005; McINNES; SCHETT, 2007; BRENNAN; McINNES, 2008; de PABLO et al., 2009; GARLET, 2010; GRAVES; LI; COCHRAN, 2011). Por meio de uma recente revisão sistemática com meta-análise, Mohamed e

colaboradores (2017) concluíram que o uso de probióticos leva a uma redução significativa de IL-6 em pacientes portadores de AR. No presente estudo, os níveis de IL-6 mostraram-se significativamente reduzidos nos tecidos gengivais dos animais do grupo AR/PE/PROB quando comparados com os animais não tratados (grupo AR/PE), achado que é compatível com a menor reabsorção óssea observada nos animais tratados. É interessante observar que o efeito de outros probióticos na diminuição de níveis de IL-6 já foi demonstrado em ratos normossistêmicos com PE experimental. Maekawa e Hajishengalis (2014) trataram ratos com PE por meio da administração da cepa *Lactobacillus brevis* CD2 e observaram uma expressão significativamente reduzida de IL-6 em seus tecidos gengivais. A terapia com *Lactobacillus gasseri* SBT2055 também levou a uma diminuição significativa na expressão de IL-6 em animais portadores de PE induzida pela administração oral de *P. gingivalis* (KOBAYASHI et al., 2015).

Altos níveis de IL-17 são encontrados no fluido crevicular de bolsas periodontais de pacientes com PC (VERNAL et al., 2005). Em pacientes com AR, a IL-17 é encontrada em níveis elevados na circulação e nas articulações inflamadas (McNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015). Essa citocina está relacionada com a sinalização e recrutamento de outras citocinas pró-inflamatórias e MMP, que são secretadas dentro do espaço articular (de AQUINO et al., 2017). O envolvimento da via de sinalização patológica Th17/IL-17 é um possível mecanismo de agravamento da AR pela infecção periodontal com *P. gingivalis*, como demonstrado em estudos em animais (MARCHESAN et al., 2013; de AQUINO et al., 2017). As células Th17 produzem uma resposta pró-inflamatória que conduz à erosão óssea, o que pode ser uma via patológica em ambas as doenças (POTEMPA; MYDEL; KOZIEL, 2017). Por outro lado, é interessante observar que os estudos em humanos que tem avaliado o bloqueio da IL-17 como tentativa terapêutica na AR não tem obtido resultados animadores (GENOVESE et al., 2013).

No presente estudo, foi observado aumento significativo nos níveis de IL-17 nos tecidos gengivais dos animais do grupo com PE tratado com HN019, quando comparados com os do grupo com PE não tratado. Diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, a administração do probiótico *Lactobacillus brevis* reduziu significativamente a expressão de IL-17 nos tecidos gengivais de camundongos com PE (MAEKAWA; HAJISHENGALIS, 2014). Ainda, um estudo clínico demonstrou redução dos níveis de IL-17 no FCG de pacientes com PC tratados com RAR e administração de *Lactobacillus reuteri*, quando comparados com pacientes tratados com RAR e placebo (SZKARADKIEWICZ; STOPA; KARPINSKI, 2014). Algumas hipóteses podem ser destacadas para explicar a

diferença dos resultados desses estudos com os do presente estudo. Uma delas é que a IL-17 pode ter um papel na mediação da imunidade inata protetora contra patógenos (ZENOBIA; HAJISHENGALLIS, 2015). Dessa forma, é possível que a IL-17 exerça papéis tanto protetores como destrutivos (YU et al., 2007; ESKAN et al., 2012). Outro achado interessante é que, quando a terapia de bloqueio de TNF- α foi administrada, em modelo de CIA e em humanos, levando a uma diminuição de TNF- α , ocorreu também um aumento na expressão de células Th17 e Th1, produtoras de IL-17 e IFN γ , respectivamente (NOTLEY et al., 2008). No presente estudo, também ocorreu uma diminuição nos níveis de TNF- α e um aumento nos níveis de IL-17 nos tecidos gengivais dos animais com PE tratados com probiótico, o que pode indicar uma ação protetora dessa citocina na inflamação periodontal, já que os animais tratados com HN019 apresentaram menos perda óssea e menos inflamação.

Na PE, a IL-10 pode agir como uma citocina anti-inflamatória, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias e estimulando a produção de autoanticorpos protetores (SUMER et al., et al 2007). A IL-10 pode diminuir a síntese de COX-2 (AMDEKAR et al., 2011), a qual possui um papel chave na inflamação da AR (KANG et al., 1996; AMIN et al., 1997). De fato, alguns estudos demonstraram que a administração dos probióticos *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* associado a *Bacillus licheniformis*, e até mesmo do HN019, associados à RAR, levou a um aumento dos níveis de IL-10 em ratos com PE experimental (GARCIA et al., 2016, MESSORA et al., 2016, RICOLDI et al., 2017). O tratamento probiótico com HN019 como adjuvante à RAR em pacientes com PC também promoveu um aumento na expressão de IL-10 em seus tecidos gengivais (INVERNICI, 2018). No presente estudo, embora não tenham sido encontradas diferenças significantes em relação aos níveis de IL-10 nos tecidos gengivais dos animais do grupo AR/PE/PROB quando comparados com os do grupo AR/PE, pode-se observar que houve uma tendência ($p = 0,08$) a maiores níveis de IL-10 no grupo tratado. Corroborando os achados do presente estudo, Oliveira e colaboradores (2017) não observaram diferenças significativas nos níveis de IL-10 nos tecidos gengivais de ratos com PE experimental tratados com HN019, quando comparados com os não tratados. Contudo, esses autores observaram uma menor razão de IL-1 β /IL-10 no grupo tratado com HN019 (OLIVEIRA et al., 2017).

Anticorpos antiproteínas citrulinadas (AAPCs) são altamente específicos para AR, estando presentes em mais de 90% dos pacientes, e estão relacionados a um aumento na progressão e na severidade de destruição da doença (KLARESKOG et al., 2008; SILVEIRA et al., 2007; SNIR et al., 2010). No presente estudo, os animais do grupo AR/PROB apresentaram redução significativa dos níveis de AAPCs quando comparados com os do

grupo AR. Pelo conhecimento que se tem da literatura, este é o primeiro estudo a demonstrar efeitos benéficos de uma cepa probiótica sobre o marcador AAPCs. A ação do HN019 sobre a redução dos níveis de AAPCs pode ser hipotetizada com base em sua possível ação na microbiota intestinal e também na formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs). Evidências crescentes sugerem uma associação entre a disbiose intestinal e doenças reumáticas (JETHAW; ABHRAM, 2016). Essa disbiose pode levar a alterações imunológicas e à quebra da auto tolerância a auto antígenos citrulinados (HORTA-BASS et al., 2017). Nesse aspecto, é possível que a terapia probiótica tenha agido modulando favoravelmente a microbiota intestinal nos animais portadores de AR. Outra fonte de citrulinização de proteínas seria a apoptose celular, necrose e formação de NETs excessivas, as quais ocorrem em condições de inflamação patológica (KOZIEL; MYDEL; POTEMPA, 2014). A ação de um probiótico, o *Lactobacillus rhamnosus*, na formação de NETs foi avaliada, utilizando neutrófilos derivados da medula óssea de camundongos e neutrófilos diferenciados de células mieloides humanas *in vitro* (VONG et al., 2014). Os autores observaram que *Lactobacillus rhamnosus* levou a uma redução significativa na formação de NETs. Dessa forma, pode ser hipotetizado que o HN019 também tenha agido sobre o processo inflamatório em geral e também na formação de NETs neste estudo, levando à redução dos níveis sistêmicos de AAPCs. Nesse contexto, é interessante ressaltar que o HN019 é considerado seguro para tratamento de doenças autoimunes (ZHOU; GIL, 2005). Embora a terapia probiótica tenha influenciado positivamente os níveis de AAPCs no presente estudo, ela não impactou clinicamente os sinais de AR dos animais, avaliados por meio do IAD e do edema de patas.

Quando os níveis de AAPCs foram avaliados em animais com PE, observou-se que não houve diferenças significativas entre o grupo tratado com HN019 (AR/PE/PROB) e o grupo não tratado (AR/PE). Contudo, é relevante mencionar que houve uma tendência ($p = 0,0793$) de redução dos níveis de AAPCs no grupo AR/PE/PROB, quando comparado com o grupo AR/PE. Ainda, o grupo AR/PE/PROB não apresentou diferença significativa nos níveis de AAPCs em relação ao grupo de animais saudáveis (grupo C). Sabe-se que a inflamação periodontal não permanece limitada à extensão dos tecidos periodontais, podendo ocorrer repercussões sistêmicas desse processo inflamatório (HASTURK; KANTARCI, 2015). Assim, é possível que, na presença de inflamação periodontal, disbiose oral, geração de AAPCs a partir de *P. gingivalis* (ROSENSTEIN et al., 2004), e também a produção de NETs em resposta a periodontopatógenos (HIRSCHFELD et al., 2015), a terapia probiótica, na frequência, dosagem e extensão em que foi administrada neste estudo, não tenha sido

suficiente para levar a uma repercussão sistêmica estatisticamente significativa nos níveis de AAPCs nos grupos com PE.

Sabe-se que o modelo de PE induzida por ligadura em ratos reproduz um perfil microbiano semelhante àquele encontrado na PE em pacientes (CORRÊA et al., 2017). Neste estudo, os animais do grupo AR/PE/PROB apresentaram uma redução significativa na razão de bactérias anaeróbias sobre aeróbias presentes no biofilme das ligaduras quando comparado aos animais do grupo AR/PE. Embora essa seja uma análise microbiológica inicial, esse efeito do HN019 é relevante, já que os periodontopatógenos são predominantemente micro-organismos anaeróbios (DARVEAU, 2010). Em 2007, um estudo clássico de prova de conceito, realizado por Teughels e colaboradores em cães, demonstrou menor tendência ao ressurgimento de bactérias anaeróbias e de pigmentação negra após o uso de espécies de *Streptococcus* associadas à RAR. Os autores avaliaram amostras de placa subgingival, cultivadas microbiologicamente, para realização da contagem de UFC/ml. Esses resultados corroboram os do presente estudo, indicando uma possível influência do HN019 sobre a microbiota localmente presente nos animais com PE. Outros estudos em animais, utilizando *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus gasseri*, também demonstraram uma diminuição nos níveis de bactérias anaeróbias em animais com PE (MAEKAWA; HAJISHENGALIS, 2014; KOBAYASHI et al., 2015). A ação microbiológica dos probióticos foi confirmada em diversos estudos clínicos, onde terapias com *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus reuteri* em pacientes com PE levaram à diminuição de periodontopatógenos, o que foi avaliado por meio de diferentes técnicas, como cultivo bacteriano, teste BANA e q-PCR (TSUBURA et al., 2009; VIVEKANANDA; VANDAN; BHAT, 2010; TEUGHEL et al., 2013; TEKCE et al., 2015).

Os achados microbiológicos da cepa HN019 neste estudo corroboram resultados prévios, onde essa terapia probiótica foi administrada em ratos com PE induzida por ligadura e também em pacientes, como adjuvante à RAR (RICOLDI et al. 2017, OLIVEIRA et al., 2017; INVERNICI, 2018). Quando o HN019 foi administrado sistemicamente em ratos com PE, observou-se, por meio de contagem de UFCs cultiváveis, uma razão significativamente maior de bactérias aeróbias sobre anaeróbias (RICOLDI et al., 2017). Oliveira e colaboradores (2017) administraram o HN019 topicamente em ratos com PE experimental e também demonstraram um efeito benéfico dessa cepa na modulação da microbiota subgingival. Por meio de *checkerboard DNA-DNA hybridization*, foram observadas proporções menores de espécies compatíveis com bactérias anaeróbias Gram-negativas e proporções maiores de espécies compatíveis com saúde periodontal nos animais tratados com HN019 (OLIVEIRA et al., 2017). Recentemente, um estudo clínico, controlado e aleatorizado demonstrou que, quando o HN019 foi administrado como adjuvante à RAR em pacientes com

PC, houve uma redução nas proporções de espécies microbianas dos complexos vermelho e laranja e um aumento nas proporções de espécies microbianas do complexo azul, compatíveis com saúde (INVERNICI, 2018).

