

AMÁLIA CRISTINA DE SOUZA CATARUCI

**Efeito de probióticos do gênero *Lactobacillus* sobre a perda óssea alveolar
promovida por periodontite induzida em camundongos**

São Paulo

2019

AMÁLIA CRISTINA DE SOUZA CATARUCI

Efeito de probióticos do gênero *Lactobacillus* sobre a perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongos

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia, para obter o título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Pinto Alves Mayer

São Paulo

2019

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Cataruci, Amália Cristina de Souza.

Efeito de probióticos do gênero *Lactobacillus* sobre a perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongos / Amália Cristina de Souza Cataruci; orientadora Marcia Pinto Alves Mayer -- São Paulo, 2019.

89 p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Periodontite experimental. 2. Porphyromonas gingivalis. 3. Lactobacillus. 4. Probióticos. 5. Perda óssea alveolar. I. Mayer, Marcia Pinto Alves. II. Título.

Cataruci ACS. Efeito de probióticos do gênero *Lactobacillus* sobre a perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: 06/03/2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Claudio Mendes Pannuti

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Atlas Edson Moleros Nakamae

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Julgamento: Aprovada

AGRADECIMENTOS

A gratidão e o trabalho científico são indissociáveis. Interagir, compartilhar e ensinar compõem as bases do conhecimento. A ciência pode parecer, a princípio, um conceito abstrato, mas essa nada mais é que o resultado de um processo colaborativo entre pessoas que atravessa os tempos. Ainda que sejamos individualmente finitos, nossas obras se perpetuarão e colaborarão para a construção de um futuro que ainda nem sequer imaginamos.

À minha orientadora, Marcia Pinto Alves Mayer, dirijo os mais sinceros agradecimentos. Desde minha primeira visita ao laboratório, ainda muito incerta quanto ao caminho que seria trilhado, fui recebida com o carinho de uma mãe e a orientação de alguém que tem a pesquisa em sua identidade. Trabalhar com ela é inspirar-se diariamente. Obrigada por sempre enxergar o que há de melhor em nós quando nós mesmos não enxergamos.

À minha grande amiga Natali Shimabukuro, agradeço por ter aberto as portas para que eu pudesse me enveredar pelos caminhos da ciência e, desde então, manter-se ao meu lado. Sem o seu apoio, não estaria aqui escrevendo essas palavras.

À admirável mulher e exemplar pesquisadora Karin Hitomi Ishikawa, agradeço por ter me ensinado que inexiste algo que não possa ser aprendido, e que a grandeza pode vir acompanhada de doçura e humildade.

Às companheiras de trabalho Bruna Eduarda de Oliveira e Dione Kawamoto, agradeço pela colaboração fundamental à conclusão deste trabalho.

À equipe do laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), agradeço por todos os conhecimentos compartilhados e pelo excelente ambiente de trabalho no qual tive o privilégio de me inserir.

Ao funcionário do biotério do ICB-USP, Marcos André Alves, agradeço pelo zelo por nossos animais experimentais.

Ao departamento e aos professores do programa de pós-graduação em Periodontia, em especial ao Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti, agradeço pelo suporte e contribuições científicas.

Sou grata, ainda, pelas bases afetivas que me sustentaram por todo o período dedicado a essa pesquisa. A meus pais, Rachel e André Cataruci, agradeço por sempre terem priorizado minha educação e por todos os sacrifícios que permearam esse caminho. À minha irmã, Andressa Cataruci, agradeço pela maior amizade que conhecerei em vida. Ao meu companheiro Danilo Gomes, agradeço por ter um lar ao qual quero voltar todos os dias. Aos amigos Gabriel Mariano e Samanta Vicente, agradeço pela parceria sempre presente e sincera.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esta dissertação fosse realizada e concluída, os meus mais sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processos 2015/18273-9 e 2018/02318-1).

Fazer ciência é, hoje, um ato de resistência.

RESUMO

Cataruci ACS. Dissertação. Efeito de probióticos do gênero *Lactobacillus* sobre a perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

O emprego dos probióticos na área da saúde é extensamente difundido, mas os mecanismos envolvidos no controle de doenças inflamatórias, como a periodontite, ainda são pouco explorados. Bactérias probióticas podem promover a modulação da resposta imune de mucosas e sistêmica, em condições de saúde ou doença. Estudos prévios *in vitro* revelaram que probióticos do gênero *Lactobacillus* são capazes de interferir na formação do biofilme multiespécie formado por *Porphyromonas gingivalis* e espécies de *Streptococcus*, além de interferir nos processos de adesão e invasão em células epiteliais e na resposta destas células ao patógeno periodontal. O presente estudo teve como objetivo determinar a capacidade de duas cepas probióticas do gênero *Lactobacillus* (*L. acidophilus* LA5 e *L. rhamnosus* LR32) de controlar a destruição dos tecidos periodontais em ensaios em modelo murino. As cepas probióticas foram testadas em modelo animal de periodontite experimental induzida por infecção oral polimicrobiana (*P. gingivalis* W83 e ATCC 33277, *P. intermedia* 17, *F. nucleatum* ATCC 25586 e *S. gordonii* DL-1) em camundongos C57BL/6. Os animais foram divididos em seis grupos compostos por oito animais cada, submetidos a diferentes tratamentos via inoculação oral: veículo carboximetilcelulose 2% (SHAM ou P-L-), consórcio microbiano (P+L-), probiótico *L. acidophilus* LA5 [P-L+(LA5)], probiótico *L. acidophilus* LA5 concomitante ao consórcio microbiano [P+L+(LA5)], probiótico *L. rhamnosus* LR32 [P-L+(LR32)] e probiótico *L. rhamnosus* LR32 concomitante ao consórcio microbiano [P+L+(LR32)]. Após o período experimental de 45 dias, foi realizada a eutanásia para posterior análise da perda óssea alveolar por microCT, da expressão de genes que codificam receptores intra e extracelulares e citocinas por RT-qPCR nos tecidos gengivais, dos níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17, IL-4 e IL-10 nos tecidos gengivais, além do ganho de peso dos animais. O modelo de periodontite experimental empregado foi bem-sucedido, com redução de volume ósseo no grupo sob indução da doença periodontal (P+L-). As cepas

probióticas testadas parecem ter sido capazes de prevenir a perda óssea alveolar nos animais experimentais, com volume ósseo dos grupos P+L+(LA5) e P+L+(LR32) semelhante ao observado no grupo SHAM. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na expressão de genes codificando as citocinas pró-inflamatórias *il-1 β* , *tnf- α* , *il-6* e *il-18* no tecido gengival dos animais sob indução da doença periodontal; entretanto, a cepa *L. rhamnosus* LR32 parece levar à maior expressão de *il-1 β* e *tnf- α* , e ainda induziu a uma regulação positiva na expressão de *tlr4* na presença e na ausência do consórcio microbiano [P+L+(LR32) e P-L+(LR32)] em relação ao controle positivo, P+L-. A avaliação dos níveis de citocinas no tecido gengival revelou que o consórcio microbiano induziu a maiores níveis de IL-6 no tecido gengival (grupo P+L-), em relação ao grupo SHAM e àqueles que receberam os probióticos, com ou sem o consórcio microbiano. Por outro lado, o consórcio microbiano (P+L-) não induziu ao aumento dos níveis dos demais mediadores inflamatórios (IL-1 β , TNF- α e IL-17) em relação ao SHAM. No entanto, foi observado aumento dos níveis de IL-1 β , mas também de IL-4 e IL-10 em tecido gengival do grupo P+L+(LA5), quando este foi comparado aos grupos SHAM e P+L-. Além disso, o probiótico *L. rhamnosus* LR32 também induziu a maiores níveis de IL-10 [P-L+(LR32)], mas este efeito foi parcialmente reduzido pela adição do consórcio microbiano [P+L+(LR32)]. A administração do consórcio microbiano não levou a alterações no ganho de peso dos animais (P+L- comparado ao SHAM), mas foi observado ganho de peso significativamente maior no grupo P+L+(LR32), quando comparado ao grupo P+L+(LA5). Assim, considerando as limitações do estudo e a necessidade de investigações posteriores, os dados obtidos indicam que as cepas probióticas testadas têm potencial para a prevenção e o controle da doença periodontal.

Palavras chaves: Periodontite experimental. *P. gingivalis*. *Lactobacillus*. Probióticos. Perda óssea alveolar.

ABSTRACT

Cataruci ACS. Dissertação. Effect of *Lactobacillus* probiotics on alveolar bone loss promoted by induced periodontitis in mice [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

The use of probiotics in health is widely known, but the mechanisms involved in the control of inflammatory diseases, such as periodontitis, are still poorly explored. Probiotic bacteria may promote modulation of the mucosal and systemic immune response under health or disease conditions. Previous *in vitro* studies from our laboratory revealed that probiotics of the genus *Lactobacillus* are capable of interfering in the formation of the multispecies biofilm formed by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus* species, as well as interfering in the adhesion and invasion processes in epithelial cells and in the response of these cells to the periodontal pathogen. The present study aimed to determine the ability of two probiotic strains of the genus *Lactobacillus* (*L. acidophilus* LA5 and *L. rhamnosus* LR32) to control the destruction of periodontal tissues in murine model assays. Probiotic strains were tested in an animal model of experimental periodontitis induced by oral polymicrobial infection (*P. gingivalis* W83 e ATCC 33277, *P. intermedia* 17, *F. nucleatum* ATCC 25586 e *S. gordonii* DL-1) in C57BL/6 mice. The animals were divided into six groups composed of eight animals each, submitted to different treatments by oral inoculation: 2% carboxymethylcellulose vehicle (SHAM or P-L-), microbial consortium (P+L-), probiotic *L. acidophilus* LA5 [P-L+(LA5)], *L. acidophilus* LA5 probiotic concurrent with the microbial consortium [P+L+(LA5)], *L. rhamnosus* LR32 probiotic [P-L+(LR32)] and *L. rhamnosus* LR32 probiotic concurrent with the microbial consortium [P+L+(LR32)]. After the 45-day experimental period, euthanasia was performed for further analysis of alveolar bone loss by microCT, expression of genes encoding intra and extracellular receptors and cytokines by RT-qPCR in the gingival tissues, levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17, IL-4 and IL-10 in the gingival tissues, in addition to the weight gain of the animals. The experimental periodontitis model employed was successful, with reduction of bone volume in the group under induction of periodontal disease (P+L-). The probiotic strains tested seem to be able to prevent alveolar bone loss in the experimental animals, with bone volume of the P+L+(LA5) and P+L+(LR32) groups

similar to that observed in the SHAM group. No statistically significant differences were observed in the expression of genes encoding the pro-inflammatory cytokines *il-1 β* , *tnf- α* , *il-6* and *il-18* in the gingival tissue of animals under induction of periodontal disease; however, the *L. rhamnosus* LR32 strain appears to lead to a higher expression of *il-1 β* and *tnf- α* , and further induced positive regulation of *tlr4* expression in the presence and absence of microbial consortium [P+L+(LR32) and P-L+(LR32)] in relation to the positive control, P+L-. The evaluation of cytokine levels in gingival tissue revealed that the microbial consortium induced higher levels of IL-6 in gingival tissue (P+L-group) than SHAM group and those receiving probiotics, with or without microbial consortium. On the other hand, the microbial consortium (P+L-) did not induce the increase of the levels of other inflammatory mediators (IL-1 β , TNF- α and IL-17) in relation to SHAM. However, increased levels of IL-1 β , but also of IL-4 and IL-10, were observed in the P+L+(LA5) gingival tissue when compared to the SHAM and P+L- groups. In addition, probiotic *L. rhamnosus* LR32 also induced higher levels of IL-10 [P-L+(LR32)], but this effect was partially reduced by the addition of microbial consortium [P+L+(LR32)]. The administration of the microbial consortium did not lead to changes in animal weight gain (P+L- compared to SHAM), but significantly higher weight gain was observed in the P+L+(LR32) group when compared to the P+L+(LA5) group. Thus, considering the limitations of the study and the need for further investigation, the data obtained indicate that the probiotic strains tested have potential for the prevention and control of periodontal disease.

Keywords: Periodontitis. *P. gingivalis*. *Lactobacillus*. Probiotics. Alveolar bone loss.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	PROPOSIÇÃO	29
2.1	Objetivos específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Delineamento experimental	31
3.2	Considerações éticas	33
3.3	Cepas utilizadas e condições de cultura	33
3.3.1	Amostras	33
3.3.2	Condições de cultura	33
3.4	Obtenção das culturas para liofilização	34
3.5	Liofilização	35
3.6	Recuperação das amostras liofilizadas e determinação de viabilidade	35
3.7	Animais e condições de manutenção	36
3.8	Redução da microbiota residente	37
3.9	Inoculações do consórcio e dos probióticos	37
3.9.1	Inóculo para indução de periodontite experimental	37
3.9.2	Inoculação do consórcio microbiano para indução de periodontite experimental	38
3.9.3	Inóculo das amostras de probióticos	38
3.9.4	Inoculações das amostras de probióticos	38
3.10	Obtenção das amostras	39
3.11	Microtomografia computadorizada (MicroCT)	40
3.12	Estudo da expressão gênica no tecido gengival (RT-qPCR)	40
3.13	Determinação dos níveis de citocinas no tecido gengival	42
3.14	Análise estatística	43
4	RESULTADOS	45
4.1	Liofilização do consórcio microbiano e das cepas probióticas	45
4.2	Perda óssea alveolar	46
4.3	Expressão gênica relativa no tecido gengival	47
4.4	Determinação dos níveis de citocinas no tecido gengival	50

4.5	Efeitos colaterais e ganho de peso induzido pelos diferentes tratamentos	
	52
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	87

1 INTRODUÇÃO

Periodontite e atual paradigma terapêutico

A periodontite é caracterizada por um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos periodontais em resposta aos microrganismos presentes no biofilme supra e subgengival (1). A periodontite crônica (PC), termo estabelecido pela classificação das doenças periodontais de 1999 da Academia Americana de Periodontia (2), é a forma mais prevalente da doença, iniciada por uma comunidade microbiana disbiótica e não por periodontopatógenos selecionados (3). É importante ressaltar que, desde 2018, as doenças periodontais tiveram sua classificação atualizada e novas nomenclaturas foram estabelecidas: as periodontites "crônica" e "agressiva" agora estão agrupadas em uma categoria única ("periodontite"), e são ainda caracterizadas com base em um sistema de estadiamento e classificação (4). Neste estudo, entretanto, empregaremos a nomenclatura antiga, visto que grande parte da literatura ainda se fundamenta nesses termos.

O tratamento das periodontites consiste em uma fase de terapia ativa, que engloba o controle mecânico do biofilme e do cálculo dental, e ainda a terapia antibiótica nos casos mais severos, visando à redução da carga de periodontopatógenos e, assim, do processo inflamatório, seguindo-se à terapia periodontal de suporte. Apesar da conclusão da terapia periodontal ativa, a periodontite pode progredir devido à recolonização dos sítios tratados e de bolsas residuais por periodontopatógenos e/ou à resistência aos antimicrobianos (5).

Cabe observar que a literatura aponta que as diversas modalidades de terapia periodontal, incluindo raspagem e alisamento radicular, administração de antibióticos e abordagem cirúrgica, isoladas ou combinadas, induzem a alterações da microbiota subgengival, com redução dos níveis de patógenos periodontais como *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*, principalmente nos três primeiros meses subsequentes aos tratamentos e se estendendo por cerca dois anos (6). Essa redução, entretanto, pode não se sustentar em longo prazo (7).

Microbiota associada à periodontite

Estudos longitudinais em humanos demonstraram que os níveis de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* se relacionam à perda periodontal na PC (8), e estudos intervencionais demonstraram relação entre a presença destes patógenos em sítios tratados e a progressão da doença (9). No entanto, é importante ressaltar que a periodontite é associada a uma microbiota disbiótica onde a virulência de patógenos periodontais como *P. gingivalis* adquire importância apenas no contexto de uma comunidade microbiana com atividade sinérgica (10).