É importante ressaltar que este estudo apresenta limitações inerentes de um estudo experimental em ratos. Assim, os presentes achados precisam ser corroborados por modelos de estudo mais avançados na escala filogenética e por estudos clínicos. Ainda, outras dosagens, frequência e formas de administração do HN019 precisam ser avaliadas na associação AR-PE, além da investigação de marcadores inflamatórios sistêmicos.

O presente estudo demonstrou efeitos benéficos da administração de *B. lactis* HN019 em ratos com PE induzida por ligadura e portadores de AR experimental, sendo possível que essa cepa tenha potencial para o manejo de pacientes que apresentem essa associação de doenças.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a administração do agente probiótico *B. lactis* HN019 promoveu um efeito protetor contra a destruição tecidual em ratos com AR e PD experimentais.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI-ROODSAZ, S. et al. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 1, p. 205-16, 2008.
- ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **J Immunol Methods**, v. 393, n. 1-2, p. 49-54, 2013.
- ABHARI, K. et al. The effects of orally administered *Bacillus coagulans* and inlin on prevention and progression of rheumatoid arthritis in rats. **Food Nutr Res**, v. 15, n. 60, p. 30876, 2016.
- AKITSU, A. et al. IL-1 receptor antagonist- deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2(+)V γ 6(+) $\gamma\delta$ T cells. **Nat Commun**, v. 6, n. 7464, doi:10.1038/ncomms 8464, 2015.
- ALBANDAR, J. M. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. **Dent Clin North Am**, v. 49, n. 3, p. 517-32, 2005.
- AIJEHANI, Y. A. Risk Factors Of Periodontal Disease: Review Of The Literature. **Int J Dent**, v. 2014, p. 1-9, 2014.
- ALIPOUR, B. et al. Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. **Int J Rheum Dis**, v. 17, n. 5, p. 519-527, 2014.
- Al-KATMA, M. K. et al. Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis. **J Clin Rhumatol**, v. 13, n. 3, p. 134-7, 2007.
- Al-SHAMMARI, K. F. Risk indicators for tooth loss due to periodontal disease. **J Periodontol**, v. 76, n. 11, p. 1910-8, 2005.
- ALLEN, E. M. et al. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.38, n. 10, p. 894-901, 2011.
- AMDEKAR, S. et al. *Lactobacillus casei* reduces the inflammatory joint damage associated with collagen-induced arthritis (CIA) by reducing the pro-inflammatory cytokines: *Lactobacillus casei*: COX-2 inhibitor. **J Clin Immunol**, v. 31, n. 2, p. 147-54, 2011.
- AMDEKAR, S. et al. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* regulate inflammatory pathway and improve antioxidant status in collagen-induced arthritic rats. **J Interferon Cytokine Res**, v.33, n.1, p. 1-8, 2013.
- AMDEKAR, S. et al. *Lactobacillus acidophilus* protected organs in experimental arthritis by regulating the pro-inflammatory cytokines. **Ind J Clin Biochem**, v. 29, n. 4, p. 471–478, 2014.
- AMIN, A. R. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage: influence of nitric oxide. **J Clin Invest**, v. 99, n. 6, p. 1231-7, 1997.

- AQAEINEZHAD RUDBANE, S. M. et al. The efficacy of probiotic supplementation in rheumatoid arthritis: a meta analysis of randomized, controlled trials. **Inflammopharmacology**, v. 26, n.1, p. 67-76, 2018.
- ARKEMA, E. V.; KARLSON, E. W.; COSTENBADER, K. H. A prospective study of periodontal disease and risk of rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 37, p. 1800–1804, 2010.
- ARUNACHALAM, K.; GILL, H. S.; CHANDRA, R. K. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacteriumlactis* (HN019). **Eur J Clin Nutr**, v. 54, n. 3, p. 263–267, 2000.
- ASQUITH, D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 8, p. 2040-4, 2009.
- ASTRY, B.; HARBERTS, E.; MOUDGIL, K. D. A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis. **J Interferon Cytokine Res**, v. 31, p. 927-940, 2011.
- AZIZI, G.; JADIDI-NIARAGH, F.; MIRSHAFIEY, A. Th17 Cells in immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. **Int J Reum Dis**, v.16, p. 243-253, 2013.
- BAKER, P. J.; DIXON, M.; ROOPENIAN, D. C. Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 10, p. 5864-8, 2000.
- BAL, M. V. et al. The effect of nonsurgical periodontal treatment on serum and saliva chitotriosidase activities in patients with periodontitis and coronary artery disease. **Ther Clin Risk Manag**, v. 30, n. 11, p. 53-58, 2014.
- BAHEKAR, A. A. et al. The prevalence and incidence of coronary herat disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. **Am Heart J**, v. 154, n. 5, p. 830-7, 2007.
- BANNATYNE, G. A.; WOHLMANN, A. S. Rheumatoid arthritis: its clinical history, etiology, and pathology. **Lancet**, v., n. 1, p.1120-5, 1986.
- BARTOLD, P. M.; MARSHALL, R. I.; HAYNES, D. R. Periodontitis and rheumatoid arthritis: A review. **J Periodontol**, v. 76, n. 11, p. 2066-2074, 2005.
- BARTOLD, P. M. et al. Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. **J Clin Periodontol**, v. 37, n. 5, p. 405-11, 2010.
- BEDAIWI, M. K.; INMAM, R. D. Microbiome and probiotics: link to arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 26, n. 4, p. 410-415, 2014.
- BEN-ZVI, I. et al. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 42, n. 2, p. 145-53, 2012.
- BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R.P. Microbila shift and periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 55, n. 1, p. 36-47, 2011.
- BERGLUNDH, T. et al. The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 29, p. 281–286, 2002.

- BERGSTROM, J. Periodontitis and smoking: an evidence-based appraisal. *J. Evid. Based Dent Pract.*, v. 6, p. 33–41, 2006.
- BEZERRA, M. M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, v. 71, n. 6, p. 1009-14, 2000.
- BIAVATI, B. et al. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Microbiol.*, v. 50, p. 117-131, 2000.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Collagen-induced arthritis and related animal models: how much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 22, n. 5-6, p. 339-44, 2011.
- BORRELL, L. N.; CRAWFORD, N. D. Social disparities in periodontitis among United states adults 1999–2004. *Community Dent. Oral Epidemiol*, v. 36, p. 383–39, 2008.
- BOZKURT, F. Y. et al. Anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: a preliminary report. *Cytokine*, v. 35, n. 3-4, p. 180-5, 2006.
- BRAAT, H. et al. Lactobacillus rhamnosus induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD41T cells via modulation of dendritic cell function. *Am J Clin Nutr*, v. 80, n. 6, p. 1618-25, 2004.
- BRENNAN, F. M.; McINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, v. 118, n. 11, p. 3537-45, 2008.
- BRITO; F. et al. Subgingival microflora in inflammatory bowel disease patients with untreated periodontitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 25, n. 2, p. 239-245, 2013.
- BROOKS, W. H. et al. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun*, v. 34, n. 3, p. J207-19, 2010.
- BRZUSTEWICZ, E.; BRYL, E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis—practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of therapy. *Cytokine*, v. 76, n. 2, p. 527-536, 2015.
- BUCH, M. H.; BINGHAM, S. J.; EMERY, P. Long-term infliximab treatment in rheumatoid arthritis: subsequent outcome of initial responders. *Rheumatology (Oxford)*, v. 46, n. 7, p. 1153-6, 2007.
- BUHLIN, K. et al. Periodontitis is associated with angiographically verified coronary artery disease. *J Clin Periodontol.*, v. 38, n. 11, p. 1007-14, 2011.
- CAGLAR, E. et al. Short-term effect office-cream containing Bifidobacterium lactis Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol Scand.*, v. 66, n. 3, 154-158, 2008.
- CAMINER, A. C.; HABERMAN, R.; SCHER, J. U. Human microbiome, infections, and rheumatic disease. *Clin Rheumatol.*, v. 36, n. 12, p. 2645-2653, 2017.
- CANTLEY, M. D. et al. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *J Clin Periodontol.*, v. 38, n. 6, p. 532-41, 2011.

- CATRINA, A. I. et al. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 10, n. 11, p. 645-53, 2014.
- CHAMBRONE, L. et al. Evidence grade associating periodontitis to a preterm birth and/or low birth weight: I. A systematic review of prospective cohort studies. **J Clin Periodontol.**, v. 38, n. 9, p. 795-808, 2011a.
- CHAMBRONE, L. Evidence grade associating periodontitis to a preterm birth and/or low birth weight: II: a systematic review of randomized trials evaluating the effects of periodontal treatment. **J Clin Periodontol.**, v. 38, n. 10, p. 902-14, 2011b.
- CHAPPLE, I.L. et al. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **J Clin Periodontol.**, v. 44, n. 18, p. S39-S51, 2017.
- CHEN, H. H. et al. Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case-control study. **Ann Rheum Dis**, v. 72, n. 7, p. 1206-11, 2013.
- CHEN, J. et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. **Genome Med.**, v. 8, n. 1, p. 43, 2016.
- CHIANG, B. et al. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. **Eur J Clin Nutr.**, v. 54, n. 11, p. 849-855, 2000.
- CHUKKAPALLI, S. et al. Periodontal bacterial colonization in synovial tissues exacerbates collagen-induced arthritis in B10.RII mice. **Arthritis Res Ther.**, v. 18, n.1, p. 161, 2016.
- COAT, J. et al. Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. **J Clin Periodontol**, v. 42, n. 9, p. 817-823, 2015.
- COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol**, v. 79, n. 8, p. 1569-1576, 2008.
- COJOCARU, M. et al. Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. **Maedica (Buchar)**, v. 5, n. 4, p. 286-91, 2010.
- CORRÊA, J. D. et al. Arthritis-induced alveolar bone loss is associated with changes in the composition of oral microbiota. **Anaerobe**, v. 39, p. 91-6, 2016.
- CORRÊA, M. G. et al. Periodontitis increases rheumatic factor serum levels and citrullinated proteins in gingival tissues and alter cytokine balance in arthritic rats. **PLoS One**, v. 12, n. 3, :e0174442, 2017.
- COUSSEAU, 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. 4163-4175, 2008.

- CUI, D. et al. Human β -defensin 3 inhibits periodontitis development by suppressing inflammatory responses in macrophages. **Mol Immunol**, v. 91, p. 65-74, 2017.
- DARVEAU, R. P. Periodontitis: apolymicrobial disruption of host homeostasis. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 7, p. 481-90, 2010.
- de AQUINO, S. G. et al. Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. **J Immunol**, v. 192, n. 9, p. 4103-4111, 2014.
- de AQUINO, S. G. et al. The aggravation of arthritis by periodontitis is dependent of IL-17 receptor A activation. **J Clin Periodontol.**, v. 44, n. 9, p. 881-891, 2017.
- de PABLO, P.; DIETRICH, T.; McALINDON, T.E. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. **J Rheumatol**, v. 35, n. 1, p. 70-76, 2008.
- de PABLO, P. et al. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. **Nat. Rev. Rheumatol**, v. 5, n. 4, p. 218-224, 2009.
- de SMIT, M. et al. Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 5, p. R222, 2012.
- de SMIT, M. J. et al. Periodontitis and rheumatoid arthritis: what do we know?. **J Periodontol**, v. 86, n. 9, p.1013-1019, 2015.
- DEEPA, D.; MEHTA, D. S. Is the role of probiotics friendly in the treatment of periodontal diseases !! **J Indian Soc Periodontol**, v. 13, n. 1, p 30-31, 2009.
- DEMMER, R. T.; JACOBS, D. R. Jr.; DESVARIEUX, M. Periodontal disease and incident type 2 diabetes: results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its epidemiologic follow-up study. **Diabetes Care**, v. 31, n. 7, p. 1373-9, 2008.
- DESTEFANO, F. et al. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. **BMJ**, v. 306, n. 6879, p.688-91, 1993.
- Di BENEDETTO, A. et al. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. **Clin Dev Immunol**, 2013:503754. doi: 10.1155/2013/503754, 2013.
- DIAMOND, G. et al. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 21, p. 2377-92, 2009.
- DIETRICH, T. et al. Tobacco use and incidence of tooth loss among US male health professionals. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 4, p. 373-377, 2007.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-8, 2000.
- DINSER, R. Animal models for arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 22, n. 2, p. 253-67, 2008.

- DORNER, T. et al. Rheumatoid factor revisited. **Curr Opin Rheumatol**, v. 16, n. 3, p. 246-53, 2004.
- DORNER, T.; HANSEN, A. Autoantibodies in normal—the value of predicting rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 6, n. 6, p. 282-4, 2004.
- EHRENSTEIN, M. R. et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti- TNFalpha therapy. **J Exp Med**, v. 200, n. 3, p. 277-85, 2004.
- EKE, P.I. et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 – 2012. **J Periodontol**, v. 86, n. 5, p. 611-622, 2015.
- ERCIYAS, K. et al. Effects of periodontal therapy on disease activity and systemic inflammation in rheumatoid arthritis patients. **Oral Dis**, v. 19, n. 4, p. 394–400, 2013.
- ESKAN, M. A. et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. **Nat Immunol**, v. 13, n. 5, p. 465-73, 2012.
- FABRI, G. M. et al. Periodontal disease in pediatric rheumatic diseases. **Rev Bras Reumatol**, v. 54, n. 4, p. 311-7, 2014.
- FENG, X. et al. Modulation of IL-6 induced RANKL expression in arthritic synovium by a transcription factor SOX5. **Sci Rep**, 6:32001. doi: 10.1038/srep3200, 2016.
- FIGUEREDO, C. M. et al. Expression of cytokines in the gingival crevicular fluid and serum from patients with inflammatory bowel disease and untreated chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 46, n. 1, p. 141-6, 2011.
- FOUREAUX, R. de C. et al. Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. **J Periodontol**, v. 85, n. 7, p. 975-983, 2014.
- FRENCKEN, J. E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. **J Clin Periodontol.**, v. 44, n. 18, p. S94-S105, 2017.
- FRIEDEWALD, V. E. et al. American Journal of Cardiology; Journal of Periodontology. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. **J Periodontol.**, v. 80, n. 7, p. 1021-32, 2009.
- FUGGLE, N. R. et al. Hand to Mouth: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. **Front Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 80, 2016.
- GAFFEN, S. L.; HAJISHENGALLIS, G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. **J Dent Res.**, v. 87, n. 9, p. 817-28, 2008.
- GARCIA, R. I., KRALL, E. A. & VOKONAS, P. S. Periodontal disease and mortality from all causes in the VA Dental Longitudinal Study. **Annals of Periodontology.**, v.3, p.339–349, 1998.

- GARCIA, V. G. Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v. 51, n. 1, p. 26-37, 2016.
- GARIB, B. T.; QARADAXI, S. S. Temporomandibular joint problems and periodontal condition in rheumatoid arthritis patients in relation to their rheumatologic status. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 69, n. 12, p. 2971-8, 2011.
- GARLET, G. P. et al. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? **J Periodontal Res.**, v. 41, n. 6, p. 580-584, 2006.
- GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **J Dent Res.**, v. 89, n. 12, p. 1349-63, 2010.
- GATEJ, S. M. et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 45, n. 2, p. 204-212, 2018.
- GENCO, R. J.; BORGNAKKE, W. S. Risk factors for periodontal disease. **Periodontol 2000.**, v. 62, n. 1, p. 59-64, 2013.
- GENCO, R. J.; GENCO, F. D. Common risk factors in the management of periodontal and associated systemic diseases: the dental setting and interprofessional collaboration. **J Evid Based Dent Pract.**, v. 14, p. 4-16, 2014.
- GENOVESE, M. C. et al. Efficacy and safety of secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, dose-finding, double-blind, randomized, placebo controlled study. **Ann Rheum Dis**, v. 72, n. 6, p. 863-9, 2013.
- GILL, H. S. et al. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. **Am J Clin Nutr**, v. 74, n. 6, p. 833-9, 2001.
- GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.81, n. 5, p. 591-606, 2008.
- GILLS, H. S. et al. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. **Am J Clin Nutr.**, v. 74, n. 6, p. 833-839, 2001.
- GILLS, H. S. et al. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). **Br J Nutr.**, v. 83, p. 167-176, 2000.
- GOHIL, P. et al. Anti-arthritis activity of cell wall content of *Lactobacillus plantarum* in Freund's adjuvant-induced arthritic rats: involvement of cellular inflammatory mediators and other biomarkers. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 171-181, 2018.
- GOLUB, L. M. et al. Can systemic diseases co-induced (not just exacerbate) periodontitis? A hypothetical "two-hit" model. **J Dent Res.**, v. 85, n. 2, p. 102-5, 2006.
- GOMES, M. S. et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. **J Endod**, v. 39, n. 10, p. 1205-17, 2013.

- GORDON, D. M. The potential of bacteriocin-producing probiotics and associated caveats. **Future Microbiol**, v. 4, n. 8, p. 941-943, 2009.
- GOTZSCHE, P. C.; JOHANSEN, H. K. Short-term low-dose corticosteroids vs placebo and nonsteroidal antiinflammatory drugs in rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, In: Cochrane Database Syst Rev. v. 2, 2000.
- GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 74, n. 3, p. 391-40, 2003.
- GRAVES, D. T. et al. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 2, p. 89-105, 2008.
- GRAVES, D. T.; LI, J.; COCHRAN, D. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **J Dent Res**, v. 90, n.2, p. 143-53, 2011.
- GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 30, n. 11, p. 1205-13, 1987.
- GROSS, A. J. et al. Periodontitis: a global disease and the primary care provider's role. **Postgrad Med J**, v. 93, n. 1103, p. 560-565, 2017.
- GULLY, N. et al. Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase, a key contributor in the pathogenesis of experimental periodontal disease and experimental arthritis. **PloS One**, v.9, n. 6, p. 100838, 2014.
- GYORGY, B. et al. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. **Int J Biochem Cell Bio**, v. 38, n.10, p. 1662-77, 2006.
- HAJISHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and hostresponse. **Trends Immunol**, v. 35, n. 1, p. 3-11, 2014.
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Mol Oral Microbiol**, v. 27, n. 6, p. 409-419, 2012.
- HAJISHENGALLIS, G. et al. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. **J Leukoc Biol**, v. 98, n. 4, p. 539-48, 2015.
- HATAKKA, K. et al. Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis—a pilot study. **Scand J Rheumatol**, v. 32, n. 4, p. 211-5, 2003.
- HASTURK, H.; KANTARCI, A. Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. **Periodontol 2000**, v. 69, n. 1, p. 255-73, 2015.
- 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. 326-332, 2006.
- HAVEMOSE-POULSEN, A. et al. Polymorphisms within the IL-1 gene cluster: effects on cytokine profiles in peripheral blood and whole blood cell cultures of patients with aggressive

periodontitis, juvenile idiopathic arthritis, and rheumatoid arthritis. **J Periodontol**, v. 78, n. 3, p. 475-492, 2007.

HAVEMOSE-POULSEN, A. et al. Periodontal and hematological characteristics associated with aggressive periodontitis, juvenile, idiopathic arthritis, and rheumatoid arthritis. **J Periodontol**, v. 77, n. 2, p. 280-8, 2006.

HENSVOLD, A. H. Environmental and genetic factors in the development of anticitrullinated protein antibodies (ACPAs) and ACPA-positive rheumatoid arthritis: an epidemiological investigation in twins. **Ann Rheum Dis**, v. 74, n. 2, p. 375-80, 2015.

HIRSCHFELD, J. Neutrophil extracellular trap formation in supragingival biofilms. **Int J Med Microbiol**, v. 305, n. 4-5, p. 453-63, 2015.

HOLMDAHL, R. et al. Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immuno genetics, pathogenesis and autoimmunity. **APMIS**, v. 97, n.7, p. 575-84, 1989.

HOMAYOUNI RAD, A. et al. Might patients with immune-related diseases benefit from probiotics? **Nutrition**, v. 29, n. 3, p. 583-586, 2013.

HORTA-BAAS, G. et al. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **J Immunol Res**, v. 2017, n. 4835189, 2017.

HUMPHREY, L. L. et al. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. **J Gen Intern Med**, v. 23, n. 12, p. 2079-86, 2008.

HUSSAIN, M.; STOVER, C. M.; DUPONT A. P. gingivalis in Periodontal Disease and Atherosclerosis - Scenes of Action for Antimicrobial Peptides and Complement. **Front Immunol**, v. 10, n. 6, p. 45, 2015.

IDE, R. et al. Periodontal disease and incident diabetes: a seven-year study. **J Dent Res**, v. 90, n. 1, p. 41-6, 2011.

INCE, G. et al. Clinical and Biochemical Evaluation of Lactobacillus Reuteri Containing Lozenges as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. **J Periodontol**, v. 5, p. 1-13, 2015.

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 (Doutorado em Odontologia – Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

IVANOV, I. I. et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485-98, 2009.

JANOSSY, G. et al. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. **Lancet**, v. 2, n. 8251, p. 839-42, 1981.

- JÄSBERG, 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, 2016.
- JETHWA, H.; ABRAHAM, S. The evidence for microbiome manipulation in inflammatory arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 56, n. 9, p. 1452-1460, 2017.
- Joint FAO/WHO. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. (<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>).
- JOSEPH, R. et al. Association between chronic periodontitis and rheumatoid arthritis: a hospital-based case-control study. **Rheumatol Int**, v. 33, n. 1, p. 103-9, 2013.
- KANG, R. Y. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**, v. 35, n. 8, p. 711-8, 1996.
- KANNAN, K.; ORTMANN, R. A.; KIMPEL, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 167-81, 2005.
- KARLSON, E. W.; DEANE, K. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 38, n. 2, p. 405-26, 2012.
- KASSER, U. R. et al. Risk for periodontal disease in patients with longstanding rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.40, n.12, p. 2248-51, 1997.
- KEBSCHULL, M.; DEMMER, R. T.; PAPAPANOU, P. N. “Gum bug, leave my heart alone!”- epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. **J Dent Res**, v. 89, n. 9, p. 879-902, 2010.
- KESAVALU, L.; CHANDRASEKAR, B.; EBERSOLE, J. L. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol Immunol**, v. 17, n. 3, p. 177-80, 2002.
- KINANE, D.F.; STATHOPOULOU, P.G.; PAPAPANOU, P.N. Periodontal diseases. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, n. 17038, p. 1-14, 2017.
- KIRKHAM, B. W. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: A two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 4, p. 1122-31, 2006.
- KIRKWOOD, K. L. et al. Novel host response therapeutic to treat periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 43; p. 294-315, 2007.
- KLARESKOG, L. et al. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 651-75, 2008.
- KLARESKOG, L.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. **Curr. Opin. Rheumatol**, v. 19, n. 1, p. 49–54, 2007.

- KOBAYASHI, R. et al. Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective in preventing *Porphyromonas gingivalis*-accelerated periodontal disease. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 545, 2015.
- KOBAYASHI, T.; YOSHIE, H. Host Responses in the Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis. **Curr Oral Health Rep**, v. 2, p. 1-8, 2015.
- KOLLIAS, G. et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 8, p. 1357-62, 2011.
- KONIG, M. F. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. **Sci Transl Med**, v. 8, n. 369, p. 369ra-176, 2016.
- KOZEIL, J.; MYDEL, P.; POTEMPA, J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. **Curr Rheumatol Rep**, v. 16, n. 3, p. 408, 2014.
- LAST, N. B.; SCHALAMADINGER, D. E.; MIRANKER, A. D. A common landscape for membrane-active peptides. **Protei Sci**, v. 22, n. 7, p. 870-82, 2013.
- LEE, N.; KIM, W. U. Microbiota in T-cell homeostasis and inflammatory diseases. **Exp Mol Med**, v. 49, n. 5, p. e340, 2017.
- LEE, Y. H.; JI, J. D.; SONG, G. G. Association between interleukin 1 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a metaanalysis. **J. Rheumatol**, v. 36, n. 1, p. 12-5, 2008a.
- LEE, Y. H.; JI, J. D.; SONG, G. G. Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a metaanalysis. **J. Rheumatol**, v. 35, n. 11, p. 2129–2135, 2008b.
- LEUCKFELD, I. et al. Severe chronic obstructive pulmonary disease: association with marginal bone loss in periodontitis. **Respir Med**, v. 102, n. 4, p. 488-94, 2008.
- LI, S. et al. Antimicrobial peptides as a possible interlink between periodontal diseases and its risk factors: A systematic review. **J Periodontal Res**, v. 53, n. 2, p. 145-155, 2018.
- LINDEN, G. J. et al. All-cause mortality and periodontitis in 60-70-year-old men: a prospective cohort study. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 10, p. 940-6, 2012.
- LINK-AMSTER, H. et al. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 55-63, 1994.
- LIU, X. et al. Analysis of fecal *Lactobacillus* community structure in patients with early rheumatoid arthritis. **Curr Microbiol**, v. 67, n. 2, p. 170-6, 2013.
- LOHMAN, R. J. et al. An antagonist of human protease activated receptor-2 attenuates PAR2 signaling, macrophage activation, mast cell degranulation, and collagen-induced arthritis in rats. **FASEB J**, v. 26, n. 7, p. 2877-87, 2012.
- LUNDBERG, K. et al. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, p. 727–30, 2010.