P. gingivalis é considerado o patógeno pedra angular na PC, devido à sua capacidade de induzir à disbiose e inflamação mesmo em baixos números (11). *P. gingivalis* apresenta fatores de evasão das defesas do hospedeiro que aumentam a sua adaptação aos tecidos periodontais e promovem alterações ambientais que beneficiam a comunidade microbiana, favorecendo organismos inflamofílicos e perpetuando o ciclo destrutivo (10). As gingipaínas são proteases produzidas por *P. gingivalis* que degradam vários substratos, inclusive proteínas do sistema complemento, pois degradam C3a (12) e têm atividade semelhante à C5 convertase, resultando em acúmulo de C5a com elevação de cAMP, e consequente supressão de macrófagos no sítio da infecção (13). Além disso, a gingipaína degrada C5b, impedindo a formação do complexo de lise de membrana, que promove a eliminação do patógeno (11).

Ainda, *P. gingivalis* inibe a produção de IL-8 nos tecidos periodontais pela secreção de uma serina fosfatase (SerB) (14). *P. gingivalis* pode também internalizar-se nas células epiteliais e ultrapassar a barreira epitelial, atingindo tecidos mais profundos, sendo considerado um patógeno intracelular facultativo. Quando no citoplasma das células, o patógeno impede a apoptose, mas explora diferentes vias que permitem a sua saída das células invadidas, propiciando a sua persistência nos tecidos gengivais (15). Além disso, a infecção por *P. gingivalis* em GECs também inibe a apoptose induzida por eATP por atividade de um nucleosídeo – difosfato quinase (NDK), secretado pela bactéria (16).

Como um anaeróbio estrito colonizador tardio do biofilme, a colonização por *P. gingivalis* se beneficia da atividade de colonizadores iniciais que reduzem a tensão de oxigênio e fornecem sítios de adesão. A participação de *P. gingivalis* no biofilme dental

é mediada especialmente pela fímbria FimA, envolvida na formação de biofilme monoespécie e na co-agregação aos colonizadores iniciais do biofilme dental (17,18) como *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus oralis* (9). No entanto, muitas cepas de *P. gingivalis* não apresentam a fímbria FimA1 (19), incluindo cepas de virulência reconhecida, como a cepa W83 (20) e a cápsula é a estrutura que medeia a coagregação de *P. gingivalis* nesta amostra (21). A cápsula de polissacarídeo é também implicada na evasão das defesas do hospedeiro. Cepas capsuladas geram uma resposta de citocinas pró-inflamatórias fraca (22) e induzem abscessos difusos em modelos animais, ao contrário das cepas não-capsuladas (23). Outros organismos, como *F. nucleatum*, também favorecem a colonização por *P. gingivalis*, devido à sua propriedade de agir como uma ponte entre os colonizadores iniciais e tardios do biofilme (24).

A alteração do microambiente favorecendo a evasão das defesas do hospedeiro promovida por *P. gingivalis* pode ser ampliada por outros organismos, como *P. intermedia*. A interpaína A (InpA) produzida por *P. intermedia*, por exemplo, também degrada fatores do complemento, e pode aumentar a proteção das espécies suscetíveis a este fator (25). InpA também age em conjunto à proteína siderófora HmuY de *P. gingivalis* para adquirir o grupo heme da hemoglobina (26).

P. intermedia é também capaz de evadir da morte mediada pelo complemento por capturar o fator H, um fator fisiológico inibidor do desse sistema (27). Além disso, *P. gingivalis* (cepas fimbriada e não-fimbriada) formam maior quantidade de biofilme quando associadas à *P. intermedia*, embora a associação *P. gingivalis*/*P. intermedia* seja cepa dependente (28).

A comunicação interespecies causa profundas mudanças fenotípicas. A ligação entre *P. gingivalis* e *S. gordonii* ocorre por meio das fímbrias FimA e Mfa1 (29). FimA e Mfa1 de *P. gingivalis* interagem com as proteínas de superfície estreptocócicas GAPDH e SspA/B, respectivamente. Em associação a *S. gordonii*, a tirosina quinase Ptk1 de *P. gingivalis* age limitando a produção do fator de transcrição CdrR, que é um regulador negativo de Mfa1 e, portanto, a coadesão dos organismos é favorecida. Com o tempo, no entanto, há aumento da expressão de uma tirosina fosfatase, Ltp1, que desfosforila Ptk1, elevando assim a inibição promovida por CdrR, reduzindo a expressão de Mfa1 e limitando o desenvolvimento da comunidade. Além disso, a fosforilação/desfosforilação da tirosina também regula a expressão de proteases e a

produção de cápsulas por *P. gingivalis*, influenciando assim o seu potencial patogênico.

Periodontite e resposta imune

A periodontite se caracteriza pela inflamação e conseqüente destruição dos tecidos periodontais, induzida em resposta à comunidade disbiótica. A condição é promovida pelo descontrole da inflamação, decorrente da desregulação na sinalização do processo inflamatório.

A resposta imune inata é induzida pelo reconhecimento de padrões moleculares de microrganismos (MAMPs, quando comensais, ou PAMPs, quando patogênicos) e sinais induzidos por distúrbios celulares provocados por estes (padrões moleculares associados ao perigo ou DAMPs) (30). PAMPs e DAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PPRs) em células eucariontes, que visam limitar a disseminação dos patógenos e restaurar a integridade e função teciduais, sendo cada PPR capaz de reconhecer assinaturas moleculares específicas.

PPRs incluem receptores *toll-like* (TLRs), receptores semelhantes ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeos *NOD-like* (NLRs), receptores *RIG-1-like* (*retinoic-acid-inducible gene 1*) (RLRs), e receptores lectina tipo-C (CLRs), bem como receptores citosólicos ligantes de DNA. Os PPRs podem ser extracelulares, como receptores *toll-like* (TLRs), e intracelulares, como NLRs (*nucleotide binding domain/leucine rich repeat* ou receptores *NOD-like*), e reconhecem sinais de patógenos ou moléculas relacionadas a patógenos no ambiente extracelular ou no citoplasma (31). O reconhecimento por esses receptores ativa fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NFκB), induzindo à transcrição de genes de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (32).

Os receptores extracelulares *toll-like* (TLRs) reconhecem uma ampla gama de fragmentos microbianos, oriundos de patógenos ou de organismos comensais. TLR4 reconhece o LPS de bactérias Gram-negativas, em conjunto a CD14 e MD2 (33). TLR4 é detectado em queratinócitos e fibroblastos do tecido gengival, sendo seus níveis mais baixos encontrados no epitélio juncional (34). É interessante notar que a capacidade de ativar TLR2 ou TLR4 e antagonizar a ativação de TLR4 difere entre

amostras de biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica e controles com periodonto saudável, sendo que o biofilme associado à saúde é antagonista a TLR4, enquanto o associado à doença foi agonista deste receptor (35).

Entre as estratégias de evasão de *P. gingivalis*, destaca-se a produção de um LPS atípico que antagoniza TLR4, ao contrário dos LPS pró-inflamatórios de outras bactérias Gram-negativas (14). Esta espécie altera o seu LPS, removendo os resíduos de fosfato e as cadeias acil do lipídio A, fazendo com que o LPS antagonize a ativação de TLR4 quando combinado a um agonista forte, como o LPS de *Escherichia coli* (36).

TLR2 se dimeriza com TLR1 ou TLR6 e reconhece o ácido lipoteicoico da parede celular de bactérias Gram-positivas (33). A ativação de TLR2 pode exercer também papel de antagonista de TLR4, por interagir com o co-receptor CD14 (37). A fímbria principal de *P. gingivalis*, FimA, é também um agonista de TLR2 (38), embora esta não seja expressa por todas as amostras da espécie (19).

Por outro lado, a fímbria Mfal de *P. gingivalis* está associada ao reconhecimento pelo receptor DC-SIGN de células dendríticas, induzindo à produção de citocinas imunossupressoras e levando à sobrevivência no ambiente intracelular, por direcionar o patógeno a compartimentos não-lisossomais pela subversão dos mecanismos de autofagia (39).

A sinalização promovida pelo mecanismo de ativação de C5aR-TLR2 por *P. gingivalis* é capaz de inibir a resposta antimicrobiana promovida pela ativação de TLR2 (40). Isto ocorre porque a sinalização C5aR-TLR2 leva à ubiquitilação e degradação da proteína MYD88, uma molécula adaptadora de TLR2, e assim suprime os efeitos antimicrobianos da resposta de fagócitos, possibilitando a sobrevivência do patógeno (41).

Os receptores citosólicos de PAMPS e DAMPS incluem NLRs como NLRP1, NLRP3, NLRC4 e receptores AIM *abscent in melanoma-like*, como AIM2 (42). Apesar da ativação de receptores citoplasmáticos, assim como de receptores TLR, levar à ativação de NFκB, apenas o reconhecimento de sinais mediados por microrganismos (PAMPs) e sinais de alteração da homeostase celular (ATP extracelular, DAMPS e efluxo de potássio) pelos receptores citosólicos NLR ou AIM2 induz à formação de inflamassomas. Inflamassomas são complexos multiproteicos descobertos em 2002 (43) constituídos pelos receptores citosólicos, por uma proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*) e a pró-caspase 1 (44). Estes complexos formam plataformas que ativam caspase-1,

responsável pela ativação e liberação no ambiente extracelular de IL-1 β e IL-18 maduras, e/ou induzem a morte celular por piroptose (45,46)

A periodontite é caracterizada por excessiva produção de IL-1 β e pela expressão de componentes do inflamassoma, como NLRP3 e AIM2 (47). A expressão de NLRP3 é maior em tecidos gengivais com periodontite crônica e agressiva do que nos tecidos saudáveis, especialmente na camada epitelial. Na destruição periodontal, ocorre regulação positiva da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-17, enquanto a expressão de IL-10 e TGF- β 1 é regulada negativamente (48). Após o tratamento periodontal não-cirúrgico, é observada redução nos níveis de IL-1 β e IL-17, concomitante ao aumento de IL-4, um mediador anti-inflamatório (49).

A transcrição de pró-IL-1 β induzida por *P. gingivalis* requer ativação de TLR2 e TLR4 (47), e o segundo sinal em macrófagos THP-1 desafiados por *P. gingivalis* envolve a ativação dos inflamassomas via NLRP3 e AIM2, levando à secreção de IL-1 β madura e piroptose (44,47).

IL-1 β induz à produção de mediadores inflamatórios, a osteoclastogênese, a expressão de metaloproteinases de matriz e morte celular de células produtoras de matriz nos tecidos periodontais, resultando em destruição do osso alveolar e do tecido conjuntivo periodontal. Assim, IL-1 β desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão da doença periodontal (44).

Diferenças na expressão de TLRs e NLRs na saúde e na doença sugerem que estes receptores têm papel essencial na patogênese de doenças inflamatórias e podem ser alvo de novas terapias. O reconhecimento da complexidade da doença periodontal e da importância do papel do sistema imune do hospedeiro em seu desenvolvimento e progressão levou ao interesse em novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras como adjuvantes ao desbridamento mecânico. O uso de baixas doses de doxiciclina, por exemplo, pode modular a atividade das metaloproteinases de matriz envolvidas na destruição periodontal. Anti-inflamatórios não-esteroidais bloqueadores da prostaglandina E₂ também já mostraram bons resultados; seus importantes efeitos colaterais gastrointestinais e cardiovasculares, entretanto, os tornaram pouco interessantes para o uso clínico crônico. O uso de ômega-3, precursor de resolvinas, também é alvo de interesse devido a suas propriedades anti-inflamatórias. Quando sua administração é conjugada à aspirina, os efeitos positivos são aumentados, com a produção de resolvinas mais estáveis. A azitromicina, por sua

vez, tem se apresentado como uma alternativa interessante visto que, além de suas propriedades antimicrobianas, ainda apresenta atividade anti-inflamatória (50). Por fim, terapias anti-citocinas para modular a resposta do hospedeiro já são usadas em diversas condições médicas, tendo como alvos principais IL-1 e TNF- α . Um estudo em modelo animal de periodontite demonstrou que o uso de um antagonista de TNF- α reduziu a infiltração neutrofílica, os níveis de óxido nítrico e a apoptose no tecido gengival, mas as evidências acerca desse agente ainda são limitadas (51).

Probióticos

O presente estudo buscou abordar os efeitos de cepas probióticas do gênero *Lactobacillus* em modelo experimental de periodontite, visto que diversos estudos sugerem o efeito benéfico de probióticos na prevenção à periodontite ou como adjuvante ao tratamento periodontal (52). Devido ao papel essencial da microbiota na proteção ao hospedeiro, a recuperação do equilíbrio da microbiota pela colonização por organismos benéficos, associados aos quadros de saúde, é uma proposta atraente para novas abordagens terapêuticas periodontais (53).

O benefício de probióticos na cavidade oral poderia ser estendido à proteção contra outras doenças, por translocação das bactérias da cavidade oral ao intestino, protegendo contra doenças inflamatórias intestinais, ou mesmo agindo no controle de outras doenças inflamatórias, como a diabetes. Embora a ideia do uso de probióticos para o controle da doença periodontal não seja nova, os seus resultados não foram conclusivos devido ao grande número de cepas probióticas disponíveis e diferenças na dose e na frequência de uso, tanto em estudos clínicos como em modelos experimentais.

Probióticos são definidos, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e com a Organização Mundial de Saúde (OMS), como microrganismos vivos, principalmente bactérias, seguros para consumo humano e que, quando ingeridos em quantidades adequadas, têm efeitos benéficos à saúde (FAO, WHO, 2006). As cepas probióticas mais comuns pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (5).

Probióticos do gênero *Lactobacillus* mostraram resultados promissores no controle da doença periodontal em humanos. *L. reuteri* foi capaz de reduzir parâmetros clínicos de severidade de doença, como sangramento à sondagem e

inflamação gengival (54). O emprego de *L. brevis* (55) e *L. salivarius* (56) também promoveu a redução do índice gengival em humanos. Produtos como leite fermentado probiótico (57), chicletes contendo *L. reuteri* (58) e um produto comercial à base de *L. reuteri* (59) foram capazes de controlar a gengivite, reduzir citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular e inibir a formação de biofilme dental. Em fumantes com periodontite crônica, *L. reuteri* adjunto à terapia periodontal convencional reduziu o índice de sangramento à sondagem e reduziu bolsas profundas (60). Pastilhas contendo *L. rhamnosus* GG (LGG) e *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 (BB-12) levaram à redução de índice de placa e índice gengival, sem alterar a composição da microbiota da saliva (61). Em adolescentes, a administração das mesmas cepas reduziu o índice gengival, com diminuição dos níveis de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* na saliva e no biofilme e nos níveis de *P. gingivalis* no biofilme (62). O efeito de pastilhas contendo *L. reuteri* concomitante ao tratamento com raspagem e aplanamento radicular promoveu redução nos níveis de *P. gingivalis* e *P. intermedia* na saliva e no biofilme em relação ao controle, que recebeu apenas o tratamento mecânico. Além disso, o grupo sob administração de probióticos apresentou menor porcentagem de sítios com profundidade de sondagem ≥ 5 mm após 12 semanas de acompanhamento (63). Em pacientes com bolsas residuais, o uso de pastilhas de *L. reuteri* resultou em pronunciada redução de bolsas moderadas e profundas, diminuindo a necessidade de abordagem cirúrgica (64). Estudo recente demonstrou ainda que *L. rhamnosus* GG preveniu a perda óssea alveolar em modelo animal de periodontite experimental (65).

Os mecanismos de ação destes organismos benéficos incluem seu efeito direto, pela produção de bacteriocinas e produtos como ácidos e peróxidos, tóxicos a vários patógenos; alteração do pH e do potencial de oxirredução do meio, prejudicando o estabelecimento de agentes patogênicos; inibição da adesão e da formação de biofilmes; alteração da resposta do hospedeiro, inclusive da função da barreira epitelial, promovendo a inibição da produção de colagenases e citocinas pró-inflamatórias pela via de NFkB e indução da expressão de proteínas citoprotetoras na superfícies celulares, da modulação da proliferação celular e da apoptose (5,66–68). Embora os mecanismos imunomoduladores dos probióticos ainda não estejam completamente esclarecidos, já foi demonstrado que sua administração pode aumentar a proporção de células T CD25+ (69) com capacidade de supressão da

resposta imune. Além disso, reações inflamatórias exacerbadas podem ser moderadas pelo estímulo da expressão de FOXP3 na mucosa gastrointestinal (70).

Os lactobacilos podem produzir diferentes componentes antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular, bacteriocinas e inibidores de adesão, características que os destacaram como probióticos (5). A liberação de produtos do metabolismo ou componentes das células probióticas podem ativar a resposta inata do sistema imune nas mucosas e levar a resposta adaptativa a um perfil anti-inflamatório (71).

Estudos realizados no laboratório de Microbiologia Oral do ICB-USP mostraram que produtos secretados de cepas de *L. acidophilus* LA5 foram capazes de reduzir a formação de biofilme misto formado por *P. gingivalis* ATCC 33277, *S. oralis* e *S. gordonii*, colonizadores iniciais do biofilme. Além disso, os produtos secretados de *L. rhamnosus* HN001 – Howaru, *L. acidophilus* LA5 e *L. reuteri* DSM foram capazes de reduzir o biofilme misto formado pelos colonizadores iniciais e *P. gingivalis* W83, em estudo avaliando a biomassa do biofilme. Ainda, no mesmo estudo, foi possível demonstrar que os produtos de probióticos promovem a redução da viabilidade de *P. gingivalis* nos biofilmes, sendo este efeito maior quando promovido por *L. acidophilus* LA5 em *P. gingivalis* W83 e por *L. rhamnosus* HN001 em *P. gingivalis* ATCC 33277. Os probióticos foram também capazes de reduzir o biofilme pré-formado pelas três espécies quando a cepa *P. gingivalis* ATCC 33277 foi usada, enquanto os ensaios com a cepa W83 mostraram apenas uma discreta redução do biofilme pré-formado, induzida pelos produtos de *L. reuteri* DSM (Ishikawa et al., dados não publicados). Também pudemos observar que a interação de *P. gingivalis* com produtos dos probióticos lactobacilos promove alteração do perfil de transcrição de genes associados a fatores de colonização como *fimA*, *mfa1*, *fsth* e *kgp*, agindo de maneira distinta em ATCC 33277 e W83* .

A literatura mostra que amostras probióticas cultivadas *in vitro* com células imunes induzem à produção de IL-12, uma citocina chave na promoção da resposta Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ e TNF- α , essencial para a defesa contra infecções por patógenos intracelulares (72). Outros probióticos induzem à produção de IL-10 (73,74). A indução de maior quantidade de IL-10 por macrófagos co-cultivados com *Lactobacillus*, como observado em nossos ensaios preliminares,

* Ishikawa et al., dados não publicados.

exerceria um efeito imunoregulatório por suprimir a produção de IL-12 e citocinas Th1, o que poderia direcionar as células T CD4+ à diferenciação Th2 (75). Além disso, algumas bactérias probióticas podem induzir à diferenciação de células T regulatórias FOXP3+ (Treg) a partir de precursores ingênuos (76), o que poderia ter efeito benéfico em doenças alérgicas e autoimunes. Por exemplo, cepas de *L. reuteri*, *L. casei* e *L. acidophilus* induziram à maturação de células dendríticas, e estas à diferenciação de células Treg *in vitro* (77). Por outro lado, a indução de IL-17 por probióticos pode ser sugerida pelo aumento da produção de IL-1 β , promovida por algumas cepas probióticas em nossos dados preliminares. IL-1 β regula positivamente a expressão do fator de transcrição RORCv2, direcionando à resposta Th17 (78,79). Células Th17 produzem IL-17, crítica para aumentar a proteção contra bactérias extracelulares e fungos que não são eliminados de maneira eficiente pelas respostas Th1 e Th2 (80).

Recentemente, em outro estudo do laboratório de Microbiologia Oral do ICB-USP (81) mostrou que *P. gingivalis* ATCC 33277 e W83 são capazes de reduzir a viabilidade de células epiteliais gengivais (GECs) OBA-09. No entanto, as cepas probióticas *L. rhamnosus* LR32 e *L. acidophilus* LA5 foram capazes de prevenir a perda de viabilidade destas células após os desafios com *P. gingivalis*. Além disso, *L. rhamnosus* LR32 e *L. acidophilus* LA5 foram capazes de inibir a adesão e invasão de *P. gingivalis* a células epiteliais.

Adicionalmente, a produção de citocinas por células OBA-09 desafiadas com *P. gingivalis* também foi alterada pelas cepas probióticas. A monoinfecção das células OBA-09 com *P. gingivalis* W83 e ATCC 33277 levou a aumento na síntese de IL-1 β e TNF- α , regulou positivamente TLR4 e negativamente TLR2, e não afetou a produção de CXCL-8 (IL-8). A coinfeção das GECs desafiadas com *P. gingivalis* por *L. acidophilus* LA5 induziu à expressiva redução da produção de IL-1 β e TNF- α , mas a coinfeção com *L. rhamnosus* LR32 não foi capaz de inibir a produção de IL-1 β induzida por *P. gingivalis*. A síntese de CXCL-8 pelas GECs desafiadas por *P. gingivalis* aumentou na coinfeção com os probióticos, principalmente quando testada a cepa *L. acidophilus* LA5. A regulação positiva de TLR4 induzida por *P. gingivalis* foi abolida pela coinfeção das GECs desafiadas com *P. gingivalis* e probióticos *Lactobacillus*. Além disso, a coinfeção com probióticos aboliu a regulação negativa de TLR2 promovida por *P. gingivalis* W83, mas não por ATCC 33277 (81).

O uso clínico de probióticos é dependente da apreensão de suas propriedades, com vistas à seleção do agente mais apropriado para cada quadro (82). A determinação das propriedades benéficas de uma cepa probiótica *in vitro* é apenas o primeiro passo para sua seleção, e os seus mecanismos devem ser determinados experimentalmente *in vivo*, sob diferentes estímulos.

Modelos experimentais

Para estudar a etiologia e o controle da doença periodontal, são realizados estudos em animais pela indução da doença periodontal experimental, mediante infecção oral por bactérias isoladas de humanos (83). *P. gingivalis* não é capaz de induzir a periodontite em animais livres de germes; por ser um colonizador tardio do biofilme e por induzir a periodontite em ação sinérgica à microbiota disbiótica, *P. gingivalis* necessita de uma microbiota de suporte, que pode ser a microbiota residente no animal experimental ou adicionada de outras espécies isoladas de humanos. Os modelos experimentais recentes mais bem-sucedidos incluem não apenas *P. gingivalis*, mas um consórcio microbiano formado por espécies da cavidade oral de humanos que mimetiza a periodontite no homem, por propiciar colonização permanente pelo patógeno e destruição dos tecidos periodontais induzida pelo biofilme. A infecção oral em murinos por um consórcio formado por *F. nucleatum* e *P. gingivalis* levou a aumento na destruição periodontal, particularmente quando a cepa capsulada de *P. gingivalis* foi empregada (21). Outros dados indicam que a inoculação oral do consórcio *F. nucleatum* e *P. gingivalis* em ratos resultou em grande destruição do osso alveolar (84). *P. intermedia* também foi adicionada ao consórcio microbiano para indução da doença periodontal experimental (85), e a infecção oral experimental por *P. gingivalis* fimbriada associada ao isolado clínico *P. intermedia* 17, com alta capacidade de agregação a *P. gingivalis*, induziu à maior destruição periodontal em camundongos C57BL/6 do que quando um dos agentes bacterianos foi inoculado separadamente (Simionato, M., dados não publicados).

A infecção dupla por *P. gingivalis* e *S. gordonii* também resultou em maior perda óssea, quando comparada à infecção apenas por uma das espécies (86). Estudo recente sobre a associação entre *P. gingivalis* e *S. gordonii* mostrou que o ácido 4-aminobenzoato/*para-amino benzoico acid* (pABA), precursor da síntese de folato, produzido por *S. gordonii*, é requerido para o máximo acúmulo de *P. gingivalis*. O

acrécimo de pABA exógeno resulta em menor stress e em regulação positiva de proteínas fimbriais estruturais e acessórias de *P. gingivalis* (FimA e Mfa1), levando à maior aderência do patógeno às células epiteliais gengivais. Além das fímbrias adesivas, proteases, proteínas de captação de ferro, proteínas dependentes de TonB e componentes do sistema de secreção do tipo IX foram reguladas positivamente por pABA. A adição de pABA à *P. gingivalis* em modelo de infecção oral murino resultou em maior sobrevivência da bactéria. Além disso, a expressão de várias proteínas relacionadas ao estresse foi regulada negativamente, sugerindo que *P. gingivalis* se adaptou para viver em comunidade com *S. gordonii* (18). A inoculação de *S. gordonii* DL-1 e *P. gingivalis* ATCC 33277 resultou, ainda, em maior perda óssea alveolar do que quando apenas uma das espécies foi inoculada (87). No entanto, infecções mistas entre *P. gingivalis* e *S. gordonii* defectivo na produção de pABA foram mais patogênicas em modelos murinos de formação de abscessos do que quando empregada a cepa de *S. gordonii* selvagem (18). Deve ser ressaltado que uma das cepas utilizadas no presente estudo, *P. gingivalis* ATCC 33277, não produz cápsula de polissacarídeo, e não foram encontrados dados sobre o efeito de pABA de *S. gordonii* sobre a produção de PEC pela cepa capsulada W83, um dado relevante visto que pABA regula negativamente a síntese de polissacarídeo capsular (18).

Optamos por usar, na presente proposta, um modelo de periodontite experimental induzida por um consórcio bacteriano de isolados de humanos, formado por *P. gingivalis* capsulada/não-fimbriada e não-capsulada/fimbriada, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *S. gordonii*. Assim, no modelo experimental proposto, o consórcio microbiano visa otimizar a colonização da cavidade oral, induzir o processo inflamatório e destruição periodontal e selecionar as espécies inflamofílicas, levando à disbiose da microbiota oral e estendendo seu efeito além da cavidade oral (88,89).

O modelo por infecção oral proposto difere em vários aspectos do modelo de indução de doença periodontal experimental por ligadura. Neste modelo, espécies bacterianas relacionadas à periodontite em humanos não foram associadas à doença (90,91). Além disso, *Veillonella*, *Capnocytophaga*, *Neisseria* (90), *Rothia* spp. e *Streptococcus* spp. (91), usualmente associadas à saúde periodontal em humanos, foram associados à doença induzida por ligadura em ratos. O modelo de infecção por inoculação oral de patógenos para indução de periodontite em camundongos é mais apropriado para abordar hipóteses relacionadas a estratégias de evasão imunológica,

identificadas a partir de estudos mecanicistas de hospedeiro-patógeno (92). Além disso, é usado com sucesso para vincular a periodontite induzida por microrganismos orais a condições sistêmicas (93,94). Portanto, consideramos que o modelo proposto permitirá abordar ampla variedade de hipóteses relacionadas à patogênese periodontal, que vão desde o papel da resposta do hospedeiro até a análise da virulência dos organismos periodontais em uma comunidade microbiana e a conexão desses fatores com parâmetros sistêmicos (92), além da avaliação do efeito de medidas preventivas e terapêuticas que buscam alterar a microbiota e modular a resposta imune.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo buscou determinar o potencial de diferentes cepas probióticas do gênero *Lactobacillus* na prevenção e controle da periodontite experimental.

2.1 Objetivos específicos

O efeito da administração oral dos probióticos *L. acidophilus* LA5 e *L. rhamnosus* LR32 foi determinado em modelo experimental *in vivo* de periodontite avaliando-se:

- Perda óssea alveolar na região interproximal entre o primeiro e o segundo molar da hemimaxila direita dos animais por microtomografia computadorizada (microCT);

- Expressão de genes no tecido gengival que codificam receptores intra e extracelulares e citocinas por RT-qPCR;

- Perfil de citocinas no tecido gengival por análise multiplex;

- Ganho de peso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Para a execução do presente estudo, foram realizados ensaios *in vivo*, em camundongos C57BL/6, como apresentado na figura 3.1. Após redução da carga microbiana, mediante antibioticoterapia e aplicação tópica de gel de clorexidina, a periodontite experimental foi induzida pela inoculação de um consórcio microbiano formado por *P. gingivalis* W83 e ATCC 33277, *P. intermedia* 17, *F. nucleatum* ATCC 25586 e *S. gordonii* DL-1, administrado oralmente aos camundongos cinco vezes por semana, por cinco semanas. As cepas probióticas *L. acidophilus* LA5 e *L. rhamnosus* LR32 foram inoculadas uma vez ao dia durante todo o período experimental. As amostras de todos os microrganismos empregados no estudo foram liofilizadas em condições padronizadas e recuperadas previamente à cada inoculação.

Ao término do período experimental, estabelecido em 45 dias, realizou-se a eutanásia dos animais investigados, com subsequente obtenção das amostras para as análises posteriores. Foram avaliados a perda óssea alveolar na região dos molares da hemimaxila direita dos animais, a expressão gênica de citocinas e receptores intra e extracelulares no tecido gengival, os níveis de citocinas no tecido gengival e o ganho de peso dos animais.

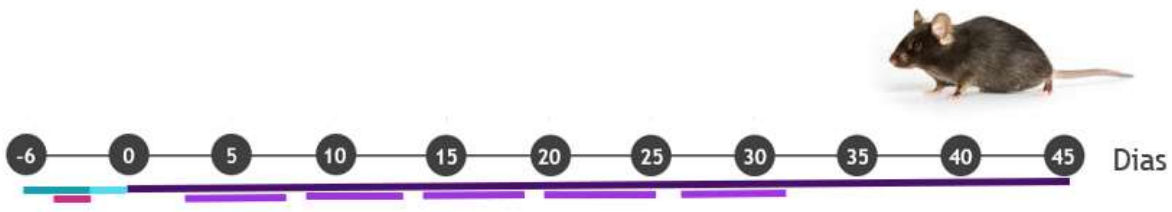
O estudo compôs-se dos seis grupos subcitados, formados por oito animais cada, totalizando 48 animais experimentais (P: patógenos periodontais; L: lactobacilos probióticos):

1. SHAM: P-L- (inoculado com veículo do consórcio microbiano e veículo de probióticos)
2. Controle positivo: P+L- (inoculado com consórcio microbiano e veículo de probióticos)
3. Probiótico *L. acidophilus* LA5: P-L+ (LA5) (inoculado com veículo do consórcio microbiano e probiótico *L. acidophilus* LA5)
4. Periodontite + Probiótico *L. acidophilus* LA5: P+L+ (LA5) (inoculado com consórcio microbiano e probiótico *L. acidophilus* LA5)

5. Probiótico *L. rhamnosus* LR32: P-L+ (LR32) (inoculado com veículo do consórcio microbiano e probiótico *L. rhamnosus* LR32)

6. Periodontite + Probiótico *L. rhamnosus* LR32: P+L+ (LR32) (inoculado com consórcio microbiano e probiótico *L. rhamnosus* LR32)

Figura 3.1 - Delineamento experimental do estudo



Fonte: O autor

- Quatro dias de antibioticoterapia.
- Dois dias de swab oral de digluconato de clorexidina 0,2%.
- Dois dias de *washout*.
- Quarenta e cinco dias de inoculação de 1×10^9 UFC/probiótico [L+(LA5) ou L+(LR32)] ou veículo (L-), com início no dia 0.
- Cinco dias de inoculação de consórcio microbiano (10^{11} UFC/ml de cada cepa) (P+) ou veículo (P-), com início no dia 2, totalizando 25 inoculações.

Siglas:

P-: Veículo do consórcio microbiano para indução de periodontite;

P+: Consórcio microbiano para indução de periodontite;

L-: Veículo dos probióticos *Lactobacillus*;

L+(LA5): *L. acidophilus* LA5 (inóculo de probiótico *L. acidophilus* LA5);

L+(LR32): *L. rhamnosus* LR32 (inóculo de probiótico *L. rhamnosus* LR32).

3.2 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICB protocolo 111) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Anexo A), e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FO protocolo 20/2019) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo B), em conformidade com a legislação vigente – Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009 e à luz dos princípios éticos em experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.3 Cepas utilizadas e condições de cultura

3.3.1 Amostras

Foram utilizadas as cepas de bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* LA-5™ (CHR Hansen Holding A/S, Hørsholm, Dinamarca) e *Lactobacillus rhamnosus* rhamnosus LR32 (DuPont Danisco, Itasca, EUA).