- LUO, Z. et al. Clinical significance of IL-23 regulating IL-17and/or IL-17F positive Th17 cells in chronic periodontitis. **Mediators Inflamm**, 2014; 2014: 627959.
- MAEKAWA, T.; HAJISHENGALLIS, G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. **J Periodontal Res**, v. 49, n. 6, p. 785- 791, 2014.
- MAHDI, H. et al. Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. **Nat Genet**, v. 41, n. 12, p. 1319-24, 2009.
- MANDEL, D. R.; EICHAS, K.; HOLMES, J. *Bacillus coagulans*: a viable adjunct therapy fo relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, n. 10, p. 1, 2010.
- MANICOURT, D. H. et al. Levels of circulating tumor necrosis factor alpha and interleulin-6 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of hyaluronan and antigenic keratin sulfate. **Arthritis Rheum**, v. 36, n. 4, p. 4090-9, 1993.
- MANKIA, K.; EMERY, P. Is localized autoimmunity the trigger for rheumatoid arthritis? Unravelling new targets for prevention. **Discov Med**, v. 20, n. 109, p. 129-35, 2015.
- MARCHESAN, J. T. et al. *Porphyromonas gingivalis* oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 6, p. 1-13 , 2013.
- MARTINEZ, R.; BEDANI, R.; SAAD, S. 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, 2015.
- MATEVOSYAN, N. R. Periodontal disease and perinatal outcomes. **Arch Gynecol Obstet**, v. 283, n. 4, p. 675-86, 2011.
- MAYANAGI, G. et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: A double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 6, p. 506-513, 2009.
- McNAMEE, K.; WILLIAMS, R.; SEED, M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they?. **Eur J Pharmacol**, v. 2015, n. 759, p. 278-86, 2015.
- McINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 429-42, 2007.
- MERCADO, F. B. et al. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. **J Periodontol**, v. 72, n. 6, p. 779-87, 2001.
- MERCADO, F. et al. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 4, p. 267-72, 2000.
- MESSORA, M. R. et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. **J Periodontol**, v. 84, n. 12, p. 1818-1826, 2013.

- MESSORA, M. R. et al. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. **Arch Oral Biol**, v. 66; p. 108-119, 2016.
- 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, 2005.
- MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 69, n. 1, p. 7-17, 2015.
- MEYLE, J. et al. The innate host response in caries and periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 44, n. 12, p. 1215-1225, 2017.
- MIELANTS, H. et al. The role of gut inflammation in the pathogenesis of spondyloarthropathies. **Acta Clin Belg**, v. 51, n. 5 p. 340–349, 1996.
- MIKULS, T. R. et al. *Porphyromonas gingivalis* and disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 11, p. 3522-30, 2012.
- MIKULS, T. et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. **Artrite Rheumatol**, v. 66, n. 5, p. 1090-1100, 2014.
- MIKULS, T. R. et al. Autoimmunity of the lung and oral mucosa in a multisystem inflammatory disease: The spark that lights the fire in rheumatoid arthritis? **J Allergy Clin Immunol**, v. 137, n. 1, 28-34, 2016.
- MIOSSEC, P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. **Microbes Infect**, v. 11, n. 3, p. 625–30, 2009.
- MIOSSEC, P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. **Arthritis Rheum**, v. 48, n. 3, p. 594–601, 2003
- MOEN, k. et al. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. **Clin Exp Rheumatol**, v. 24, n. 6, p. 656-63, 2006.
- MOHAMMED, A. T. et al. The therapeutic effect of probiotics on rheumatoid arthritis: a systemic review and meta-analysis of randomized control trials. **Clin Rheumatol**, v. 36, n. 12, p. 2697-2707, 2017.
- MOMBELLI, A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. **Periodontol 2000**, v. 76, n. 1, p. 85-96, 2018.
- 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, 2016.
- MORALES, A. et al. Microbiological and clinical effects of probiotics and antibiotics on nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo- controlled trial with 9-month follow-up. **J Appl Oral Sci**, v. 18, n. 26, e20170075, 2018.

- MURPHY, C. A. et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **J Exp Med**, v. 198, n. 12, p. 1951-7, 2003.
- MYASOEDOVA, E. et al. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising? Results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 6, p. 1576-1582, 2010.
- NJOROGE, T. et al. A role of fimbriae in Porphyromonas gingivalis invasion of oral epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 5, p. 1980-1984, 1997.
- NOWAK, B. et al. Lactobacillus rhamnosus expolysaccharide ameliorates arthritis induced by the systemic injection of collagen and lipopolysaccharide in DBA/1 mice. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 60, n. 3, p. 211-20, 2012.
- NISSSEN, L. et al. Lactobacillus salivarius and L. gasseri down-regulate Aggregatibacter actinomycetemcomitans exotoxins expression. **Ann Microbiol**, v. 64, p. 611-617, 2014.
- NOTLEY, C. A. et al. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. **J Exp Med**, v. 205, n. 11, p. 2491-7, 2008.
- OELSCHLAEGGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions - A review. **Int J Med Microbiol**, v. 300, n. 1, p.57-62, 2010.
- OGRENDIK, M. Rheumatoid arthritis is linked to oral bacteria: etiological association. **Mod Rheumatol**, v. 19, n. 5, p. 453-6, 2009.
- OKADA, M. et al. Periodontal treatment decreases levels of antibodies to Porphyromonas gingivalis and citrulline in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. **J Periodontol**, v. 84, p. e74-84, 2013.
- OKADA, M. et al. Antibody responses to periodontopathogenic bacteria in relation to rheumatoid arthritis in Japanese adults. **J Periodontol**, v. 82, n. 10, p. 1433- 1441, 2011.
- OLIVER, R. C.; BROWN, L. J.; LÖE, H. Periodontal diseases in the United States population. **J Periodontol**, v. 69, p. 269-278, 1998.
- OLIVEIRA, LFF. Uso tópico de probiótico Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 reduz as sequelas teciduais decorrente da periodontite experimental em ratos: estudo microbiológico,histomorfométrico, imunológico e microtomográfico. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 2016.
- OLIVEIRA, L. F. et al. Benefits of Bifidobacterium animalis subsp. lactis Probiotic in Experimental Periodontitis. **J Periodontol**, v. 88, n. 2, p. 197-208, 2017.
- ORTIZ, P. et al. Periodontal therapy reduces the severity of active rheumatoid arthritis in patients treated with or without tumor necrosis factor inhibitors. **J Periodontol**, v. 80, n. 4, p. 535-40, 2009.
- PALMER, R.; SOORY, M. Fatores Modificadores. In: LINDHE J; LANG NP; KARRING T. Tratado de Periodontia clínica e Implantologia Oral. 5.ed. Rio de Janeiro, 2010. Cap.,12, p. 292-311.

- PARASKEVAS, S.; HUIZINGA, J. D.; LOOS, B. G. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 35, n.4, p. 277-90, 2008.
- PARK, J. C. et al. Mechanism of alveolar bone loss in a collagen-induced arthritis model in mice. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 2, p. 122-30, 2011.
- PEARSON, C. M.; WOOD, F. D. Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats given adjuvants. **Arthritis Rheum**, v. 2, p. 440-459, 1959.
- PEDERSEN, M. et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 4, p. R133, 2006.
- PELTO, L. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. **Clin Exp Allergy**, v. 28, n. 12, p. 1474-9, 1998.
- PELTONEN, R. et al. Faecal microbial flora and disease activity in rheumatoid arthritis during a vegan diet. **Br J Rheumatol**, v. 36, n. 1, p. 64-68, 1997.
- PERDIGÓN, G. et al. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. **Eur Clin Nutr**, v. 56, n. 4, p. S21-6, 2002.
- 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. 6804-681, 2009.
- PFIZENMAIER, K.; WAJANT, H.; GRELL, M. Tumor necrosis factors 1996. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 7, n. 3, p. 271-7, 1996.
- PINCUS, T. Patient questionnaires and formal education as more significant prognostic markers than radiographs or laboratory tests for rheumatoid arthritis mortality—limitations of a biomedical model to predict long-term outcomes. **Bull. NYU Hosp. Jt Dis**, v. 65, n.1, p. s29-s36, 2007.
- PINEDA MDE, L. et al. A randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study of probiotics in active rheumatoid arthritis. **Med Sci Monit**, v. 17, n. 6, p. CR347-54, 2011.
- PISCHON, N. et al. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. **J Periodontol**, v. 79, n. 6, p. 979-86, 2008.
- PRASAD, J. et al. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 12, p. 993-1002, 1998.
- PRESHAW, P. M. et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. **Diabetologia**, v. 55, n. 1, p. 21-31, 2012.
- PRETE, M. et al. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. **Autoimmun Rev**, v. 11, n. 2, p. 123-31, 2011.

- PRITCHARD, A. B. et al. Periodontitis, Microbiomes and their Role in Alzheimer's Disease. **Front Aging Neurosci.**, v.9, p. 1-10, 2017.
- POTEMPA, J.; MYDEL, P.; KOZIEL, J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 13, n. 10, p. 606-620, 2017.
- POTIKURI, D. Periodontal disease is significantly higher in non-smoking treatment-naive rheumatoid arthritis patients: results from a case-control study. **Ann Rheum Dis.**, v. 71, n. 9, p. 1541-4, 2012.
- QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MADEIRA, M. F., COELHO, F. M. Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF-alpha and the oral. **Microbiota. J Immunol**, v 187, n. 7, p. 3821-3830, 2011.
- QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MADEIRA, M. F.; COELHO, F. M. Experimental arthritis exacerbates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontitis in mice. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 7, p. 608-616, 2012.
- QUINTEIRO, M. S. et al. The indirect antinociceptive mechanism of 15d-PGJ2 on rheumatoid arthritis-induced TMJ inflammatory pain in rats. **Eur J Pain**, v.16, n. 1, p. 1106-1115, 2012.
- RAMAMURTHY, N. S. et al. Experimental arthritis in rats induces biomarkers of periodontitis which are ameliorated by gene therapy with tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. **J Periodontol**, v. 76, n. 2, p. 229-33, 2005.
- REICHERT, S. et al. Detection of oral bacterial DNA in synovial fluid. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 6, p. 591-8, 2013.
- REYNOLDS, M. A. Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. **Periodontol 2000**, v. 64, n. 1, p. 7-19, 2014.
- RHODES, B.; FURNROHR, B. G.; VYSE, T. J. C-Reactive protein in rheumatology: biology and genetics. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 7, n. 5, p. 282-9, 2011.
- RIBEIRO, J.; LEÃO, A.; NOVAES, A. B. Periodontal infection as a possible severity factor for rheumatoid arthritis. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 4, p. 412-6, 2005.
- RICCIA, D. N. et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. **Oral Dis**, v. 13, n. 4, p. 376-385, 2007.
- 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, e0179946, 2017.
- ROGERS GB. Germs and joints: the contribution of the human microbiome to rheumatoid arthritis. **Nat Med**, v. 21, n. 8, p.839-41, 2015.
- ROMAS, E.; GILLESPIE, M. T.; MARTIN, T. J. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. **Bone**, v. 30, n. 2, p. 340-346, 2002.

ROSENBAUM, J. T.; ASQUITH, M. J. The Microbiome: a Revolution in Treatment for Rheumatic Diseases? **Curr Rheumatol Rep**, v. 18, n. 10, p. 62, 2016.

ROSENSTEIN, E. D. et al. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. **Inflammation**, v. 28, n. 6, p. 311-8, 2004.

ROVENSKY, J. et al. Treatment of adjuvant-induced arthritis with the combination of methotrexate and probiotic bacteria *Escherichia coli* O83 (Colinfant). **Folia Microbiol (Praha)**, v. 54, n. 4, p. 359-63, 2009.