Para os ensaios de indução de periodontite experimental, foi empregado um consórcio microbiano composto pelas cepas *P. gingivalis* (ATCC 33277, não-capsulada e fimbriada, fimA I), *P. gingivalis* (W83, capsulada e não-fimbriada), *P. intermedia* (17) (28), *F. nucleatum* (ATCC 25586) (24) e *S. gordonii* (DL-1) (95).

3.3.2 Condições de cultura

Todas as cepas bacterianas foram mantidas em glicerol 20%, em freezer -80°C. Alíquotas de 25 µl das amostras de probióticos *Lactobacillus* foram inoculadas em placas de ágar MRS (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e incubadas em condições de microaerofilia (5% de CO₂) a 37°C por 24-48 horas.

Para o cultivo dos patógenos periodontais, alíquotas de 25 µl de *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* 17 e *F. nucleatum* ATCC 25586 foram inoculadas em placa de ágar sangue suplementado com hemina (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e menadione (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e incubadas em câmara de anaerobiose (85% N₂, 5% H₂ e 10% CO₂) a 37°C por 48 horas.

Para o organismo comensal *S. gordonii* DL-1, alíquotas de 25 µl da suspensão da bactéria estocadas a -80°C foram inoculadas em placa de cultura de ágar infusão de cérebro e coração (BHI, BD; Becton, Dickinson and Company, Sparks, EUA) e as culturas incubadas em condição de microaerofilia a 37°C por 24-48 horas.

3.4 Obtenção das culturas para liofilização

As amostras foram liofilizadas na fase de cultura estacionária. Assim, o processo de incubação para o crescimento das bactérias, prévio à liofilização, deu-se por 16 a 18 horas.

Após o cultivo das bactérias *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* em placas de cultura, como descrito no item 3.3, foi realizado um repique em placas de cultura de ágar sangue, com nova incubação em câmara de anaerobiose (85% N₂, 5% H₂ e 10% CO₂) a 37°C por 24 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com 2 ml de caldo BHI e este conteúdo inoculado em caldo BHI (suplementado com 1 mg hemina/ml e 0,1 mg menadione/ml), ajustando-se a absorbância de acordo com densidade óptica previamente padronizada (DO_{600nm}= 0,65 para *P. gingivalis* e *P. intermedia*, DO_{600nm}= 0,1 a 0,3 para *F. nucleatum*), em volume final de 50 ml. As culturas foram incubadas em câmara de anaerobiose overnight (16 a 18 horas) até atingir DO_{600nm}= 1 a 1,2 para *P. intermedia* e *P. gingivalis*, e DO_{600nm}= 0,7 a 0,8 para *F. nucleatum*.

Para *S. gordonii*, após o cultivo inicial em placa de cultura, como descrito no item 3.3, foi realizado um repique da bactéria em placa de ágar BHI, posteriormente incubada em condições de microaerofilia (5% de CO₂) a 37°C por 24 horas. As placas foram lavadas com 2 ml de caldo BHI, e alíquotas desse conteúdo foram inoculadas

em caldo BHI, seguindo-se incubação por 16 a 18 horas. Após este período, as culturas foram ajustadas a $DO_{600nm} = 1$ e diluídas 1:10, em volume final de 50 ml. As culturas foram incubadas em condição de microaerofilia a 37°C por 4 horas, até atingir $DO_{600nm} = 0,8$ a 0,9.

As cepas probióticas foram cultivadas em placas de cultura, como descrito no item 3.3, com posterior repique em novas placas de ágar MRS e incubação em condições de microaerofilia a 37°C por 24 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com 2 ml de caldo MRS, e alíquotas desse conteúdo foram adicionadas a 10 ml de caldo MRS, seguindo-se incubação por 16 a 18 horas em 5% de CO₂ (condição de microaerofilia) a 37°C. Após este período, as culturas foram diluídas 1:10 em caldo MRS e ajustadas à $DO_{600nm} = 1,5-1,8$.

3.5 Liofilização

As amostras, já ajustadas quanto à absorbância, foram centrifugadas a 3.700 rpm (2.464 xg) por 10 minutos em temperatura ambiente e ressuspendidas em solução para liofilização (500-800 µl para os patógenos periodontais e 1 ml as bactérias probióticas) [leite desnatado Molico 10% acrescido de 5% de glutamato de sódio (L-Glutamic acid monosodium salt hydrate, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e 5% de solução de dithiothreitol (Sigma-Aldrich)]. Alíquotas de 100 µl foram transferidas para criotubos e mantidas em freezer -80°C. Por fim, as amostras foram liofilizadas (FreezoneTriad Freezer Dryers, Labconco, Kansas City, EUA) em -40°C, sob vácuo. O material liofilizado foi armazenado em freezer -80°C.

3.6 Recuperação das amostras liofilizadas e determinação de viabilidade

As amostras de patógenos periodontais anaeróbios estritos (*P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*) foram ressuspendidas em caldo BHI (suplementado com 1 mg hemina/ml e 0,1 mg menadione/ml) e mantidas em câmara de anaerobiose por 6 horas, seguindo-se diluições seriadas e inoculação em triplicata (alíquotas de 25 µl)

em ágar sangue hemina menadione. Após incubação por 2-4 dias, a 37°C em câmara de anaerobiose, as colônias (nas placas apresentando 30-300 colônias) foram contadas, e, assim, foi calculado o número de UFC/criotubo.

Para *S. gordonii*, as amostras foram ressuspensas em caldo BHI e incubadas em condições de microaerofilia por 6 horas, seguindo-se diluições seriadas e inoculação em triplicata (alíquotas de 25 µl) em ágar BHI para determinação do número de UFC/criotubo após incubação 2-4 dias em condição de microaerofilia.

Para as bactérias probióticas *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, as amostras foram ressuspensas em caldo MRS e inoculadas imediatamente em triplicata em placas de ágar MRS, seguindo-se à determinação de UFC/criotubo após incubação das placas em microaerofilia por 2-4 dias. Para determinação da redução da carga microbiana durante o processo de liofilização/estocagem/recuperação, foi também realizada a determinação do número de organismos viáveis antes do processo de liofilização.

O processo de recuperação das bactérias liofilizadas foi repetido bimestralmente para avaliação da manutenção do número de organismos viáveis por criotubo.

3.7 Animais e condições de manutenção

Foram utilizados 48 camundongos machos da linhagem C57BL/6 SPF (*Specific Pathogen Free*), com 4 semanas de idade, procedentes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério de criação de camundongos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, em gaiolas com filtros microisoladores, acondicionados em estantes com ventilação, criados em condições livres de patógenos. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos, sendo oito animais experimentais por grupo, e acompanhados quanto ao peso, perda de mobilidade, condições da pelagem e presença de lesões cutâneas durante o transcorrer do estudo.

3.8 Redução da microbiota residente

Visando à redução da microbiota residente nos camundongos para o favorecimento da colonização por organismos isolados de humanos, os animais receberam 1 mg de canamicina/ml (Inlab, São Paulo, Brasil) e 1 mg de amoxicilina/ml (EMS, São Paulo, Brasil) (65,96) diluídos na água disponível em suas gaiolas, durante quatro dias consecutivos. Nos últimos dois dias de antibioticoterapia, as cavidades orais dos camundongos receberam aplicação tópica de digluconato de clorexidina 0,2% em gel por meio de microbrush (Peridex, Procter and Gamble, EUA) (96). Foi respeitado um intervalo de dois dias antes do início das inoculações com probióticos (três dias antes do início das inoculações do consórcio microbiano).

3.9 Inoculações do consórcio e dos probióticos

3.9.1 Inóculo para indução de periodontite experimental

As amostras liofilizadas de cada um dos microrganismos do consórcio microbiano [*P. gingivalis* (ATCC 33277), *P. gingivalis* (W83), *P. intermedia* (17), *S. gordonii* (DL1) e *F. nucleatum* (ATCC 25586)] foram recuperadas acrescentando-se 1 ml de caldo infusão de cérebro e coração (BHI, BD; Becton, Dickinson and Company, Sparks, EUA) suplementado com 1 mg hemina/ml e 0,1 mg menadione/ml, seguindo-se incubação em câmara de anaerobiose (85% N₂, 5% H₂ e 10% CO₂) a 37°C por 6 horas. Visando evitar a perda de viabilidade das bactérias, os inóculos foram preparados apenas no momento da inoculação. Alíquotas de 50 µl contendo 2 x 10¹² UFC/ml de cada bactéria foram adicionadas a 750 µl carboximetilcelulose 2% diluída em água estéril (LabSynth, São Paulo, Brasil), um veículo inerte ao organismo e de viscosidade ideal para a inoculação oral em animais.

3.9.2 Inoculação do consórcio microbiano para indução de periodontite experimental

Os animais dos grupos P+ foram inoculados por vinte e cinco dias, sendo cinco dias/semana durante as cinco primeiras semanas do ensaio. As inoculações foram realizadas diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio da agulha de gavagem, com a administração do volume de 50 µl contendo 10^{11} UFC/ml de cada bactéria. Animais controles, inoculados apenas com veículo (carboximetilcelulose 2%), foram também avaliados.

3.9.3 Inóculo das amostras de probióticos

As amostras liofilizadas de *L. acidophilus* LA5 e *L. rhamnosus* LR32 foram ressuspensas em 1 ml de Lactobacilli MRS caldo (BD; Becton, Dickinson and Company, Sparks, EUA), obtendo-se 2×10^9 UFC/ml. Alíquotas de 50 µl desse conteúdo foram adicionadas a 950 µl de carboximetilcelulose 2%.

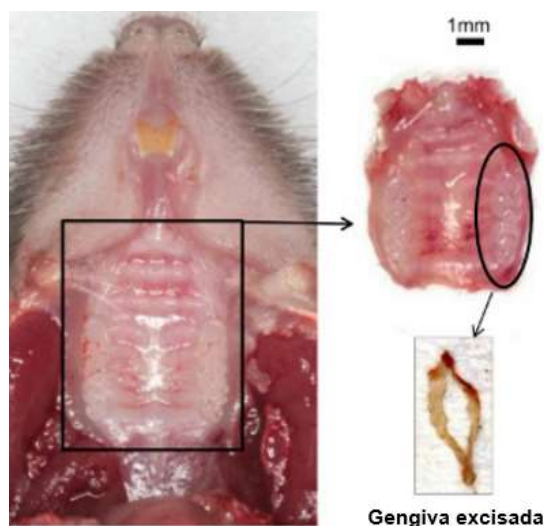
3.9.4 Inoculações das amostras de probióticos

Os animais dos grupos L+ foram inoculados uma vez ao dia, durante todo o período experimental (quarenta e cinco dias). Esses animais receberam a administração oral, por meio de agulha de gavagem, do volume de 50 µl do inóculo, contendo 10^9 UFC/ml de cada bactéria. Animais controles L-, inoculados apenas com veículo (carboximetilcelulose 2%), foram também avaliados. Foi respeitado um intervalo de 4-6 horas entre as inoculações das cepas probióticas (realizadas no período da manhã) e do consórcio microbiano (realizadas no período da tarde), visto que a proposta do presente estudo foi avaliar a possível influência de cepas probióticas na colonização oral por patógenos periodontais e, assim, na prevenção e controle da doença periodontal.

3.10 Obtenção das amostras

Quarenta e cinco dias após a inoculação inicial com o consórcio microbiano, os camundongos foram anestesiados com uma associação de ketamina (Dopalen 10%, Laboratório Vetbrands, Rio de Janeiro, Brasil) e xilazina (Ansedan 2%, Laboratório Vertbrands, Rio de Janeiro, Brasil), diluída em solução salina fosfatada PBS (8 g NaCl, 1 g KCl, 3,5 g Na₂HPO₄ e 1 g KH₂PO₄) estéril, em proporções de 5,4% de ketamina, 8,6% de xilazina e 86% PBS estéril, administrada via intraperitoneal (300 µl por animal). Uma amostra de sangue foi obtida por punção intracardíaca, a fim de minimizar a contaminação, e os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. As amostras de tecido gengival foram coletadas da superfície maxilar adjacente aos molares dos camundongos (figura 3.2), segundo técnica descrita por Mizraji et al. (97), com auxílio de tesoura íris e pinça clínica odontopediátrica.

Figura 3.2 – Representação da área de gengiva excisada para a realização das análises propostas. O objetivo da técnica descrita por Mizraji et al., 2013 é isolar o tecido gengival adjacente aos três molares de cada hemimaxila (área delimitada pela elipse), de modo a maximizar o volume tecidual removido e otimizar as análises posteriores



Fonte: Mizraji et al. (98)

Parte do tecido gengival foi imediatamente transferido para solução de RNA later^{TM} Stabilization Solution (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia), para análise da expressão gênica; a outra parte foi transferida para solução inibidora de proteases [PBS, 0,05% Tween 20, 1mM PMSF (Sigma P7626) e inibidor de proteases (Sigma, P8340) em diluição 1:100], visando à análise de citocinas. Ambas foram armazenadas em freezer a -80°C . Após a remoção do tecido gengival, a hemimaxila direita foi transferida para tubo contendo solução de formaldeído a 4% e assim mantida por 24 horas em temperatura ambiente, seguindo-se transferência para solução salina fosfatada PBS e armazenamento a 4°C até a análise por microtomografia computadorizada.

3.11 Microtomografia computadorizada (MicroCT)

A perda óssea alveolar foi determinada usando um microtomógrafo (SkyScan 1176 versão 1.1, Bruker Biospin, Kontich, Bélgica) a 45kV de voltagem, 550uA de corrente, $8,71\mu\text{m}$ tamanho do pixel, filtro de alumínio 0,2mm. As hemimaxilas direitas dos animais foram escaneadas e as imagens analisadas calculando-se o volume ósseo (CT Analyzer software Version 1.15.4.0, SkyScan, Bruker Biospin, Kontich, Bélgica) da região interproximal entre o primeiro e o segundo molar (área de 60×30 pixels selecionada em 15 cortes coronais a partir da JEC do segundo molar), por examinador cego ao experimento.

3.12 Estudo da expressão gênica (RT-PCR) no tecido gengival

As amostras de tecido gengival em RNA later foram submetidas à extração de RNA utilizando Reagente TRIzol LS (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), conforme instruções do fabricante. Foi utilizado 1,0 ml de TRIzol por fragmento de tecido gengival. Após a incubação por 30 minutos, foram adicionados 100 μl de clorofórmio (LabSynth, São Paulo, Brasil), seguindo-se incubação por 15 minutos em

temperatura ambiente e centrifugação (12.000 xg/15 minutos/4°C). O RNA na fase aquosa foi precipitado com isopropanol (LabSynth, São Paulo, Brasil) e os sais removidos com lavagem por duas vezes com etanol (75%) (LabSynth, São Paulo, Brasil). Após a secagem em temperatura ambiente, o RNA resultante foi ressuscitado em água livre de RNase (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), e tratado com desoxiribonuclease (Ambion™ DNase I, RNase-free, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) por 15 minutos a 25°C. A enzima foi inativada pelo calor (65°C por 10 minutos) e o RNA foi quantificado por mensuração em espectrofotômetro 260 e 280 nm (Nanodrop Technologies ND-1000, Wilmington, EUA) e então utilizado para a síntese de cDNA.

A síntese da fita de cDNA foi realizada utilizando aproximadamente 100 ng de RNA, com o uso do kit SuperScript™ Vilo™ Synthesis Kit para RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), conforme as instruções do fabricante. Foram adicionados 4 µl de 5X VILO™ Reaction Mix, 2 µl de 10X SuperScript™ Enzyme Mix, 1 µl de RNA (100 ng/ml) e água para obter um volume total de 20 µl da reação. Foram utilizados como controles reação sem adição de RNA e reação com adição de RNA e sem adição de Super Script Enzyme Mix.

Após o ciclo inicial de 10 minutos a 25°C, a reação continuou por 1 hora a 42°C, e então o material foi submetido a 85°C por 5 minutos. O cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

O PCR quantitativo foi realizado em um termociclador StepOne Plus System (Applied Biosystems, Foster City, EUA) para análise da expressão gênica. Foram utilizados primers e sondas comerciais Taqman (Applied Biosystem, Foster City, EUA) para camundongos: *il-1β* (Mm00434228_m1), *tnf-α* (Mm00443258_m1), *tlr-2* (Mm01213946_g1), *tlr-4* (Mm00445273_m1), *nlrp3* (Mm04210224_m1), *il-18* (Mm00434226_m1), *il-6* (Mm00446190_m1), *β-actin* (Mm00607939_s1) e *gapdh* (Mm99999915_g1). Cada reação foi realizada utilizando 0,5 µl 20x TaqMan™ Gene Expression Assay (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia), 5 µl 2x PCR Master Mix 2x (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia), 2 µl de cDNA (100 ng), 2,5 µl água RNase free (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA).

Nestes ensaios, a quantificação relativa da expressão dos genes alvo foi feita pelo método do $\Delta\Delta CT$, utilizando a média da expressão dos genes β -actina e GAPDH como controle endógeno (98).

3.13 Determinação dos níveis de citocinas no tecido gengival

As amostras de tecido gengival em solução inibidora de proteases foram homogeneizadas com o auxílio do equipamento Mini Bead Beater (Cole-Parmer, Vernon Hills, EUA), centrifugadas a 10.000 rpm (7.200 xg) por 1 minuto e as proteínas do sobrenadante quantificadas por meio do kit Micro BCA™ Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

As amostras de tecido gengival foram avaliadas quanto aos níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-4 e IL-10 por análise multiplex, usando o sistema Bio-Plex 200 System (Bio-Rad, Hercules, EUA) com um kit customizado de detecção de múltiplas citocinas (MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Kit, Cat. #MPXMCYTO-70K, Millipore-Merck, Burlington, EUA). Os reagentes para o ensaio (*beads* para cada anticorpo, controles de qualidade 1 e 2, tampão para lavagem e curva-padrão) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

Para o início do ensaio, foram adicionados 200 μ l do tampão de lavagem em cada poço da microplaca de 96 poços, mantida em agitação em temperatura ambiente por 10 minutos, para o seguinte descarte da solução. Então, foram adicionados aos respectivos poços 25 μ l das soluções para curva-padrão e dos controles de qualidade e 25 μ l das amostras, seguindo-se à adição de 25 μ l da mistura das *beads* de todos os anticorpos de interesse e de 25 μ l de tampão a todos os poços. Como controle negativo, foi utilizada a solução diluente das amostras (solução inibidora de proteases). A placa foi incubada *overnight* a 2-8°C e, em seguida, lavada duas vezes com o tampão de lavagem (200 μ l por poço) para a adição de 25 μ l de anticorpos de detecção por poço, com seguinte incubação por uma hora em temperatura ambiente. Nesse momento, foram adicionados 25 μ l de streptavidin-phycoerythrin por poço, com nova incubação por trinta minutos em temperatura ambiente. Por fim, a placa foi lavada novamente com 200 μ l de tampão de lavagem por duas vezes para a adição de 150 μ l do fluido Sheath, para a posterior leitura no leitor de microplacas do sistema

Bioplex 200 com o auxílio do software Bio-plex Manager (Bio-Rad, Hercules, EUA). A concentração dos mediadores de interesse (pg/ml) foi calculada a partir da análise da intensidade média de fluorescência em cada amostra.

3.14 Análise estatística

Os dados foram testados em relação a normalidade com teste estatístico Kolmogorov-Sminorv com correlação de Lilliefors e a homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste F. Foi utilizado o teste ANOVA de sentido único seguido do teste de Comparação Múltipla de Tukey para análises estatísticas de dados normais. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. A análise foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prisma® Versão 6.0 (Software GraphPad, La Jolla, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Liofilização do consórcio microbiano e das cepas probióticas

Optamos por utilizar, no presente estudo, as cepas bacterianas em sua forma liofilizada, a fim de garantir a previsibilidade das inoculações, bem como maior controle da concentração dos microrganismos. Para cada inoculação, as bactérias liofilizadas, empregadas no consórcio microbiano de indução da periodontite experimental, foram ressuspensas em caldo BHI e mantidas sob condições anaeróbicas, para os patógenos periodontais anaeróbios estritos, e sob microaerofilia, para *S. gordonii*, a 37°C, por 6 horas, visando que as culturas atingissem a fase logarítmica de crescimento. Os probióticos *Lactobacillus* foram ressuspensos em caldo MRS e ajustada a concentração de acordo com o número de UFC/tubo de cada lote, para serem imediatamente usados como inóculo. Dessa forma, pudemos mimetizar o uso já consagrado de probiótico em humanos, comumente em sua forma liofilizada.

O número de células viáveis por criotubo foi avaliado previamente, a fim de estabelecer-se o protocolo para as inoculações, de modo que 1×10^{11} UFC de cada microrganismo do consórcio e 1×10^9 UFC de cada probiótico fossem empregados nos inóculos ressuspensos na solução de carboximetilcelulose a 2%. O número de UFC por lote de bactérias liofilizadas foi variável; portanto, foi definido o uso dos lotes que apresentassem cerca de 10^{20} (para o consórcio microbiano) e 10^{13} (para as bactérias probióticas) UFC/tubo de cada cepa, a serem diluídos para as concentrações de interesse no momento da inoculação.

A avaliação da manutenção da viabilidade microbiana durante o período experimental indicou que as condições utilizadas para o processo de liofilização foram adequadas para a realização do estudo, desde que observada a condição de estocagem em freezer a -80°C por até 6 meses.

4.2 Perda óssea alveolar

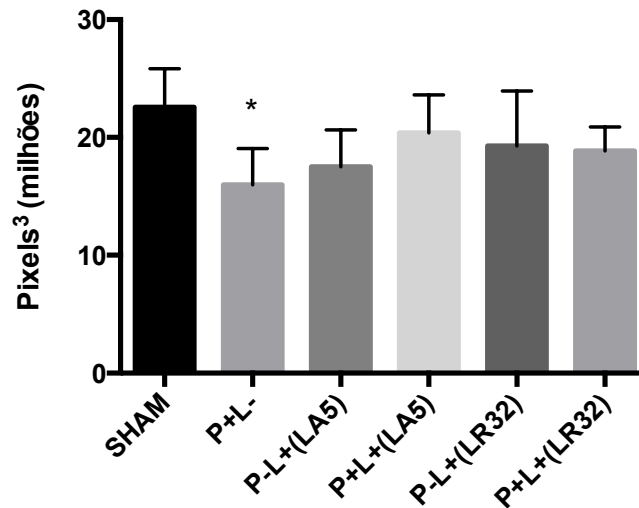
A análise da perda óssea alveolar foi realizada pela estimativa do volume ósseo da hemimaxila direita dos animais, na região interproximal entre o primeiro e o segundo molar (Figura 4.1). Os dados indicaram que o modelo experimental para indução de periodontite foi bem-sucedido, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos SHAM (P-L-) e P+L-; não foi encontrada diferença no volume ósseo entre os demais grupos (ANOVA, comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$), como mostra a figura 4.2. A análise dos dados nos leva a inferir que o tratamento com as cepas probióticas selecionadas controlou a perda óssea alveolar induzida pelo consórcio microbiano (grupos P+L+), e que o tratamento apenas com os probióticos não foi capaz de induzir perda de osso alveolar (P-L+).

Figura 4.1 – Representação da área analisada (região interproximal entre o primeiro e o segundo molar, área de 60 x 30 pixels, corte coronal) para mensuração do volume ósseo.



Fonte: O autor

Figura 4.2 - Dados de volume ósseo (média e desvio padrão) (pixels³) da região interproximal entre o primeiro e o segundo molar (área de 60 x 30 pixels, corte coronal) da hemimaxila direita de camundongos C57BL/6 após 45 dias de diferentes tratamentos: SHAM (controle negativo: veículo consórcio microbiano + veículo probiótico), P+L- (consórcio microbiano + veículo probiótico), P-L+(LA5) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P+L+(LA5) (consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P-L+(LR32) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32), P+L+(LR32) (consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32). (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, p < 0,05%



Fonte: O autor

4.3 Expressão gênica relativa no tecido gengival

A análise da expressão gênica dos genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias *il-1 β* , *tnf- α* , *il-6* e *il-18* revelou que a administração do consórcio microbiano e/ou das cepas probióticas não foi capaz de induzir a expressão destes genes ao final do período experimental, doze dias após a última inoculação, visto que não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo SHAM (P-L-). Podemos notar, entretanto, que a administração do probiótico *L. rhamnosus* LR32 induziu à maior expressão gênica de *il-1 β* , quando comparada à administração do probiótico *L. acidophilus* LA5, nos dois grupos sem indução da doença periodontal [P-L+(LR32) e P-L+(LA5)]. Além disso, *L. rhamnosus* LR32, na presença e na ausência do consórcio microbiano, também induziu ao aumento na expressão gênica de *tnf- α* , quando comparado ao probiótico *L. acidophilus* LA5 nas mesmas condições (Figura 4.3).

Quanto aos genes associados a receptores *toll-like*, os dados sugerem que o probiótico *L. rhamnosus* LR32 regula positivamente a expressão de *tlr4*, na ausência e na presença do consórcio microbiano. Não foram encontradas diferenças entre os grupos estudados quanto à transcrição relativa de *tlr2* e *nlrp3* no tecido gengival (ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p > 0.05$) (Figura 4.4).

Figura 4.3 - Expressão relativa dos genes *il1- β* (Figura 4.3 A), *tnf- α* (Figura 4.3 B), *il-6* (Figura 4.3 C) e *il-18* (figura 4.3 D) por RT-qPCR em tecido gengival dos diferentes grupos: SHAM (controle negativo: veículo consórcio microbiano + veículo probiótico), P+L- (consórcio microbiano + veículo probiótico), P-L+(LA5) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P+L+(LA5) (consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P-L+(LR32) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32), P+L+(LR32) (consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32). Símbolos iguais denotam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, ANOVA, comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$

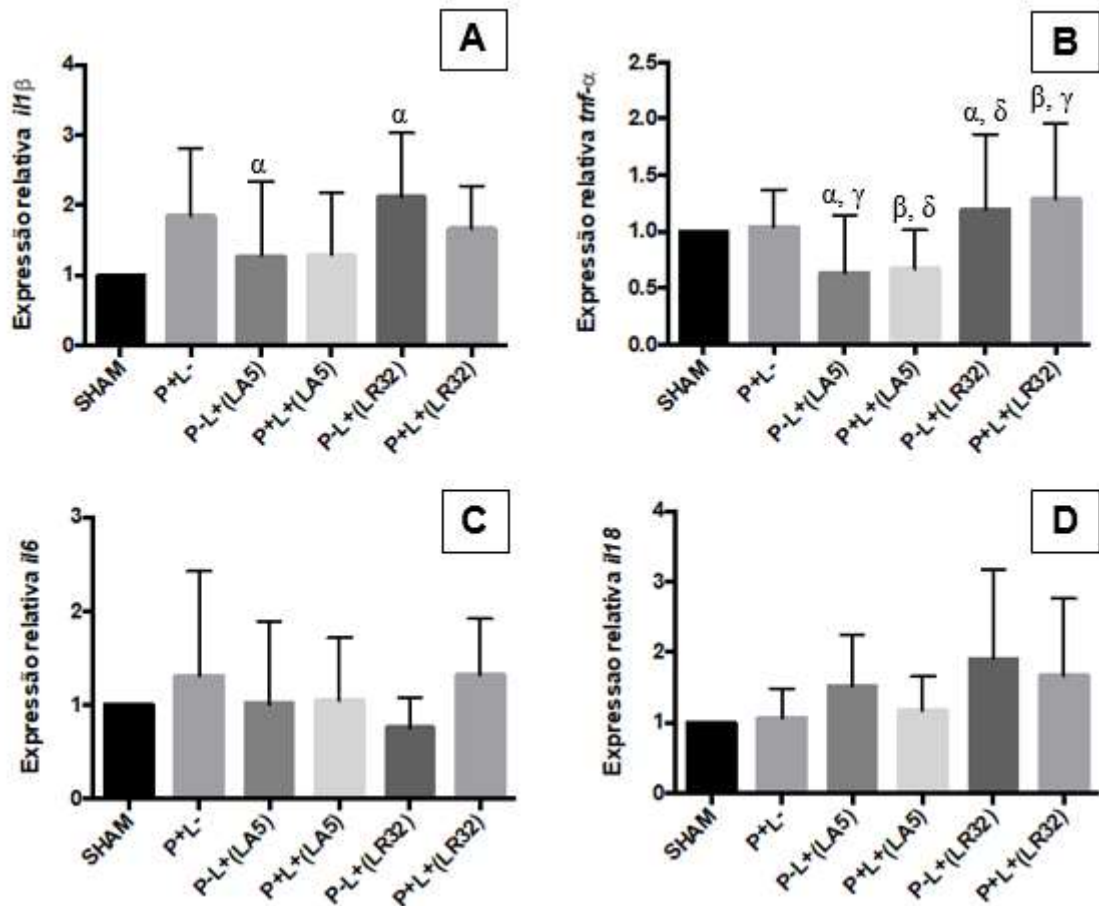
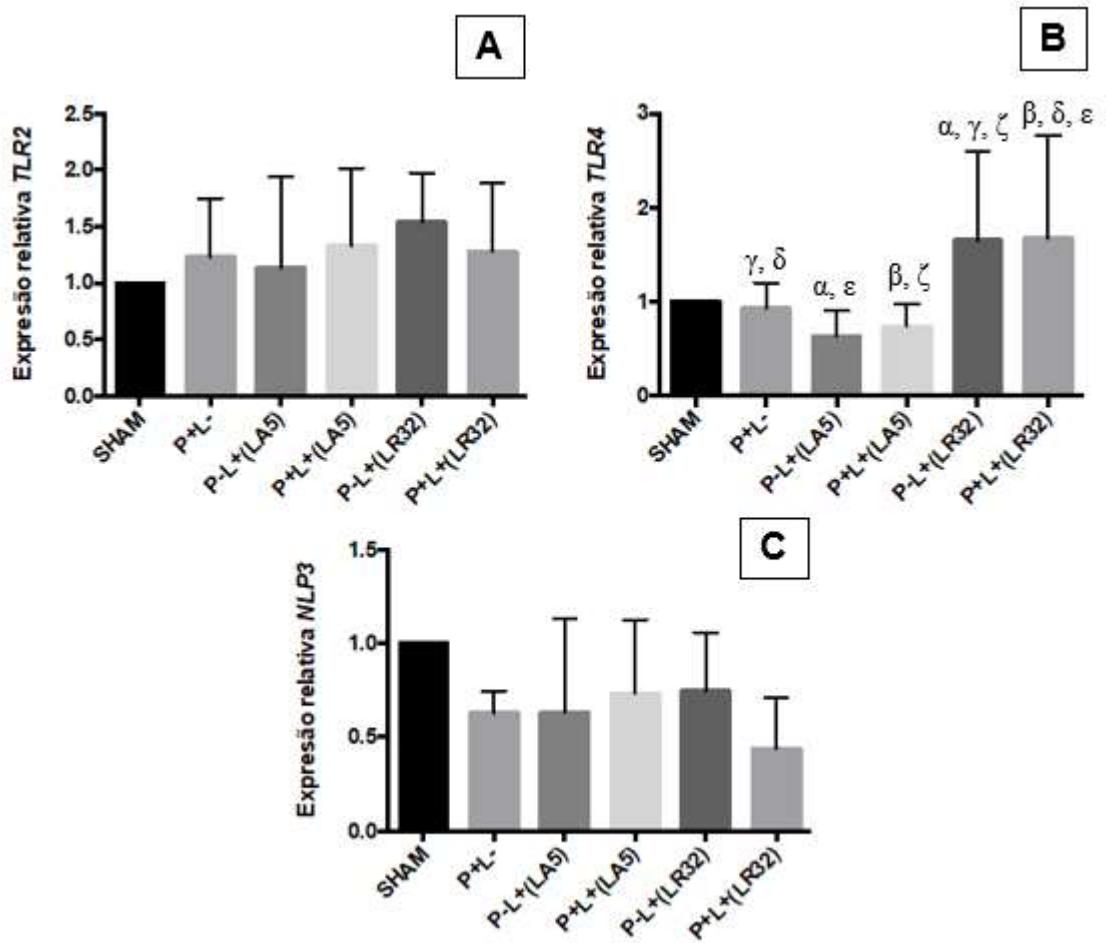