SAAVEDRA, J. M. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. **Am J Clin Nut.**, v. 79, n. 2, p. 261-7, 2004.

SACKS, J. J.; LUO, Y. H.; HELMICK, C. G. Prevalence of specific types of arthritis and other rheumatic conditions in the ambulatory health care system in the United States, 2001-2005. **Arthritis Care Res**, v. 62, n. 4, p. 460-464, 2010.

SAFFI, M. A. et al. Relationship between vascular endothelium and periodontal disease in atherosclerotic lesions: Review article. **World J Cardiol**, v. 7, n. 1, p.26-30, 2015.

SANDROS, J. et al. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. **J Dent Res**, v. 79, n. 10, p. 1808-1814, 2000.

SANZ, M.; QUIRYNEN, M; EUROPEAN WORKSHOP IN PERIODONTOLOGY GROUP A. Advances in the aetiology of periodontitis. Group A consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 5; p. 54-6, 2005.

SANZ, M. et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 44, n. 18, p. S5-S11, 2017.

SARTOR, R. B. et al Review article: Role of the enteric microflora in pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 11, n. 3, p. 17-22, 1997.

SCALLY, S. W. et al. A molecular basis for association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. **J Exp Med**, v. 210, n. 12, p. 2569-82, 2013.

SCHER, J. U. et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **Elife**, v. 2, 2013.

SCHER, J. U. et al. Periodontal disease and oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, n. 64, v. 10, p. 3083-94, 2012.

SCHORPION, A; KOLASINSKI, S.L. Can Probiotic Supplements Improve Outcomes in Rheumatoid Arthritis?. **Curr Rheumatol Rep**, v. 19, n. 11, p.73, 2017.

SHAH, M. P.; GUIJARI, S. K.; CHANDRASEKHAR, V. S. Evaluation of the effect of probiotic (inersan®) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. **J Clin Diagn Res**, v. 7, n. 3, p. 595-600, 2013.

- SHIMAUCHI, H. et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 897-905, 2008.
- SI, Y. et al. Association between periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease in a Chinese population. **J Periodontol**, v. 83, n. 10, p. 1288-96, 2012.
- SILMAN, A.J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, v. 4, n. 3, p. S265-72, 2002.
- SILVEIRA, I. G. et al. Anti-CCP antibodies have more diagnostic impact than rheumatoid factor (RF) in a population tested for RF. **Clin Rheumatol**, v. 26, n. 11, p. 1883-9, 2007.
- SINGH, R. P.; DAMLE, S. G.; CHAWLA, A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. **Acta Odontol Scand**, v. 69, n. 6, p. 389-394, 2011.
- SLIEPEN, I. et al. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. **J Dent Res**, v. 88, n. 11, p. 1026-30, 2009.
- SNIR, O. et al. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 1, p. 44-52, 2010.
- SLOTS, J.; RAMS, T. E. New views on periodontal microbiota in special patient categories. **J. Clin Periodontol**, v. 18, n. 6, p. 411-420, 1991.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J Periodontol**, v. 63, n. 4, p. 322-331, 1992.
- SOOKKHEE, S.; CHULASIRI, M.; PRACHYABRUED, W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. **J Appl Microbiol**, v. 90, p. 172-179, 2001.
- SPURLOCK, C. F. 3rd. et al. Cutting Edge: Chronic NF- κ B Activation in CD4⁺ T Cells in Rheumatoid Arthritis Is Genetically Determined by HLA Risk Alleles. **J Immunol**, v. 195, n. 3, p. 791-5, 2015.
- STAAB, B. et al. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 10, p. 850-6, 2009.
- STABHOLZ, A.; SOSKOLNE, W. A.; SHAPIRA, L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 53, p. 138-53, 2010.
- STAMATOVA, I.; MEURMAN, J. H. Probiotics and periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 51, p. 141-151, 2009.
- STOERK, H. C.; BIELINSKI, T. C.; BUDZILOVICH, T. Chronic polyarthritis in rats injected with spleen in adjuvants. **Am J Pathol**, v. 30, p. 616-621, 1954.

SUAREZ-ALMAZOR, M. E. et al. Methotrexate for rheumatoid arthritis (Cochrane Review). Em: **The Cochrane Library**, Issue 3, 2000. Oxford: Update Software.

SUMER, A. P. et al. Association of interleukin-10 gene polymorphisms with severe generalized chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 78, n. 3, p. 493-7, 2007.

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, p. 495-500, 2014.

TAKEDA, K. et al. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. **Clin Exp Immunol**, v. 146, n. 1, p. 109-15, 2006.

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, 2015.

TÉMOIN, S. et al. Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints. **J Clin Rheumatol**, v. 18, n. 3, p. 117-21, 2012.

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. 1025-1035, 2013.

TEUGHEL, W.; LOOZEN, G.; QUIRYNEN, M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 11, p. 159-177, 2011.

TOIVANEN, P. et al. Intestinal anaerobic bacteria in early rheumatoid arthritis (RA). **Arthritis Research**, v. 4, p. 5, 2002.

TOIVAINEN, A. et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. **Clin Oral Investig**, v. 19, n. 1, p. 77-83, 2015.

TOUBI, E. et al. Increased spontaneous apoptosis of CD4⁺ CD5⁺ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1051, p. 1506-14, 2005.

TRENTHAM, D. E. Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis: evidence pro and con. **Arthritis Rheum**, v. 25, p. 911-916, 1982.

TROMBONE, A. P. et al. Periodontitis and arthritis interaction in mice involves a shared hyper-inflammatory genotype and functional immunological interferences. **Genes Immun**, v. 11, n. 6, p. 479-89, 2010.

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. 1353-1356, 2009.

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.

VAGHEF-MEHRABANY, E. et al. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 430-435, 2014.

VAGHEF-MEHRABANY, E. et al. Effects of Probiotic Supplementation on Oxidative Stress Indices in Women with Rheumatoid Arthritis: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. **J Am Coll Nutr**, v. 35, n. 4, p. 291-9, 2016.

VAN HAMBURG, J. P. et al. Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 1, p. 73-83, 2011.

VAN HOOGLMOED, C. G. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salivary conditioning film by biosurfactant- releasing *Streptococcus mitis* strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 659-663, 2000.

VAN NIEL, C. W. Probiotics: not just for treatment anymore. **Pediatrics**, v. 115, n. 1, p. 174-7, 2005.

VANDOOREN, B. et al. The abundant synovial expression of the RANK/RANKL/Osteoprotegerin system in peripheral spondylarthritis is partially disconnected from inflammation. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 3, p. 718-729, 2008.

VERNAL, N. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 4, p. 383-389, 2005.

VITETTA L; SALI A. Probiotics, prebiotics and gastrointestinal health. **Med Today**., v. 9, p. 65-70, 2008.

VITETTA, L. et al. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics. **Pathogens**, v. 2, n. 4, p. 606-626, 2013.

VIVEKANANDA, M. R.; VANDAN, 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, p. 2, 2010.

VONG, L. et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. **J Immunol**, v. 194, n. 4, p. 1870-7, 2014.

WANG, Q. et al. The roles of B cells and their interactions with fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 155, n. 3, p 205-211, 2011.

WANG, Y. et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **J Cell Biol**, v. 182, n. 2, p. 205-213, 2009.

- WARREN, K. R. et al. Role of chronic stress and depression in periodontal diseases. **Periodontol** 2000, v. 64, n. 1, p. 127-38, 2014.
- WEAVER, C. T. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 821-52, 2007.
- WEGNER, N. et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 62, n. 9, p. 2662-72, 2010.
- WILSON M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int Dent J.**, v. 44, n. 2, p. 181-9, 1994.
- WOLFF, L.; DAHLÉN, G.; AEPLI, D. Bacteria as risk markers for periodontitis. **J Periodontol.** , v. 65, n. 5, p. 498-510, 1994.
- WU, T. et al. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. **Arch Intern Med.**, v. 160, n. 18, p. 2749-55, 2000.
- WU, H. J. et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. **Immunity.**, v. 32, n. 6, p. 815-27, 2010.
- YAMASHITA, M. et al. Preventive Effect of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 on Collagen-Induced Arthritis in Mice. **Front Microbiol**, v. 21, n. 8, p. 1159, 2017.
- YEOH, N. et al. The role of the microbiome in rheumatic diseases. **Curr Rheumatol Rep.**, v. 15, n. 3, p. 314, 2013.
- YU, J. J. et al. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3794-802, 2007.
- ZAHRADNIK, R. T. et al. Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. **J Appl Microbiol.** , v. 107, n. 2, p. 682-90, 2009.
- ZAMANI, B. et al. Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Int J Rheum Dis**, v. 19, n. 9, p. 869-79, 2016.
- ZENG, X. T. et al. Periodontal disease and risk of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis of observational studies. **PLoS One.**, v. 7, n. 10, e46508, 2012.
- ZENOBIA, C.; HAJISHENGALLIS, G. Basic biology and role of interleukin-17 and inflammation. **Periodontol** 2000., v. 69, n. 1, p. 142-59, 2015.
- 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, p. 408-416, 2008.
- ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment.” **Nat Med.**, v. 21, n. 8, p. 895-905, 2015.

ZHOU, J. S.; GILL, H. S. Immunostimulatory probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 do not induce pathological inflammation in mouse model of experimental autoimmune thyroiditis. **Int J Food Microbiol**, v. 103, n. 1, p. 97-104, 2005.

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
---	--

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da terapia probiótica com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos portadores de artrite reumatoide experimental”, registrada com o nº 2016.1.441.58.6 sob a responsabilidade do Prof. Dr. Michel Reis Messoro – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 17/08/2016.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	17/08/2016 a 17/07/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	64
Peso/Idade	200-250 g / 49-56 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 17 de agosto de 2016.

 Profa. Dra. Angélica De Rossi Daldegan
 Vice-Coordenadora da CEUA – FORP/USP

**ANEXO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO
JOURNAL OF PERIODONTOLOGY**

"Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis"

Renata S. Cardoso, DDS*

Michel R. Messoria, DDS, PhD*

Pedro Henrique Félix Silva, DDS, MS*

Luiz Fernando Oliveira, DDS, MS*

Christie Leite-Panissi, DDS, PhD[†]

Sérgio Salvador, DDS, PhD[‡]

Renato Casarin, DDS, PhD[§]

Arthur Belém Novaes Junior, DDS, PhD*

Daniela Bazan Palioto, DDS, PhD*

Flávia A. C. Furlaneto, DDS, PhD*

Corresponding author:

Flávia Aparecida Chaves Furlaneto

E-mail address: flafurlaneto@hotmail.com (e-mail can be published)

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

Av. do Cafe, s/n 14040-904

Ribeirao Preto, SP, Brazil

Fax: +55 16 3602-4788 (fax number can be published)

Source of support: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES- Brasilia, DF, Brazil; Process 2243373); National Council for Research and Technological Development (CNPq- Brasilia, DF, Brazil; Process 133228/2016-9). There is no relationship between any author and commercial firms that may pose a conflict of interest.

Word count: 3991

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Number of supplementary figures and tables: 0

Number of references: 50

Running title: Effects of Probiotic on Periodontitis in Rats with Arthritis

Summary sentence: The administration of *B. lactis* HN019 reduces tissue destruction in experimental periodontitis in rats with rheumatoid arthritis.

ABSTRACT

Background: The purpose of this study was to evaluate the effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (HN019) on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis (RA). **Methods:** 28 rats were divided into 4 groups (n = 7): RA (control), RA/PROB (probiotic), RA/EP (experimental periodontitis) and RA/EP/PROB. From day 0, HN019 was added daily to the water of the PROB group animals until the end of the experiment. From day 7, RA was induced by immunizations with bovine collagen type II emulsified in Incomplete Freund's Adjuvant and local applications of Complete Freund's Adjuvant in paws and knees. On day 28, in EP groups, ligatures were positioned around mandibular first molars and remained in position for 11 days. The animals were euthanized on day 39. Microtomographic, histomorphometric, immunoenzymatic and microbiological analyses were performed. Data were statistically analyzed (p < 0.05). **Results:** Group RA/EP/PROB presented reduced alveolar bone loss, TNF- α and IL-6 levels and increased IL-17 levels when compared with group RA/EP. There were no significant differences regarding connective tissue attachment level and IL-10 levels between groups RA/EP and RA/EP/PROB. Group RA/PROB showed decreased anti-citrullinated protein antibodies levels when compared with groups RA and RA/EP. Group RA/EP presented a higher rate of anaerobic/aerobic bacteria than group RA/EP/PROB. **Conclusions:** Administration of HN019 promoted a protective effect against tissue destruction in rats with experimental RA and EP.