Figura 4.4 - Expressão relativa dos genes *tlr2* (Figura 4.4 A), *tlr4* (Figura 4.4. B) e *nlr3* (Figura 4.4 C) por RT-qPCR em tecido gengival dos diferentes grupos: SHAM (controle negativo: veículo consórcio microbiano + veículo probiótico), P+L- (consórcio microbiano + veículo probiótico), P-L+(LA5) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P+L+(LA5) (consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P-L+(LR32) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32), P+L+ (LR32) (consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32). Símbolos iguais denotam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$



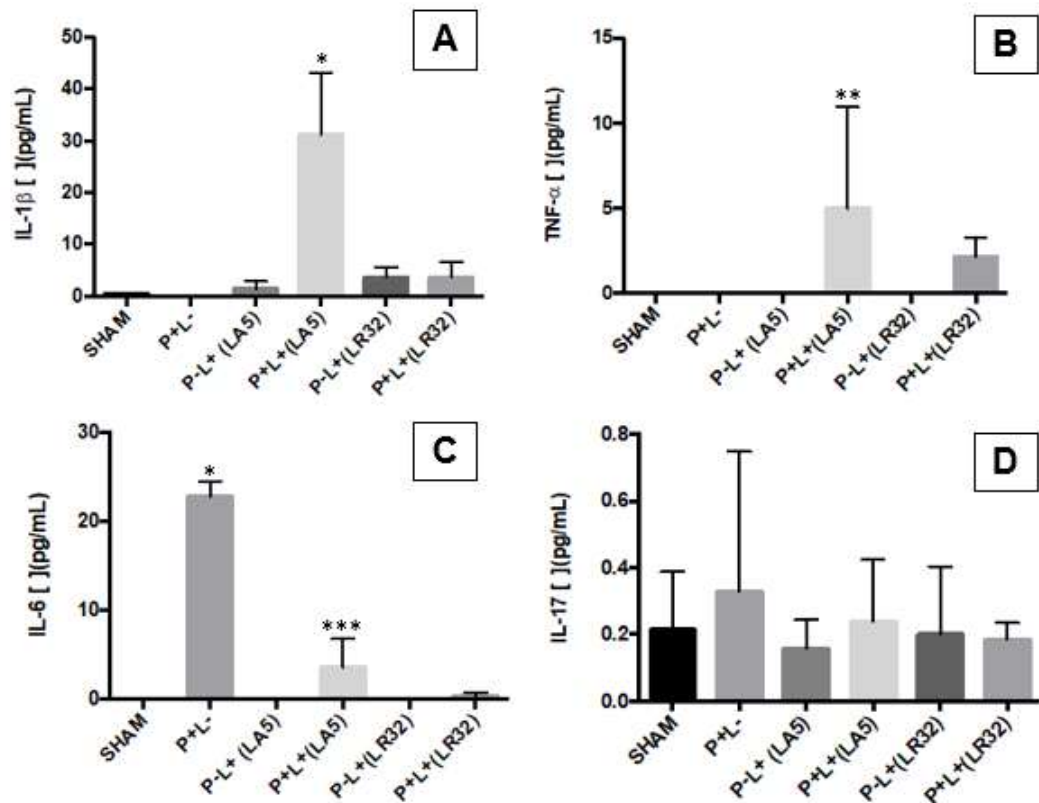
Fonte: O autor

4.4 Determinação dos níveis de citocinas no tecido gengival

Os tecidos gengivais dos animais experimentais foram avaliados quanto aos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α e anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Assim, foi possível observar diferenças nos perfis de citocinas entre os grupos experimentais.

Os grupos experimentais foram individualmente compostos por oito animais. IL-1 β foi detectada em amostras de tecido gengival de dois animais dos grupos P-L, P-L+(LA5), P+L+(LA5) e três animais do grupo P-L+(LR32). Os dados revelam aumento dos níveis desta citocina no grupo inoculado com o consórcio microbiano concomitante ao probiótico *L. acidophilus* LA5. TNF- α , por sua vez, foi detectada em amostras de tecido gengival de dois animais dos grupos P+L+(LA5) e P+L+(LR32), apontando para o aumento dessa citocina primeiro, inoculado com o consórcio microbiano e o probiótico *L. acidophilus* LA5. IL-6 foi detectada em amostras de tecido gengival de dois animais dos grupos P+L- e P+L+(LA5), indicando o aumento dos níveis dessa citocina no grupo sob administração do consórcio de patógenos periodontais. A citocina IL-17 foi detectada em níveis similares para todos os grupos, com discreto aumento no grupo P+L-, inoculado apenas com os patógenos periodontais. Esses dados podem ser observados na figura 4.5.

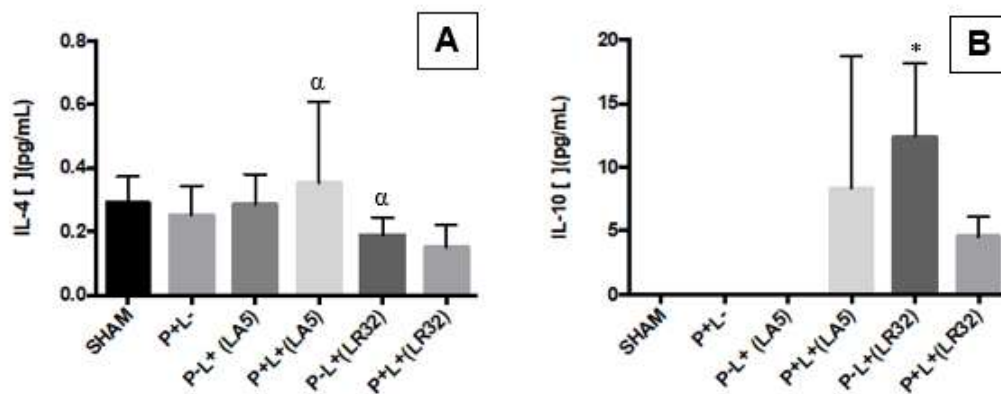
Figura 4.5 – Determinação dos níveis das citocinas (pg/ml) IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-17 (C) e TNF- α (D) por análise multiplex em tecido gengival dos grupos experimentais: SHAM (controle negativo: veículo consórcio microbiano + veículo probiótico), P+L- (consórcio microbiano + veículo probiótico), P-L+(LA5) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P+L+(LA5) (consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P-L+(LR32) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32), P+L+(LR32) (consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32). (*) Diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos experimentais; (**) Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos SHAM e P-L+(LR32); (***) Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos SHAM, P-L+(LA5) e P+L+(LR32), ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$



Fonte: O autor

A citocina IL-4 foi detectada em níveis estatisticamente diferentes entre os grupos P+L+(LA5) e P-L+(LR32), indicando o aumento dos níveis dessa citocina no grupo inoculado com o consórcio microbiano associado ao probiótico *L. acidophilus* LA5. Já para IL-10, os dados indicam que houve aumento dos níveis dessa citocina no tecido gengival do grupo P-L+(LR32), inoculado apenas com o probiótico *L. rhamnosus* LR32 (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Determinação dos níveis das citocinas (pg/ml) IL-4 (A) e IL-10 (B) por análise multiplex em tecido gengival dos grupos experimentais: SHAM (controle negativo: veículo consórcio microbiano + veículo probiótico), P+L- (consórcio microbiano + veículo probiótico), P-L+(LA5) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P+L+(LA5) (consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P-L+(LR32) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32), P+L+(LR32) (consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32). (α) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos com o mesmo símbolo; (*) Diferença estatisticamente significativa relação aos grupos SHAM, P+L-, P-L+(LA5) E P+L+(LR32), ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$.

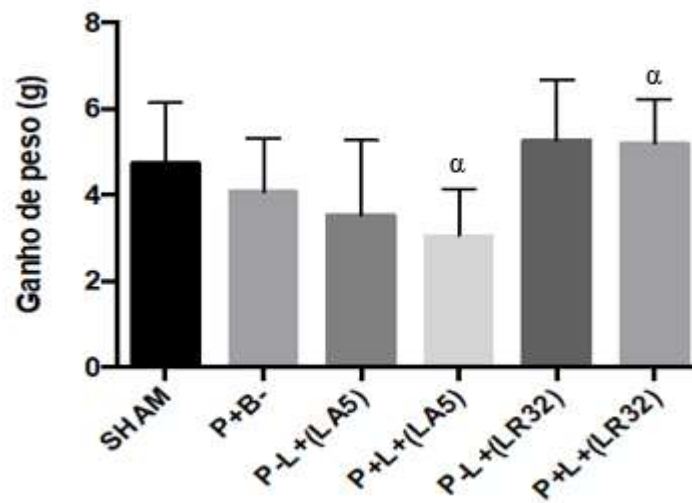


Fonte: O autor

4.5 Efeitos colaterais e ganho de peso induzido pelos diferentes tratamentos

O estudo *in vivo* foi realizado sem intercorrências. Nenhum animal foi perdido no transcorrer dos experimentos e não foram observados efeitos colaterais aos diferentes tratamentos a que os animais foram submetidos, como alterações cutâneas, na pelagem, comportamentais ou locomotoras, bem como quaisquer características que indicassem comprometimento visível. Os animais foram acompanhados durante todo o período experimental; ao final do ensaio, não houve diferença estatisticamente no ganho de peso entre os grupos em relação ao controle SHAM. No entanto, foi encontrada diferença estatisticamente significativa de ganho de peso entre os grupos P+L+(LA5) e P+L+(LR32), com maior ganho para o segundo grupo, como apresentado na figura 4.7.

Figura 4.7 - Média e desvio padrão do ganho de peso dos animais em gramas após os 45 dias de período experimental, de acordo com os grupos: SHAM (controle negativo: veículo consórcio microbiano + veículo probiótico), P+L- (consórcio microbiano + veículo probiótico), P-L+(LA5) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P+L+(LA5) (consórcio microbiano + probiótico *L. acidophilus* LA5), P-L+(LR32) (veículo consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32), P+L+(LR32) (consórcio microbiano + probiótico *L. rhamnosus* LR32). (α) Diferença significativa entre os grupos inoculados com consórcio microbiano e diferentes probióticos (P+L+). ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$



5 DISCUSSÃO

As limitações do tratamento periodontal, bem como os mecanismos ainda não plenamente esclarecidos sobre o desenvolvimento e progressão da doença, revelam a necessidade de questionamentos acerca das abordagens mais comumente empregadas em seu manejo, que não raramente não são capazes de evitar a recolonização dos sítios tratados por periodontopatógenos e novo ciclo destrutivo. Além disso, nos inserimos em um cenário de busca de alternativas às antibioticoterapias, visto que a resistência aos antimicrobianos já é um problema enfrentado pela comunidade médica e odontológica. Assim, os probióticos surgem como uma nova ferramenta no combate às doenças infecciosas.

Lactobacillus, em suas diversas espécies, são organismos comensais que vivem em íntima associação ao organismo humano, sendo oportunamente utilizados como probióticos para tratamentos gastrointestinais há décadas. É interessante notar que o papel dos *Lactobacillus* vai além da inibição do crescimento de diversos patógenos; algumas espécies apresentam significativa ação na manutenção da saúde por meio da estimulação do sistema imune ou do efeito anti-inflamatório (71).

A espécie *Lactobacillus acidophilus* é amplamente reconhecida por seus efeitos probióticos e a mais comumente sugerida para o uso alimentício. A bactéria é constituinte da microbiota humana, podendo ser encontrada na cavidade oral, no trato gastrointestinal e na vagina (99). O início de sua administração como adjuvante à terapia periodontal convencional data de 1994 (100); já nesta ocasião, foram encontrados resultados positivos em relação aos parâmetros clínicos em pacientes periodontais e alterações na microbiota oral, com aumento na abundância de cocos e bacilos Gram-positivos nos pacientes tratados.

A espécie *Lactobacillus rhamnosus* também compõe o grupo de espécies probióticas de amplo uso comercial, vastamente empregada na promoção da saúde gastrointestinal (101) graças à sua grande capacidade adesiva e imunomoduladora (102). Em estudos anteriores, a espécie apresentou forte atividade inibitória sobre o crescimento de patógenos orais graças à produção de substâncias antimicrobianas (103).

As propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas dos lactobacilos os tornaram interessantes a aplicações diversas, além do controle da doença periodontal.

A cepa *L. acidophilus* LA5 vem sendo empregada em uma ampla gama de condições, como o controle da hiperglicemia gestacional (104), o controle glicêmico em pacientes com síndrome metabólica (105), a inibição da forma planctônica e da formação de biofilme de *S. aureus* (106), o controle da atividade de cárie (107), o controle da inflamação sistêmica em obesos (108), dentre outras. Já a cepa *L. rhamnosus* LR32 é menos explorada pela literatura científica; a espécie, entretanto, é estudada em suas diversas cepas para numerosas finalidades, como a inibição do crescimento de *Escherichia coli* e restabelecimento da barreira intestinal (109), a prevenção da infecção por *Candida albicans* (110), o alívio dos efeitos colaterais e restabelecimento da microbiota intestinal após administração de ceftriaxona (111), o controle da obesidade e da inflamação sistêmica (112), a proteção de neonatos contra a infecção respiratória pelo vírus influenza (113), a prevenção de tumores dermatológicos induzidos por exposição aos raios UV (114), dentre outras aplicações. Assim, é importante ressaltar que o emprego dessas bactérias na literatura médica e odontológica é extenso, o que demonstra a segurança em sua administração.

No presente estudo, a periodontite experimental foi induzida por meio da inoculação de organismos patobiontes e patógenos periodontais de origem humana. Esta abordagem é importante, pois a capacidade dos probióticos de promover saúde não é somente atribuída aos seus efeitos sobre o hospedeiro, mas também ao seu efeito direto sobre os microrganismos patogênicos (115).

Os dados obtidos pela análise do ganho de peso e o acompanhamento dos animais dos grupos SHAM (P-L-) e controle positivo (P+L-) revelaram que o modelo de periodontite experimental não interferiu no estado geral de saúde dos animais e permitiu ganho de peso similar ao observado no grupo SHAM (figura 4.7).

A administração das cepas probióticas testadas, *L. acidophilus* LA5 e *L. rhamnosus* LR32 [grupos P-L+(LA5) e P-L+(LR32)] também não resultou em alterações dignas de nota durante o período experimental. Por outro lado, o ganho de peso dos animais dos dois grupos sob indução de periodontite e administração de probiótico diferiram entre si, embora não tenham diferido do grupo SHAM (figura 4.1).

Diferentes espécies de *Lactobacillus*, incluindo *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, são capazes de promover alterações no peso quando associadas a outras medidas de controle do peso (116), e estas alterações ocorrem com alterações no microbioma intestinal. Uma revisão sistemática concluiu que a administração de *L.*

acidophilus foi associada ao ganho de peso (117), enquanto *L. rhamnosus* GG não alterou o ganho de peso em gestantes (118). A análise do genoma de cepas de *Lactobacillus*, associadas ao ganho ou perda de peso, revelou diferenças entre os dois grupos de cepas associadas a genes produtores de bacteriocinas, ao metabolismo de carboidratos e ao metabolismo de lipídios (119), mas não existem informações sobre as cepas aqui testadas, e deve-se ter em mente que o efeito de probióticos é cepa-específico. Cepas relacionadas podem diferir no genótipo e no fenótipo, e, assim, as características de uma cepa ou espécie bacteriana não se reproduzem em outras cepas ou espécies relacionadas (120).

Assim, visto que a periodontite experimental poderia ter promovido alterações no microbioma intestinal (121), os dados sugerem que a administração das duas cepas probióticas testadas pode ter modulado a composição da microbiota intestinal disbiótica induzida pela administração de *P. gingivalis* de maneiras distintas, com reflexo no ganho de peso. Outros dados avaliando o efeito destas cepas em animais submetidos a diferentes dietas, bem como a análise do microbioma intestinal dos animais empregados no presente estudo, são ainda necessários para confirmar esta hipótese.