Key Words: Probiotics; Periodontitis; Rheumatoid Arthritis; Bone Resorption.

INTRODUCTION

The interest of the scientific community in epidemiological and pathology research on the correlation between periodontitis and rheumatoid arthritis (RA) has increased, and a strong bidirectional relationship between them has been demonstrated¹. RA has been suggested to dysregulate the host immune response in the periodontium, with increased susceptibility to destructive periodontitis¹. On the other hand, periodontitis may be an important factor for the initiation and maintenance of autoimmune inflammatory responses in RA². One of the biological explanations for the possible role of periodontitis in the etiopathogenesis of RA is related to *Porphyromonas gingivalis*, the only microorganism capable of producing the *Porphyromonas gingivalis* peptidyl arginine deiminase (PPAD), an enzyme capable of citrullinating pathogenic and humans proteins, thus creating antigens that can initiate an autoantibody response in RA³.

The gold standard treatment for periodontitis, scaling and root planing (SRP), may have limitations in cases of severe disease⁴ and increased susceptibility (due to systemic, genetic and environmental factors) to disease, with impaired response to therapy⁵. Adjunctive therapies for SRP, such as antimicrobials and probiotics, have been proposed over the years^{6,7}. Probiotics are live microorganisms, mainly bacteria, safe for consumption and capable of producing beneficial effects on the host's health when ingested in sufficient quantities⁸. They may act on both the bacterial medium and the host, modulating the immune-inflammatory response⁹.

Probiotics have emerged as a potential therapy in RA. It has been suggested that there is a relationship between the manipulation of the gut microbiota and RA activity¹⁰. Probiotic supplementation may also decrease proinflammatory cytokine expression and increase anti-inflammatory cytokine production, which may be reflected in symptom relief and reduction in

RA activity¹¹. Studies on the effects of probiotics on the prevention, control and treatment of periodontal diseases have shown that they can promote the reduction of periodontal pathogens^{12,13}, improve periodontal clinical parameters¹³, reduce salivary levels of prostaglandin E2 and matrix-metalloproteinases and proinflammatory cytokine levels in gingival crevicular fluid^{14,15}, inhibit the development of gingivitis¹⁶ and potentiate the effects of SRP in chronic periodontitis (CP) patients^{6,17,18}.

Studies that evaluated the effects of probiotics on periodontal tissues have predominantly used microorganisms of the genus *Lactobacillus*^{6,18}. However, other potential strains deserve investigation, such as *Bifidobacterium* species, capable of successful integration with subgingival biofilm communities¹⁹. It has been demonstrated that *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* can survive in saliva and bind to *Fusobacterium nucleatum*-covered hydroxyapatite; this may be relevant to periodontal therapy, since this co-aggregation may reduce the number of periodontopathogens in the oral biofilm²⁰.

The potential of the strain *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (HN019), as an adjunct to SRP or not, on experimental periodontitis was previously shown by the author's group^{21,22}. Topical or systemic administration of this probiotic reduced alveolar bone and connective tissue attachment losses, positively influenced the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and favored health-compatible bacterial species in the oral biofilm^{21,22}. Recently, in a randomized controlled clinical trial, the use of HN019 as an adjunct to SRP promoted additional clinical, microbiological and immunological benefits in the treatment of CP (unpublished observations).

Based on evidence of a close relationship between periodontitis and RA, therapies aimed at controlling the factors known to be involved in the etiopathogenesis of both conditions seem promising. To the best of the authors' knowledge, there are no studies evaluating the effects of probiotic administration on the association periodontitis-RA. The aim

of this study was to evaluate the effects of administration of HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental RA.

METHODS

Sample

The experiments were conducted at the School of Dentistry of Ribeirão Preto in compliance with the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of São Paulo (Approval number 2016.1.441.58.6). The study was carried out following the ethical principles of animal experimentation, educational and scientific principles of vivisection, the Universal Declaration of Animal Rights (UNESCO) and international standards (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy of Science, USA, 1996).

Sample size calculation was performed by the Graphpad Statemate 2.0 software ^{II}. Optimal sample size to ensure a statistical power of 80% was calculated to detect differences of 20% between the groups. Changes in bone volume (BV) of furcation of mandibular first molar (M1) $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$ was considered as primary outcome, with 95% confidence interval ($\alpha=0.05$) and standard deviation (σ) of 17.5%²². Sample size was calculated using the equation: $n \geq x(Z\alpha + Z\beta)^2$, and a minimum of 6 animals were required for this study. Considering possible losses related to the animals' sensitivity to the experimental protocols of RA and periodontitis, 8 animals were included in each experimental group.

Experimental model

Thirty-two male rats (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), aged 2 to 3 months, weighing between 250 and 300 g were used. The animals were maintained at a temperature

ranging from 22 to 24°C, and under a 12:12 light/dark cycle and consumed selected solid feed and water *ad libitum*. Each rat was randomly allocated to one of the following experimental groups (n=8): RA, RA/PROB (probiotic), RA/EP (experimental periodontitis) and RA/EP/PROB (EP+PROB).

All analyses were performed by calibrated examiners, who were blinded to the study groups.

Probiotic administration

Freeze-dried *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019[¶] was cultured at 37°C for 48 hours in MRS agar[#] under anaerobic condition^{**}. The colonies obtained were deposited in tubes^{††} and washed three times by centrifugation at 2,000g for 10 minutes with Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.0^{‡‡}. The pellet was then resuspended in PBS and kept under refrigeration at 4°C as a probiotic storage media. The probiotic suspensions were then standardized by determination of the optical density (O.D.) in a spectrophotometer^{§§} at the wavelength of 625 nm. Aliquots of this suspension were diluted by serial decimal dilution and seeded in duplicate on MRS agar plates. After incubation in anaerobic conditions for 48 hours at 37°C, the number of colony forming units (CFU/mL) was counted. Thus, the O.D. obtained was 2.9-3.0 corresponding to the standardized inoculum of 1.5×10^{11} CFU/mL. In order to ensure the viability of the probiotic agent administered to the animals, stock suspensions were prepared every 48 hours.

In PROB groups, the stock suspension of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 was added to each 400 mL of deionized water supplied to the animals in order to reach a dose of 1.5×10^9 CFU/mL. In order to ensure bacterial viability throughout the study, the water containing the probiotic HN019 offered to the animals was renewed every morning. The period of probiotic use was 39 days, from day 0 (baseline) on.

Induction of RA and its evaluation

For the induction of RA, two immunizations with bovine type II collagen^{||} emulsified in Incomplete Freund's Adjuvant^{¶¶}, on days 7 and 14 of the experiment, and a third immunization with Complete Freund's Adjuvant^{##} on day 21 of the experiment, were performed, as described by Correa et al. (2017)²³.

The development of RA was confirmed based on visual examination of the animals' hind paws, using the Disease Activity Index (DAI) score²⁴. A 0-3 score was given to each of the three parameters assessed – inflammation, mobility and discomfort, and the final score expressed as the sum of the scores (maximum of 18 points, considering both paws). In addition, both hind paws were examined for swelling by using an analog micrometer^{***25}, and the average between these two measures considered for analysis. Both DAI and paw swelling evaluations were performed once a week.

RA was also evaluated by measurement of serum anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) levels on the day of euthanasia. The samples were centrifuged at 3,000g for 10 minutes and serum aliquots stored at -80°C for further analysis. ACPA serum concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay using a commercially available kit^{†††}, according to the manufacturer's recommendations. The samples were analyzed by a spectrophotometer reader^{†††} at a wavelength of 450 nm. For evaluation of ACPA, a control group (group C, n=7), in which there was no PROB administration or induction of RA or periodontitis, was used as reference.

Induction of periodontitis

On day 28, animals of groups RA/EP and RA/EP/PROB were anesthetized by an intraperitoneal injection of xylazine (10 mg/kg body weight)^{§§§} and ketamine (80 mg/kg body

weight)^{|| ||}. A cotton ligature was placed around their right and left M1 and remained in place until the end of the experiment²⁶.

On day 39, the animals were anesthetized as previously described and blood collection was performed by cardiac puncture. Then they were euthanized by a lethal dose (150 mg/kg) of sodium thiopentate^{¶¶¶}. Samples of bacterial biofilms along the ligature were collected in RA/EP and RA/EP/PROB groups for microbiological analysis. Gingival biopsies of right M1 were obtained from the buccal and lingual areas of each animal for enzyme immunoassays. The right and left jaws were dissected and collected for analysis using microcomputed tomography and histometry, respectively.

Microcomputed tomography (micro-CT) analyses

Non-demineralized specimens were scanned by a cone-beam micro-CT system^{###}, as previously described²¹. Linear measurements between the cemento-enamel junction (CEJ) and the alveolar bone crest were performed at buccal, lingual, interproximal and furcation sites of M1, and summed to express the alveolar bone level (ABL) value of each animal, as previously mentioned²⁷. Volumetric measurements to determine the BV in the furcation area of M1 were also performed, as previously described²¹.

Histopathological and histometric analyses

The specimens were decalcified in 4% ethylenediaminetetraacetic acid solution, processed and embedded in paraffin. Serial sections (4-µm thickness) were obtained in the mesiodistal direction and stained with hematoxylin and eosin. Histopathological analysis was performed with the aid of light microscopy^{****}. Histometric analysis were performed by linear measurements between the CEJ and the connective tissue attachment on the distal root

of M1, obtaining the connective tissue attachment level (CAL), using specific software^{††††}. The mean of two histological sections of each animal was calculated to obtain the CAL²¹.

Immunoenzymatic analysis

Quantification of cytokine levels (tumor necrosis factor [TNF]- α , interleukin [IL]-6, IL-17 and IL-10) was performed using commercially available kits^{††††} in a multiplexing instrument^{§§§§}, following the manufacturers' recommendations. After homogenization, the supernatants were thawed, and concentrations of each cytokine estimated from the standard curve using a five-parameter polynomial equation and specific software^{|| || || || 21}.

Microbiological analysis

The biofilm samples collected with the ligatures of the RA/EP and RA/EP/PROB groups were incubated under aerobic and anaerobic conditions for 7 days at 35°C for counting of total viable CFU²⁸. The ratio between anaerobic and aerobic bacteria was calculated for RA/EP and RA/EP/PROB groups.

Statistical analysis

The BV obtained from the microtomographic analysis was considered the primary outcome measure of this study, whereas the other parameters considered secondary variables. Continuous variables were expressed as means and standard deviations and ordinal variables as medians, maximum and minimum values and interquartile range. Normality and homoscedasticity of the data were examined, and the significance level of 5% was adopted ($p < 0.05$).

Data related to validation of the RA model using DAI, between- and within group comparisons (at each experimental time point, and throughout the experimental period,

respectively), were analyzed by Kruskal Wallis test followed by Dunn's post hoc test. Between- and within-group comparisons of paw swelling data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. Comparison of serum ACPA levels between RA groups and control group (without RA) was made by t-Test. Considering RA groups, between-group comparisons were performed by ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Between-group comparisons for BV, ABL, CAL and mean levels of TNF- α , IL-6, IL-17 and IL-10 were determined by ANOVA followed by Tukey post hoc test. For analysis of microbiological data, intergroup differences were evaluated by t-Test.

RESULTS

Four animals, one from each experimental group, died, remaining 7 animals per group. The other animals tolerated well all the experiments throughout the study.

Evaluation of RA induction

In within-group comparisons, groups with RA presented significantly higher DAI scores and paw swelling on days 28 and 35 of the experiment when compared with baseline ($p < 0.05$) (Table 1). RA and RA/EP groups had significantly higher levels of ACPA when compared to C and RA/PROB groups ($p < 0.05$) (Table 1).

Micro-CT analyses

RA/EP/PROB group showed higher BV and lower ABL when compared with RA/EP group ($p < 0.05$; Figure 1). Figure 2 shows representative images of three-dimensional rendered reconstructions of the hemi-mandibles of all groups.

Histopathological analysis

Microphotographs of the furcation area and the interproximal region between first and second mandibular molars are shown in Figure 3.

In RA group, there was a small amount of inflammatory cells, inflammatory infiltration extending to all connective tissue in the furcation area, few areas of active external apical root resorption, bone resorption within normal range, moderate amount of fibroblasts and collagen fibers, irregular trabecular bone covered by osteoblasts and active osteoclasts (Figure 3A, 3B).

The RA/PROB group showed an inflammatory infiltrate extending to part of the connective tissue in the furcation area, areas of inactive external root resorption and huge amounts of collagen fibers (Figure 3D, 3E). The other histopathological features were similar to the ones presented by group RA.

In the RA/EP group, there was a large amount of inflammatory cells, an inflammatory infiltrate extending to all connective tissue and bone tissue in the furcation area, many areas of active external root resorption, moderate amount of bone resorption, small amounts of collagen fibers and fibroblasts, presence of interstitial edema, areas of necrotic bone and irregular trabecular bone covered by active osteoclasts (Figure 3G, 3H).

The RA/EP/PROB group had a moderate amount of inflammatory cells, inflammatory infiltrate extending to part of the connective tissue in the furcation area, few areas of active external root resorption, a few bone resorption areas, moderate amount of fibroblasts and collagen fibers, irregular bone trabeculae covered by osteoblasts and active osteoclasts (Figure 3J, 3K).

Histometric analysis

RA/EP (0.5834 ± 0.106 ; Figure 3I) and RA/EP/PROB (0.4559 ± 0.1031 ; Figure 3L)

groups showed significantly higher CAL when compared to RA (0.06808 ± 0.0339 ; Figure 3C) and RA/PROB (0.1222 ± 0.1046 ; Figure 3F) groups ($p < 0.05$). In addition, no difference was found in CAL between groups RA/EP/PROB and RA/EP.

Immunoenzymatic analyses

RA/EP/PROB group had lower TNF- α and IL-6 levels as compared to RA/EP group ($p < 0.05$; Figure 4A, 4B). Higher IL-17 levels were observed in the RA/EP/PROB group than in the RA/EP group ($p < 0.05$; Figure 4C). There was no difference in IL-10 levels when RA/EP/PROB and RA/EP groups were compared ($p > 0.05$; Figure 4D).

Microbiological analysis

The ratio of anaerobic/aerobic bacteria was significantly higher in RA/EP group as compared to RA/EP/PROB group ($p < 0.05$; Figure 5).

DISCUSSION

RA and EP have similarities in their pathogenesis²⁹, including characteristics of chronic inflammation fed by a similar set of proinflammatory cytokines^{29,30}. It can be inferred that a treatment that affects both immuno-inflammatory response and microbiota could have potential application in RA patients with periodontitis. In this context, probiotics emerge as a therapy with favorable effects on bacterial and host environments, modulating the immune-inflammatory response^{9,31}.

In the present study, the use of HN019 was shown to reduce alveolar bone loss, evidenced by microtomographic analysis of BV and ABL when the treated (RA/EP/PROB)

and untreated (RA/EP) groups were compared. These results corroborate other preclinical studies of our research group^{21,22}, that also demonstrated a significant reduction of alveolar bone loss in animals with EP that received HN019, administered locally or systemically. In fact, several probiotic strains have been used, with positive results on the reduction of alveolar bone loss^{27,28,32}. Regarding the effects of probiotics on periodontal attachment level, several controlled clinical studies have demonstrated the benefits of probiotics as adjunctive therapies to SRP in CP^{6,15,33,34}. Preclinical studies have also shown that probiotics, including HN019, reduced histological attachment loss^{27,21,22,35}. In the present study, there was no significant difference in the CAL between the groups treated and not treated with probiotics. However, analysis of results revealed a tendency for a decrease in the CAL in the group with EP and treated with HN019 (p=0.0900).

In our study, the reduced alveolar bone loss and less intense inflammation in animals treated with HN019 can be explained by its antibacterial and immuno-inflammatory properties, which have been also demonstrated in preclinical and clinical studies^{21,22,36}.

The probiotic HN019 acts positively on the immune system, by increasing lymphocyte activity and phagocytic capacity of peripheral blood mononuclear cells³⁶. Cytokines that play an important role in both periodontitis and RA include TNF- α , IL-6, IL-17 and IL-10^{29,30,36,37}. In the present study, the levels of TNF- α in the gingival tissue of the RA/EP group were significantly higher than in the RA/EP/PROB group, which may be one of the explanations for the lower bone loss observed in animals treated with HN019. This result corroborates preclinical and clinical studies with other probiotic strains^{28,38,39}. To the best of our knowledge, TNF- α levels had not been evaluated in studies using HN019. However, Oliveira et al. (2017)²¹ found that the immunolabeling pattern of beta-defensin (BD)-3 increased significantly in animals with EP treated with HN019. This finding is relevant, since the increase in BD-3 is directly related to the decrease in TNF- α levels in periodontal tissues⁴⁰.

In this study, IL-6 levels were significantly reduced in gingival tissues of RA/EP/PROB animals when compared to untreated animals (RA/EP group), which is compatible with the lower bone resorption observed in treated animals. A recent meta-analysis has led to the conclusion that the use of probiotics promotes a significant reduction of IL-6 levels in patients with RA³⁷. Previous findings have also demonstrated reductions in IL-6 levels in animals with EP treated with other probiotic strains^{28,38}.

A significant increase in IL-17 levels was observed in gingival tissues of the animals with EP treated with HN019, as compared to EP animals that did not receive treatment. Conversely, the administration of other probiotics significantly reduced IL-17 expression in gingival tissues of animals with EP and in the gingival crevicular fluid of patients with CP in previous studies^{15,28}. One of the hypotheses to explain this difference in results is that IL-17 may play a role in the mediation of innate immunity against pathogens³⁰, be it protective or destructive roles⁴¹. Another interesting finding is that TNF- α blocking therapy, administered in both collagen-induced arthritis model and in humans, led to a decrease in TNF- α and an increase in the expression of Th17 and Th1 cells, that produce IL-17 and IFN (interferon)- γ , respectively⁴². In the present study, there was also a decrease in TNF- α levels and an increase in IL-17 levels in gingival tissues of animals with periodontitis treated with probiotics, which may indicate a protective action of this cytokine in periodontal inflammation, since animals treated with HN019 presented less bone loss and less inflammation.

Some studies have shown that the administration of some probiotics, including HN019, led to an increase in IL-10 levels in rats with EP^{22,27,39}. In the present study, although no significant differences were found in IL-10 levels in gingival tissues of the RA/EP/PROB group when compared to those in the RA/EP group, there was a tendency ($p=0.08$) to higher levels of IL-10 in the treated group. Oliveira and colleagues (2017)²¹ also did not observe significant differences in IL-10 levels in gingival tissues of HN019-treated EP rats compared

to untreated animals. However, these authors observed a lower ratio of IL-1 β /IL-10 in the group treated with HN019²¹.

It is known that the ligature-induced periodontitis model in rats reproduces a microbial profile similar to that found in periodontitis in patients²³. In this study, the animals of group RA/EP/PROB showed a significant reduction in the ratio of anaerobic to aerobic bacteria in the biofilm of the ligatures when compared to the animals of group RA/EP. Although this is a preliminary microbiological analysis, this effect of HN019 treatment is relevant and compatible with previous results obtained from rats with EP treated with this probiotic strain^{21,22}. Treatment with HN019 led to lower proportions of periodontopathogenic microbial species and higher proportions of species compatible with periodontal health²¹. In vitro, HN019 was shown to have antimicrobial effects, inhibiting the growth of periodontopathogens such as *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* (unpublished observations).

ACPA are highly specific for RA, being present in more than 90% of patients, and related to increased progression and severity of disease destruction⁴³. In the present study, animals in group RA/PROB had a significant reduction in ACPA levels when compared to those in the RA group. To the best of the authors' knowledge, this is the first study to show beneficial effects of a probiotic strain on the ACPA marker. It can be hypothesized that the effect of HN019 on the reduction of ACPA levels is based on its effect on intestinal microbiota and on formation of neutrophil extracellular traps (NETs). Increasing evidence suggests an association between intestinal dysbiosis and rheumatic diseases⁴⁴. This dysbiosis can lead to immunological alterations and to the breakdown of self-tolerance to citrullinated autoantigens⁴⁵. In this regard, the effect of the probiotic therapy may be a positive modulation of the intestinal microbiota in animals with RA. Another source of citrullination of proteins

would be cellular apoptosis, necrosis and formation of excessive NETs, which occur under conditions of pathological inflammation⁴⁶. The action of a probiotic, *Lactobacillus rhamnosus*, on the formation of NETs was evaluated in vitro using neutrophils derived from the bone marrow of mice and differentiated neutrophils derived from human myeloid cells⁴⁷. The authors observed that *Lactobacillus rhamnosus* led to a significant reduction in the formation of NETs. Thus, it may be hypothesized that HN019 also had an effect on inflammation in general and on the formation of NETs in our study, leading to a reduction in the systemic levels of ACPA. Although probiotic therapy positively influenced ACPA levels in the present study, it had no clinical effect on RA signs, assessed by DAI score and paw swelling.

When ACPA levels were evaluated in animals with EP, significant differences were not found between the group treated with HN019 and the untreated group. However, it is relevant to mention that there was a tendency ($p=0.0793$) for reduction of ACPA levels in the RA/EP/PROB group. Furthermore, group RA/EP/PROB presented no difference in ACPA levels in relation to the group of healthy animals (group C). It is known that periodontal inflammation is not limited to the extension of periodontal tissues, and hence there may be systemic repercussions of this inflammatory process⁴⁸. Thus, it may be hypothesized that in the presence of periodontal inflammation, oral dysbiosis, generation of ACPA from *Porphyromonas gingivalis*⁴⁹, and production of NETs in response to periodontopathogens⁵⁰, the probiotic therapy, in the treatment period and dosage administered in this study, was not sufficient to yield a statistically significant effect on ACPA levels in the EP groups.

It is important to emphasize that this study has inherent limitations of an experimental study in rats. Thus, the present findings need to be corroborated by more advanced experimental models (in terms of the phylogenetic scale) and also by clinical studies. In addition, other dosages, frequency and administration forms of HN019 need to be evaluated in

the RA-periodontitis association, including the investigation of systemic inflammatory markers.

CONCLUSION

It can be concluded that the administration of *B. lactis* HN019 promoted a protective effect against tissue destruction in rats with experimental RA and periodontitis.

FOOTNOTES

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

†Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

‡Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

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

||GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA.

¶HOWARU TM Bifido, E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE, USA.

#Oxoid Australia Pty Ltd, Adelaide, Australia.

**BD GasPak EZ TMBD GasPak EZ™, North Ryde, Australia.

†† Centrifuge tube, K19-0050, Kasvi, Sao Jose dos Pinhais, PR, Brazil.

‡‡Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA.

§§ Micronal AJX-1000, Sao Paulo, SP, Brazil.

|||C9879-1g; Sigma-Aldrich, Sao Paulo, SP, Brazil.

¶¶F5506-10 mL, Sigma-Aldrich, Sao Paulo, SP, Brazil.

F5881-10 mL, Sigma-Aldrich, Sao Paulo, SP, Brazil.

***103-137 Mitutoyo®, Suzano, SP, Brazil.

†††ELABSCIENCE E-EL-R1431- Rat ACCPA, MyBiosource, San Diego, CA, USA.

†††TP-Reader, ThermoPlate®, Sao Paulo, SP, Brazil.

§§§Rompum®, Bayer Animal Health, Sao Paulo, SP, Brazil.

|||Dopalen®, Ceva Animal Health Ltda., Paulínia, SP, Brazil.

¶¶¶Thiopentax®, Cristalia Pharmaceutical Chemicals Ltda., Sao Paulo, SP, Brazil.

###Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Belgium.

****DFC295, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany.

††††Image J, version 1.31p, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

††††RECYTMAG 65K 06, Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, USA.

§§§§MAGPIX®analyzer, Luminex Corporation, Austin, TX, USA.

|||||xPONENT®, Luminex Corporation, Austin, TX, USA.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES- Brasilia, DF, Brazil; Process 2243373) and the National Council for Research and Technological Development (CNPq- Brasilia, DF, Brazil; Process 133228/2016-9).

The authors thank Marina Del Arco (Laboratory Assistant, Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo-USP, Ribeirao Preto / SP, Brazil) for technical support during the microbiological procedures. The authors also thank Milla Tavares Ricoldi and Adriana Almeida (Laboratory Assistants, Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirao Preto/SP, Brazil) for technical support during the histopathological and microtomographic procedures, respectively.