O modelo experimental de periodontite aqui empregado apresenta limitações. Apesar de ter sido usado um consórcio microbiano visando favorecer a colonização persistente do biofilme oral por organismos de origem humana, em estudo anterior com o mesmo modelo foi demonstrado que *P. gingivalis* não foi detectada no biofilme oral dos animais após 12 dias da última inoculação com o patógeno*. Assim, o possível efeito dos probióticos sobre os patógenos periodontais não pôde ser determinado.

Por outro lado, os dados obtidos pela análise do volume ósseo alveolar dos animais do grupo SHAM (P-L-) e grupo controle positivo (P+L-) revelaram que o modelo de periodontite experimental aplicado ao presente estudo foi bem-sucedido, levando à reabsorção do osso alveolar no grupo infectado (P+L-), corroborando com outros estudos já publicados (65). Cabe observar que o sucesso do modelo experimental do presente estudo também se deve à seleção dos animais. O camundongo C57BL/6 possui perfil inflamatório e é vastamente empregado em investigações de doenças metabólicas e inflamatórias (122). Assim, dentre as

* Shimabukuro et al., dados não-publicados.

espécies disponíveis, esta foi selecionada por adequar-se à proposição de indução de uma doença de caráter inflamatório.

A administração das cepas probióticas testadas, *L. acidophilus* LA5 e *L. rhamnosus* LR32 [grupos P-L+(LA5) e P-L+(LR32)], não foi capaz de induzir à perda óssea alveolar. No entanto, os probióticos foram capazes de controlar a destruição alveolar induzida pelo consórcio microbiano, uma vez que os grupos P+L+(LA5) e P+L+(LR32) apresentaram volume ósseo alveolar semelhante ao controle negativo (grupo SHAM) (figura 4.3).

Outros estudos mostram que cepas probióticas são capazes de controlar a periodontite experimental induzida por ligadura (123,124) ou pela inoculação de patógenos de origem humana (65). No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos modelos experimentais de periodontite utiliza o modelo de ligadura, em que a doença é induzida por um curto espaço de tempo, e os microrganismos envolvidos compõem a microbiota residente dos camundongos, com aumento de espécies não comumente envolvidas na periodontite no homem (90,91).

Os dados indicam o potencial das cepas probióticas testadas no controle da periodontite, sugerindo seu uso como adjuvante ao tratamento periodontal. No entanto, é importante frisar que, no presente estudo, as cepas probióticas foram capazes de controlar o desenvolvimento da doença, não tendo seu efeito testado frente à doença já estabelecida.

As bactérias probióticas têm como um de seus principais mecanismos a capacidade de modulação da resposta imune, e por isso estes organismos podem ser denominados imunobióticos (125). As superfícies mucosas são expostas a microrganismos comensais, patogênicos e a seus produtos, e estes padrões moleculares são reconhecidos por receptores de superfície e citoplasmáticos, desencadeando a resposta imune inata. Microrganismos patogênicos e seus produtos, como toxinas, induzem à secreção de citocinas inflamatórias e quimiocinas e ao recrutamento de células inflamatórias ao sítio da infecção, com o objetivo de limitar a infecção. Microrganismos comensais e seus componentes, por sua vez, normalmente não induzem a uma resposta inflamatória, o que permite a manutenção da homeostase mesmo frente a uma densa colonização (126).

As células epiteliais gengivais expressam receptores TLRs que reconhecem PAMPs, com exceção de TLR10 (127). No entanto, as superfícies mucosas, como a

mucosa intestinal, apresentam regulação negativa de alguns receptores, como TLR4, um mecanismo de controle da resposta inflamatória induzida pela microbiota residente (126). O mesmo ocorre na mucosa oral, onde as células epiteliais gengivais não reconhecem o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, exceto quando este encontra-se internalizado (128). Por outro lado, a completa ausência de sinalização de TLRs em camundongos MyD88^{-/-} resulta em inflamação mais severa do que a encontrada em camundongos selvagens (129).

No presente estudo, foi avaliada a expressão relativa de *tlr2* e *tlr4*, envolvidos no reconhecimento de lipídios, como do ácido lipoteicoico de Gram-positivas por TLR2 e do lipopolissacarídeo de Gram-negativas por TLR4. O ácido lipoteicoico de lactobacilos probióticos induz a uma sinalização mediada por TLR2 que pode levar à produção de citocinas pró-inflamatórias; modificações no ácido lipoteicoico podem resultar em aumento da atividade anti-inflamatória de certos probióticos (125). Há crescentes evidências na literatura que suportam a aplicação terapêutica e preventiva de probióticos para diversos distúrbios inflamatórios gastrointestinais em que os receptores TLRs exercem importante papel (130).

A periodontite também pode ser caracterizada como uma doença inflamatória em que o papel dos receptores *toll-like* merece destaque. A camada basal do epitélio gengival apresenta maior número de células expressando TLRs que as demais camadas, e a comparação entre a gengiva saudável e com periodontite revela que a expressão de TLR2, TLR6 e TLR9 é maior na camada basal do epitélio, e que o número de células TLR+ é maior no tecido conjuntivo de sítios com periodontite do que em estado de saúde gengival (127). Por outro lado, em estudo que expôs o tecido gengival a biofilmes comensal e patogênico, observou-se que o biofilme associado à saúde leva à ativação de vias de sinalização por TLR, induzindo à secreção de peptídeos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas para combater potenciais desafios, além de aumentar a proliferação e a estratificação da barreira epitelial, enquanto as bactérias patogênicas levam a uma resposta inflamatória de menor intensidade, favorecendo a evasão das defesas do hospedeiro (131).

A indução de periodontite experimental por inoculação do consórcio microbiano não resultou em alteração na expressão de genes codificando receptores de superfície, como *tlr2* ou *tlr4*. Estudos *in vitro* indicam que LPS de *P. gingivalis* resulta em regulação positiva de *tlr4* (132). Nossos dados também diferem dos obtidos utilizando modelo de periodontite experimental induzida por ligadura

associada à infecção por *P. gingivalis*. Este modelo resultou em maior expressão de *tlr4* após 10 dias de manutenção da ligadura, e a administração de antagonista a *tlr4*, como TAK-242, aboliu a regulação positiva do receptor, bem como a destruição do osso alveolar (133). As diferenças metodológicas entre os dois estudos podem ter contribuído para os diferentes resultados. Embora no presente estudo tenha sido detectada destruição do osso alveolar, a análise das amostras de tecido gengival foi realizada doze dias após o último desafio com o consórcio microbiano, diferindo do estudo de Qi et al. (133). Assim, a ausência de diferença na expressão relativa de *tlr2* e *tlr4* entre os grupos P+L- e SHAM pode ter-se dado devido ao intervalo entre o desafio e a eutanásia dos animais.

Um dado relevante do presente estudo é a observação de que a cepa *L. rhamnosus* LR32 induziu ao aumento da expressão do gene que codifica *tlr4* nos dois grupos aos quais foi administrada, ou seja, na presença e na ausência do consórcio microbiano. A ativação de TLR4 se relaciona intimamente à resposta inflamatória aguda, transdução de sinais celulares e apoptose. Muitos estudos mostram que probióticos modulam a resposta induzida pela ativação de TLR4, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (134). Por outro lado, a administração de alguns probióticos, como *L. plantarum*, pode aumentar a abundância dos receptores *toll-like*, como TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9 no íleo e TLR4 no cólon (135).

Também é interessante notar que não houve detecção de aumento da expressão gênica de *il-1 β* , *tnf- α* , *il-6* e *il-18* no grupo P+L-, importantes mediadores pró-inflamatórios, ainda que fosse esperado encontrar um perfil inflamatório nos animais sob indução da doença periodontal. O aumento da transcrição de fatores inflamatórios está relacionado aos primeiros estágios de inflamação na doença periodontal, enquanto a regulação negativa da transcrição favorece a sobrevivência de periodontopatógenos, incluindo *P. gingivalis*, na cronificação da doença. *P. gingivalis* é capaz de inibir o inflamassoma, plataforma intracelular que libera IL-1 β madura ao ambiente extracelular, para subverter a resposta imune do hospedeiro e, assim, favorecer sua perpetuação (44). A expressão gênica de *il-1 β* e de *tnf- α* , entretanto, diferiu entre os grupos sob inoculação das cepas probióticas. A inoculação exclusiva da cepa probiótica *L. rhamnosus* LR32 parece elevar a expressão desses mediadores inflamatórios, enquanto a cepa *L. acidophilus* LA5 tem efeito oposto.

A determinação dos níveis das citocinas analisadas do tecido gengival possibilitou a evidência do perfil inflamatório dos grupos experimentais. A citocina IL-6, considerada um biomarcador da periodontite, apresentou níveis significativamente aumentados nos animais inoculados apenas com o consórcio microbiano indutor da periodontite experimental. (P+L-) quando este foi comparado com o controle (SHAM) (Figura 4.5 C). Esta interleucina, originalmente identificada como um fator de diferenciação de células B e produzida por diversos tipos celulares, é uma citocina multifuncional que regula a resposta imune, a hematopoese, a resposta de fase aguda e a inflamação (136). Embora sua expressão seja estritamente controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, a desregulação contínua de sua síntese desempenha um efeito patológico na inflamação crônica e auto-imunidade (137). Os níveis de IL-17 também foram maiores neste grupo que no grupo SHAM, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Os níveis de IL-1 β e TNF- α , porém, foram semelhantes no tecido gengival de SHAM e P+L-. Estudos anteriores (138) mostraram que a inoculação via oral de *P. gingivalis* elevou os níveis de TNF- α e IL-6 apenas no primeiro dia de inoculação; após trinta dias, os níveis das citocinas no grupo sob inoculação da bactéria foram mais baixos que nos animais não-inoculados, o que pode ser resultado de um mecanismo de *feedback* negativo. Esse dado do presente estudo também pode ter sido influenciado pelo longo intervalo entre a última inoculação do consórcio microbiano e a eutanásia dos animais.

A administração das cepas probióticas resultou em perfis de citocinas nos tecidos gengivais distintos. Os níveis de IL-1 β foram significativamente maiores no grupo sob indução da doença periodontal associada à administração do probiótico *L. acidophilus* LA5; entretanto, a detecção foi limitada a dois animais deste grupo. Este dado pode indicar que o consórcio microbiano suprimiu a maturação de IL-1 β , como observado em estudos *in vitro* em que *P. gingivalis* foi capaz de reduzir a ativação do inflamassoma (44). O probiótico *L. acidophilus* LA5, porém, parece ter sido capaz de alterar esta sinalização, induzindo a maior liberação de IL-1 β . Estes dados poderiam indicar que *L. acidophilus* LA5 apresenta atividade de um organismo comensal (131) benéfico, capaz de induzir uma resposta imune capaz de possibilitar a defesa contra o patógeno.

Este dado é corroborado pela análise do perfil das citocinas anti-inflamatórias, onde pudemos observar o aumento dos níveis de IL-4 no tecido gengival do grupo sob

indução da doença periodontal associada à administração do probiótico *L. acidophilus* LA5, enquanto os níveis desta citocina foram menores no grupo sob administração do probiótico *L. rhamnosus* LR32 (Figura 4.6 A). Deve ser ressaltado, no entanto, que diferenças significantes foram detectadas apenas entre P+L+(LA5) e P-L+(LR32). A partir desses dados, podemos inferir que o probiótico *L. acidophilus* LA5 direcionou o sistema imune a uma resposta T helper 2 (Th2), enquanto *L. rhamnosus* LR32 induziu a uma resposta T helper 1 (Th1), como demonstrado em outros estudos (139). Esta é uma característica variável entre cepas de *L. acidophilus*, pois diversas cepas de *L. acidophilus* podem promover respostas Th1 em modelos murinos (140,141).

A sinalização promovida por IL-4 desempenha um papel central na resposta Th2, que garante processos de proteção ao hospedeiro e reparação tecidual. Esse tipo de resposta imune, entretanto, também está envolvido na patogênese de doenças alérgicas. Os neutrófilos iniciam a resposta Th2, recrutando outras células imunes inatas e adaptativas; no entanto, assim que as citocinas IL-4 e IL-13 predominam, o recrutamento de neutrófilos, quimiotaxia e funções efetoras são rapidamente bloqueados pela sinalização mediada por essas citocinas, impedindo o dano a tecidos saudáveis. Em alguns tipos de resposta Th2, em que o aumento da atividade neutrofílica está presente, existe maior atividade imune às custas de maior dano tecidual (142).

A resposta imune do tipo 1, por sua vez, é altamente inflamatória, com o objetivo de ativar células fagocíticas, como neutrófilos, células T auxiliares tipo 1 (Th1) e macrófagos do tipo 1 (M1) para destruir os alvos e é frequentemente associada ao dano tecidual, mediada por IL-2, IFN- γ e linfotóxina- α secretada pelos linfócitos Th1. Em linhas gerais, quando considerados a dicotomia Th1–Th2, a imunidade do tipo 2 é geralmente considerada uma função reguladora (143). Entretanto, estudos recentes descobriram que o papel da imunidade do tipo 2 inclui atuar como uma resposta efetiva importante que possui diversas atividades de proteção do hospedeiro, além de suprimir a imunidade do tipo 1 e a inflamação causada por esta resposta (144).

A análise dos níveis de IL-10 no tecido gengival, por sua vez, mostrou que a administração de *L. rhamnosus* LR32 nos animais saudáveis, sem administração do consórcio microbiano, aumentou os níveis dessa citocina. Quando houve a indução da doença periodontal, os níveis de IL-10 diminuíram, mas não atingiram os níveis não detectáveis observados no grupo SHAM ou P+L-. A administração de *L. acidophilus* LA5 também resultou em níveis detectáveis de IL-10 no tecido gengival de animais do grupo P+L+(LA5). IL-10 é uma citocina anti-inflamatória reguladora negativa das respostas imunes a antígenos microbianos, particularmente importante na manutenção da homeostase intestinal. Esta inibe a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e G-CSF (145). A queda dos níveis de IL-10 no intestino, por exemplo, promove o desenvolvimento de doença inflamatória intestinal como consequência de uma resposta imune excessiva à microbiota intestinal. Por outro lado, a produção excessiva de IL-10 dificulta a eliminação efetiva de patógenos e pode levar à cronificação de processos infecciosos (146).

Esta citocina tem importante papel regulador durante o curso de uma infecção, com vistas a evitar atividade inflamatória excessiva e decorrente dano tecidual. Embora IL-10 possa ser produzida por praticamente todas as células do sistema imunológico inato e adaptativo, as células T constituem uma fonte não redundante de IL-10 em muitos casos (147). Apesar de seu conhecido papel anti-inflamatório, IL-10 possui dupla funções dependendo do contexto. Nas células T, foi inicialmente descrita como uma citocina de assinatura de células Th2; no entanto, pode também ser expressa por outros subconjuntos efetores, como células Th1 ou Th17. Dado seu papel como uma importante citocina com propriedades anti e pró-inflamatórias, IL-10 foi testada em vários ensaios clínicos para o tratamento de doenças autoimunes e câncer (148).

É fundamental ter-se em mente que os probióticos elicitam respostas transcricionais biologicamente coerentes, incluindo a regulação de genes com baixa variabilidade de expressão, como STAT3 (139), um importante regulador da tolerância imunológica e de células Th pró e anti-inflamatórias (149). Entretanto, é improvável que todos os indivíduos experimentem as mesmas consequências fisiológicas pela administração de probióticos, visto que estas são dependentes de características moleculares individuais. Essa contextualização é importante para compreender que o sucesso terapêutico dos probióticos depende de uma indicação personalizada, que tenha como alvo subpopulações com fenótipos pré-determinados (150). As bases da

individualidade molecular das mucosas ainda necessitam de esclarecimento por estudos futuros, mas possivelmente seja afetada pelo genótipo do hospedeiro, estilo de vida, hábitos alimentares e composição da microbiota residente. A literatura escassa acerca deste tópico representa uma grande dificuldade em nossa capacidade de explicar os efeitos dos probióticos em nível clínico.