Disclosure of conflict of interests

All authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Mercado F, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? *J Clin Periodontol* 2000;27:267-272.
2. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:727-730.
3. de Smit MJ, Westra J, Brouwer E, Janssen KM, Vissink A, van Winkelhoff AJ. Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: What Do We Know? *J Periodontol* 2015;86:1013-1019.
4. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000* 2011;55:36-47.
5. Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 2010;53:138-153.
6. Tekce M, Ince G, Gursoy H, et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol* 2015;42:363-372.
7. Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2018;76:85-96.
8. Nations FaAOotU, Organization. WH. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, report of a Joint FAO/ WHO Expert Consultation, Cordoba, Argentina, 1-4 October 2001. . In, 2001.

9. Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol* 2011;38 Suppl 11:159-177.
10. Hatakka K, Martio J, Korpela M, et al. Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis--a pilot study. *Scand J Rheumatol* 2003;32:211-215.
11. Alipour B, Homayouni-Rad A, Vaghef-Mehrabany E, et al. Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. *Int J Rheum Dis* 2014;17:519-527.
12. Zahradnik RT, Magnusson I, Walker C, McDonell E, Hillman CH, Hillman JD. Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. *J Appl Microbiol* 2009;107:682-690.
13. Tsubura S, Mizunuma H, Ishikawa S, et al. The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1353-1356.
14. Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis* 2007;13:376-385.
15. Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpiński TM. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014;62:495-500.

16. Staab B, Eick S, Knöfler G, Jentsch H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J Clin Periodontol* 2009;36:850-856.
17. Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol* 2010;2.
18. İnce G, Gürsoy H, İpçi Ş, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yılmaz S. Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2015;86:746-754.
19. Jäsberg H, Söderling E, Endo A, Beighton D, Haukioja A. Bifidobacteria inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. *Eur J Oral Sci* 2016;124:251-258.
20. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:326-332.
21. Oliveira LF, Salvador SL, Silva PH, et al. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol* 2017;88:197-208.
22. Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One* 2017;12:e0179946.

23. Corrêa MG, Sacchetti SB, Ribeiro FV, et al. Periodontitis increases rheumatic factor serum levels and citrullinated proteins in gingival tissues and alter cytokine balance in arthritic rats. *PLoS One* 2017;12:e0174442.
24. Lohman RJ, Cotterell AJ, Barry GD, et al. An antagonist of human protease activated receptor-2 attenuates PAR2 signaling, macrophage activation, mast cell degranulation, and collagen-induced arthritis in rats. *FASEB J* 2012;26:2877-2887.
25. Nowak B, Ciszek-Lenda M, Sróttek M, et al. Lactobacillus rhamnosus exopolysaccharide ameliorates arthritis induced by the systemic injection of collagen and lipopolysaccharide in DBA/1 mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012;60:211-220.
26. Lisboa MR, Gondim DV, Ervolino E, et al. Effects of electroacupuncture on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2015;86:801-811.
27. Messori MR, Pereira LJ, Foureaux R, et al. Favourable effects of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis on experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2016;66:108-119.
28. Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic Lactobacillus brevis CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontol Res* 2014;49:785-791.
29. Kobayashi T, Yoshie H. Host Responses in the Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis. *Curr Oral Health Rep* 2015;2:1-8.
30. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000* 2015;69:142-159.
31. Rovenský J, Stancíková M, Svík K, Utesený J, Bauerová K, Jurcovicová J. Treatment of adjuvant-induced arthritis with the combination of methotrexate and

probiotic bacteria *Escherichia coli* O83 (Colinfant). *Folia Microbiol (Praha)* 2009;54:359-363.

32. Messori MR, Oliveira LF, Foureaux RC, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2013;84:1818-1826.

33. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2013;40:1025-1035.

34. Morales A, Gandolfo A, Bravo J, et al. Microbiological and clinical effects of probiotics and antibiotics on nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo- controlled trial with 9-month follow-up. *J Appl Oral Sci* 2018;26:e20170075.

35. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 2001;74:833-839.

36. Sumer AP, Kara N, Keles GC, Gunes S, Koprulu H, Bagci H. Association of interleukin-10 gene polymorphisms with severe generalized chronic periodontitis. *J Periodontol* 2007;78:493-497.

37. Mohammed AT, Khattab M, Ahmed AM, et al. The therapeutic effect of probiotics on rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *Clin Rheumatol* 2017;36:2697-2707.

38. Kobayashi R, Kobayashi T, Sakai F, Hosoya T, Yamamoto M, Kurita-Ochiai T. Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective in preventing *Porphyromonas gingivalis*-accelerated periodontal disease. *Sci Rep* 2017;7:545.
39. Garcia VG, Knoll LR, Longo M, et al. Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2016;51:26-37.
40. Cui D, Lyu J, Li H, et al. Human β -defensin 3 inhibits periodontitis development by suppressing inflammatory responses in macrophages. *Mol Immunol* 2017;91:65-74.
41. Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, et al. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 2007;109:3794-3802.
42. Notley CA, Inglis JJ, Alzabin S, McCann FE, McNamee KE, Williams RO. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* 2008;205:2491-2497.
43. Snir O, Widhe M, Hermansson M, et al. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2010;62:44-52.
44. Jethwa H, Abraham S. The evidence for microbiome manipulation in inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2017;56:1452-1460.
45. Horta-Baas G, Romero-Figueroa MDS, Montiel-Jarquín AJ, Pizano-Zárate ML, García-Mena J, Ramírez-Durán N. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res* 2017;2017:4835189.

46. Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr Rheumatol Rep* 2014;16:408.
47. Vong L, Lorentz RJ, Assa A, Glogauer M, Sherman PM. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 2014;192:1870-1877.
48. Hasturk H, Kantarci A. Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontol 2000* 2015;69:255-273.
49. Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2004;28:311-318.
50. Hirschfeld J, Dommisch H, Skora P, et al. Neutrophil extracellular trap formation in supragingival biofilms. *Int J Med Microbiol* 2015;305:453-463.

TABLE

Table 1- Parameters for the evaluation of RA induction.

VARIABLE	PERIOD	EXPERIMENTAL GROUPS				C
		RA	RA/PROB	RA/EP	RA/EP/PROB	
DAI (scores) <i>Median-IR (V_{MA}- V_{MI})</i>	<i>Baseline</i>	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	-
	7 days	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	0-0 (0-0)	-
	14 days	1-1 (3-0)	1-2 (0-2)	1-2 (0-2)	1-2 (0-2)	-
	21 days	5-2 (3-9)	3-1 (2-6)	5-2 (4-7)	5-3 (4-10)	-
	28 days	12-4 (6-13)*	12-6 (6-13)*	8-5 (7-15)*	9-7 (5-16)*	-
	35 days	10-2 (8-13)*	9-7 (6-14)*	9-3 (7-13)*	10-2 (7-13)*	-
Paw Swelling (mm) <i>Mean±SD</i>	<i>Baseline</i>	5.88±0.38	5.92±0.42	5.92±0.42	5.96±0.27	-
	7 days	6.23±0.18	5.92±0.30	6.15±0.52	6.18±0.42	-
	14 days	6.17±0.22	5.92±0.43	6.04±0.36	6.10±0.28	-
	21 days	6.57±1.90	6.32±0.15	6.81±0.44	6.64±0.43	-
	28 days	8.83±0.95 [†]	8.17±0.91 [†]	7.96±0.78 [†]	7.84±0.72 [†]	-
	35 days	7.69±0.65 [†]	7.76±0.64 [†]	7.78±0.76 [†]	7.45±0.42 [†]	-
ACPA (UI/mL) <i>Mean±SD</i>	39 days	651.4±95.51 ^{‡§}	281.1±124.1	603.2±202 ^{‡§}	431.7±191.3	331.8±115.5

*Significant difference when compared with baseline (Kruskal-Wallis, Dunn, p<0.05).

[†]Significant difference when compared with baseline (two-way ANOVA, Tukey, p<0.05).[‡]Significant difference when compared with group C (t-Test, p< 0.05).[§]Significant difference when compared with group RA/PROB (ANOVA, Tukey, p<0.05).DAI = Disease Activity Index; IV = interquartile range; V_{MA} = maximum value of assigned score; V_{MI} = minimum value of assigned score; SD = standard deviation, ACPA= anti-citrullinated protein antibodies.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Micro-CT analyses. Means and standard deviations of BV (%) (**A**) and ABL (μm) (**B**) of the specimens, with comparisons between groups. Different letters indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).

Figure 2 - Three-dimensional rendered reconstructions of the microtomographic sections of groups RA (**A, B**), RA/PROB (**C, D**), RA/EP (**E, F**) and RA/EP/PROB (**G, H**). Images of external buccal surfaces (**A, C, E** and **G**) and images of sagittal sections demonstrating internal surfaces (**B, D, F** and **H**). Three-dimensional microtomographic images were obtained using appropriate software (CTVox®, version 3.1.0, Bruker, Kontich, Belgium).

Pixel size = 7.96 μm .

Figure 3 - Photomicrographs of periodontal tissues in the furcation area (**A, B, D, E, G, H, J, K**) and in the interproximal (distal) area (**C, F, I, L**) of M1. Groups RA (**A, B, C**), RA/PROB (**D, E, F**), RA/EP (**G, H, I**) and RA/EP/PROB (**J, K, L**). Original augmentation = x10 (**A, D, G, J**); x20 (**B, C, E, F, H, I, K, L**) (Hematoxylin and eosin stain).

FR = furcation roof; AB = alveolar bone; red arrow = blood vessel; black arrowhead = cementoclast; black arrow = cemento-enamel junction; white arrow = connective tissue attachment; M1 = mandibular first molar; asterisk = unorganized collagen fibers and interstitial edema; unfilled black arrowhead = collagen fibers interposed between alveolar bone and root cementum.

Figure 4 - Immunoenzymatic analyses. Mean levels (pg/mL) and standard deviations of TNF- α (**A**), IL-6 (**B**), IL-17 (**C**) and IL-10 (**D**), with comparisons between groups. Different letters indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).

Figure 5 - Microbiological analysis. Means and standard deviations of the ratios of the total amount of CFUs of anaerobic / aerobic bacteria present in the biofilm of the ligatures of groups RA/EP and RA/EP/PROB. *=significant difference between groups (t-Test, $p < 0.05$).

Figure 1 - Micro-CT analyses. Means and standard deviations of BV (%) (**A**) and ABL (μm) (**B**) of the specimens, with comparisons between groups. Different letters indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).

Figure 2 - Three-dimensional rendered reconstructions of the microtomographic sections of groups RA (**A**, **B**), RA/PROB (**C**, **D**), RA/EP (**E**, **F**) and RA/EP/PROB (**G**, **H**). Images of external buccal surfaces (**A**, **C**, **E** and **G**) and images of sagittal sections demonstrating internal surfaces (**B**, **D**, **F** and **H**). Three-dimensional microtomographic images were obtained using appropriate software (CTVox®, version 3.1.0, Bruker, Kontich, Belgium). Pixel size = 7.96 μm .

Figure 3 - Photomicrographs of periodontal tissues in the furcation area (A, B, D, E, G, H, J, K) and in the interproximal (distal) area (C, F, I, L) of M1. Groups RA (A, B, C), RA/PROB (D, E, F), RA/EP (G, H, I) and RA/EP/PROB (J, K, L). Original augmentation = x10 (A, D, G, J); x20 (B, C, E, F, H, I, K, L) (Hematoxylin and eosin stain). FR = furcation roof; AB = alveolar bone; red arrow = blood vessel; black arrowhead = cementoclast; black arrow = cemento-enamel junction; white arrow = connective tissue attachment; M1 = mandibular first molar; asterisk = unorganized collagen fibers and interstitial edema; unfilled black arrowhead = collagen fibers interposed between alveolar bone and root cementum.

Figure 4 - Immunoenzymatic analyses. Mean levels (pg/mL) and standard deviations of TNF- α (A), IL-6 (B), IL-17 (C) and IL-10 (D), with comparisons between groups. Different letters indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).

Anaerobic/aerobic bacteria ratio

Figure 5 - Microbiological analysis. Means and standard deviations of the ratios of the total amount of CFUs of anaerobic / aerobic bacteria present in the biofilm of the ligatures of groups RA/EP and RA/EP/PROB. *=significant difference between groups (t-Test, $p < 0.05$).