O interesse nos probióticos como alternativa terapêutica também tem razões práticas, que vão além de suas características antimicrobianas e imunomoduladoras, visto que apresentam grande versatilidade em relação às formas de administração, que pode se dar por meio de produtos alimentícios (queijo, leite, iogurte) ou de suplementos via gomas de mascar, pastilhas, cápsulas, enxaguantes bucais, sprays, etc. Além disso, os estudos que envolvem a administração de probióticos não relatam efeitos colaterais importantes ao seu uso. Essas características tornam a adesão ao tratamento facilitada por parte dos pacientes, o que colabora com seu sucesso terapêutico.

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do indivíduo (Resolução da Diretoria Colegiada – RDC, Nº 241, de 26 de julho de 2018, publicada no DOU nº 144, de 27 de julho de 2018). Portanto, além da seleção de cepas de forma personalizada e da adesão do tratamento por parte dos pacientes, o sucesso da administração de probióticos também depende do número de bactérias contido nas formulações, sendo desejada a presença de pelo menos 10^7 microrganismos por grama/mililitro de alimento (151). Visto que as bactérias probióticas devem atingir seus sítios de ação ainda vivas, também é necessário que a preparação das formulações permita que essas resistam aos processos industriais, que incluem estresses oxidativos, térmicos e osmóticos, ao tempo de prateleira e, por fim, ao trânsito no trato gastrointestinal, onde condições adversas como baixo pH, exposição à bile e a enzimas digestivas no duodeno são enfrentadas (152).

No presente estudo, foram utilizadas doses diárias de 10^9 UFC/probiótico em um animal de 30 gramas, ou $3,3 \times 10^{11}$ UFC/kg. Assim, a dose equivalente para um homem pesando 70 kg seria de $2,3 \times 10^{13}$ /dia. Entretanto, o Food and Drug Administration (FDA) sugere que a extrapolação da dose animal para a dose humana seja corretamente realizada somente através da normalização pela área de superfície

corporal (BSA) (153). Por este cálculo, a dose indicada para o uso humano seria de $2,6 \times 10^{10}$ UFC/kg, ou $1,8 \times 10^{12}$ UFC/dia para um adulto de 70 kg.

Os dados aqui apresentados sugerem que ambos os probióticos testados, *L. acidophilus* LA5 e *L. rhamnosus* LR32 apresentam potencial para o controle da doença periodontal, com mecanismos de modulação da resposta distintos. Frente aos resultados obtidos, observamos que são necessários novos testes, com diferentes períodos de administração do consórcio microbiano e regimes de administração das cepas probióticas, visando a uma compreensão mais ampla dos mecanismos de ação envolvidos na interação entre as bactérias probióticas, as bactérias periodontais e o hospedeiro. Além disso, o presente estudo foi executado sob protocolo antibiótico prévio, o que pode se caracterizar como uma limitação do estudo, devido as alterações no microbioma oral e intestinal introduzidas pela antibioticoterapia. Em investigações posteriores, o modelo de periodontite experimental e o tratamento com probióticos deverão também ser executados na ausência da interferência sobre a microbiota residente dos animais. Por fim, também parece interessante aos nossos objetivos a diminuição do intervalo entre a última inoculação do consórcio microbiano e a eutanásia dos animais.

Ainda que os ensaios relacionados às bactérias probióticas estejam evoluindo em direção à investigação das interações entre o hospedeiro e os microrganismos, um longo caminho para a detalhada caracterização molecular das cepas probióticas ainda deverá ser trilhado, de modo a esclarecer a especificidade das cepas e comparar seus efeitos em diferentes condições.

6 CONCLUSÃO

Ponderando-se acerca das limitações do modelo experimental aplicado ao presente estudo, a análise dos dados aqui expostos permite concluir que:

A administração oral do probiótico *L. acidophilus* LA5:

- Parece ser capaz de controlar a perda óssea alveolar induzida pelo consórcio microbiano;

- Não alterou a expressão gênica de *il-1 β* , *tnf- α* , *il-6*, *il-18*, *tlr2*, *tlr4* e *nlrp3* no tecido gengival;

- Pode regular positivamente os níveis de IL-1 β e IL-4 no tecido gengival;

- Não afetou o ganho de peso dos animais.

A administração oral do probiótico *L. rhamnosus* LR32, por sua vez:

- Parece ser capaz de controlar a perda óssea alveolar induzida pelo consórcio microbiano;

- Não alterou a expressão gênica de *il-1 β* , *tnf- α* , *il-6*, *il-18*, *tlr2* e *nlrp3*, mas regulou positivamente a expressão de *tlr4* no tecido gengival;

- Regulou positivamente os níveis de IL-10 no tecido gengival;

- Induziu ao maior ganho de peso nos animais sob indução da doença periodontal, quando comparado aos animais sob a mesma condição tratados com a cepa probiótica *L. acidophilus* LA5.

Assim, os dados aqui apresentados sugerem que as cepas *L. acidophilus* LA5 e *L. rhamnosus* LR32 apresentam potencial papel adjuvante na prevenção e controle da doença periodontal, sendo necessária a condução de novos estudos para uma ampla compreensão dos mecanismos que envolvem a relação entre as cepas e o hospedeiro, que fundamente substancialmente uma futura indicação clínica segura e efetiva.

REFERÊNCIAS¹

1. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134–44. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x
2. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1–6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1
3. Palm NW, de Zoete MR, Flavell RA. Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clin Immunol*. 2015 Aug;159(2):122-127. doi: 10.1016/j.clim.2015.05.014.
4. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.
5. Gupta G. Probiotics and periodontal health. *J Med Life*. 2011 Nov 14;4(4):387-94.
6. Socransky SS, Haffajee AD, Teles R, Wennstrom JL, Lindhe J, Bogren A, et al. Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota over a 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. *J Clin Periodontol*. 2013 Aug;40(8):771-80. doi: 10.1111/jcpe.12117.
7. Mdala I, Olsen I, Haffajee AD, Socransky SS, de Blasio BF, Thoresen M. Multilevel analysis of bacterial counts from chronic periodontitis after root planing/scaling, surgery, and systemic and local antibiotics: 2-year results. *J Oral Microbiol*. 2013; 5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20939
8. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Dec;24(6):469-77. doi: 10.1111/j.1399-302X.2009.00544.x.
9. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28:12-55. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x

¹ De acordo com estilo Vancouver.

10. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012 Dec;27(6):409-19. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x.
11. Hajishengallis G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan;15(1):30-44. doi: 10.1038/nri3785.
12. Wingrove JA, Discipios RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. Activation of Complement Components C3 and C5 by a Cysteine Proteinase (Gingipain-1) from *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis*+. *J Biol Chem*. 1992 Sep 15; 67(26):18902-7.
13. Wang J, Li H, Li B, Gong Q, Chen X, Wang Q. Co-culture of bone marrow stem cells and macrophages indicates intermediate mechanism between local inflammation and innate immune system in diabetic periodontitis. *Exp Ther Med*. 2016 Aug 1;12(2):567-72. doi: 10.3892/etm.2016.3386
14. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jul;8(7):481-90. doi: 10.1038/nrmicro2337.
15. Sakanaka A, Takeuchi H, Kuboniwa M, Amano A. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells. *Microb Pathog*. 2016 May;94:42-7. doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.003
16. Choi CH, Spooner R, DeGuzman J, Koutouzis T, Ojcius DM, Yilmaz Ö. *Porphyromonas gingivalis* -nucleoside-diphosphate-kinase inhibits ATP-induced reactive-oxygen-species via P2X₇ receptor/NADPH-oxidase signalling and contributes to persistence. *Cell Microbiol* [Internet]. 2013 Jun;15(6):961-76.
17. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Dec;62(4):1244-63.
18. Kuboniwa M, Houser JR, Hendrickson EL, Wang Q, Alghamdi SA, Sakanaka A, et al. Metabolic crosstalk regulates *Porphyromonas gingivalis* colonization and virulence during oral polymicrobial infection. *Nat Microbiol*. 2017 Nov;2(11):1493-1499. doi: 10.1038/s41564-017-0021-6.
19. Teixeira SRL, D'Epiro TTS, Pinheiro ET, Simionato MRL, Taniwaki NN, Kisielius JJ, et al. Lineage variability in surface components expression within *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*. 2014 Dec;77:100-4. doi: 10.1016/j.micpath.2014.11.001.

20. Laine ML, Winkelhoff AJ. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*. 1998 Oct;13(5):322-5. doi: 10.1111/j.1399-302x.1998.tb00714.x
21. Polak D, Ferdman O, Hourri-Haddad Y. *Porphyromonas gingivalis* Capsule-Mediated Coaggregation as a Virulence Factor in Mixed Infection With *Fusobacterium nucleatum*. *J Periodontol*. 2017 May;88(5):502-510. doi: 10.1902/jop.2016.160397.
22. Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, Van Winkelhoff AJ, et al. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol*. 2010 Jan 11;10:5. doi: 10.1186/1471-2180-10-5.
23. Yoshimura M, Ohara N, Kondo Y, Shoji M, Okano S, Nakano Y, et al. Proteome analysis of *Porphyromonas gingivalis* cells placed in a subcutaneous chamber of mice. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):413-8. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00444.x.
24. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol*. 2003 Feb;11(2):94-100. doi: 10.1016/s0966-842x(02)00034-3
25. Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen KA, Wawrzonek K, Manandhar SP, et al. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. *PLoS Pathog*. 2009 Feb;5(2):e1000316. doi: 10.1371/journal.ppat.1000316.
26. Byrne DP, Potempa J, Olczak T, Smalley JW. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. *Mol Oral Microbiol*. 2013 Jun;28(3):219-29. doi: 10.1111/omi.12018.
27. Malm S, Jusko M, Eick S, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. Acquisition of complement inhibitor serine protease factor i and its cofactors C4b-binding protein and factor H by *Prevotella intermedia*. *PLoS One*. 2012;7(4):e34852. doi: 10.1371/journal.pone.0034852.
28. Barbosa GM, Colombo AV, Rodrigues PH, Simionato MRL. Intraspecies variability affects heterotypic biofilms of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*: Evidences of strain-dependence biofilm modulation by physical contact and by released soluble factors. *PLoS One*. 2015 Sep 25;10(9):e0138687. doi: 10.1371/journal.pone.0138687.

29. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013 Apr;28(2):83-101. doi: 10.1111/omi.12012
30. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):816-25. doi: 10.1038/sj.cdd.4401850
31. Ferrand J, Ferrero RL. Recognition of Extracellular Bacteria by NLRs and Its Role in the Development of Adaptive Immunity. *Front Immunol*. 2013 Oct 21;4:344. doi: 10.3389/fimmu.2013.00344
32. Ojcius D, Saïd-Sadier N. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J*. 2012 Nov-Dec; 35(6): 437–449. doi: 10.4103/2319-4170.104408
33. de Kivit S, Tobin MC, Forsyth CB, Keshavarzian A, Landay AL. Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: Implications for pro- and prebiotics. *Front Immunol*. 2014; 5: 60. doi: 10.3389/fimmu.2014.00060
34. Li JP, Chen Y, Ng CHC, Fung ML, Xu A, Cheng B, et al. Differential expression of Toll-like receptor 4 in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontal Res*. 2014 Dec;49(6):845-54. doi: 10.1111/jre.12173.
35. To TT, Gümüş P, Nizam N, Buduneli N, Darveau RP. Subgingival plaque in periodontal health antagonizes at Toll-like receptor 4 and inhibits E-selectin expression on endothelial cells. *Infect Immun*. 2015 Oct 19;84(1):120-6. doi: 10.1128/IAI.00693-15.
36. Coats SR, Reife RA, Bainbridge BW, Pham TTT, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Antagonizes *Escherichia coli* Lipopolysaccharide at Toll-Like Receptor 4 in Human Endothelial Cells. *Infect Immun*. 2003 Dec;71(12):6799-807. doi: 10.1128/iai.71.12.6799-6807.2003
37. Sugawara S, Arakaki R, Rikiishi H, Takada H. Lipoteichoic Acid Acts as an Antagonist and an Agonist of Lipopolysaccharide on Human Gingival Fibroblasts and Monocytes in a CD14-Dependent Manner. *Infect Immun*. 1999 Apr;67(4):1623-32.
38. Hajishengallis G, Wang M, Liang S, Shakhathreh M-AK, James D, Nishiyama S, et al. Subversion of Innate Immunity by Periodontopathic Bacteria via Exploitation of Complement Receptor-3. *Adv Exp Med Biol*. 2008;632:203-19. doi: 10.1007/978-0-387-78952-1_15

39. El-Awady AR, Miles B, Scisci E, Kurago ZB, Palani CD, Arce RM, et al. *Porphyromonas gingivalis* Evasion of Autophagy and Intracellular Killing by Human Myeloid Dendritic Cells Involves DC-SIGN-TLR2 Crosstalk. *PLoS Pathog.* 2015 Feb 13;10(2):e1004647. doi: 10.1371/journal.ppat.1004647.
40. Wang M, Krauss JL, Domon H, Hosur KB, Liang S, Magotti P, et al. Microbial Hijacking of Complement-Toll-Like Receptor Crosstalk. *Sci Signal.* 2010 Feb 16;3(109):ra11. doi: 10.1126/scisignal.2000697.
41. Maekawa T, Krauss JL, Abe T, Jotwani R, Triantafilou M, Triantafilou K, et al. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell Host Microbe.* 2014 Jun 11;15(6):768-78. doi: 10.1016/j.chom.2014.05.012.
42. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol.* 2012 Mar 19; 13(4): 325–332. doi: 10.1038/ni.2231
43. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002 Aug;10(2):417-26. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00599-3
44. Shibata K. Historical aspects of studies on roles of the inflammasome in the pathogenesis of periodontal diseases. *Mol Oral Microbiol.* 2018 Jun;33(3):203-211. doi: 10.1111/omi.12217
45. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol.* 2015;4:296-307. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.008.
46. Man SM, Karki R, Kanneganti T-D. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur J Immunol.* 2016 Feb;46(2):269-80. doi: 10.1002/eji.201545839
47. Park E, Na HS, Song YR, Shin SY, Kim YM, Chung J. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Porphyromonas gingivalis* infection. *Infect Immun.* 2014 Jan;82(1):112-23. doi: 10.1128/IAI.00862-13

48. Dutzan N, Vernal R, Vaque JP, García-Sesnich J, Hernandez M, Abusleme L, et al. Interleukin-21 Expression and Its Association With Proinflammatory Cytokines in Untreated Chronic Periodontitis Patients. *J Periodontol*. 2012 Jul;83(7):948-54. doi: 10.1902/jop.2011.110482
49. Stadler AF, Angst PDM, Arce RM, Gomes SC, Oppermann R V., Susin C. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis *J Clin Periodontol*. 2016 Sep;43(9):727-45. doi: 10.1111/jcpe.12557
50. Mark Bartold P, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017 Oct;75(1):317-329. doi: 10.1111/prd.12169.
51. Paola R, Mazzon E, Muià C, Crisafulli C, Terrana D, Greco S, et al. Effects of etanercept, a tumour necrosis factor- α antagonist, in an experimental model of periodontitis in rats. *Br J Pharmacol*. 2007 Feb;150(3):286-97. doi: 10.1038/sj.bjp.0706979
52. Matsubara VH, Bandara HMHN, Ishikawa KH, Mayer MPA, Samaranayake LP. The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016 Jul;14(7):643-55. doi: 10.1080/14787210.2016.1194198.
53. Raff A, Hunt LC. Probiotics for Periodontal Health: A Review of the Literature. *J Dent Hyg*. 2012;86(2):71–81.
54. Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J*. 2006;30(2):55-60.
55. Riccia DN Della, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trinchieri V, Amicosante G, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis*. 2007 Jul;13(4):376–85. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x
56. Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):897-905. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01306.x.
57. 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 Oct;36(10):850-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01459.x

58. Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(1):19-24. doi: 10.1080/00016350802516170
59. 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 Nov 2;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5344.
60. Theodoro LH, Cláudio MM, Nuernberg MAA, Miessi DMJ, Batista JA, Duque C, et al. Effects of *Lactobacillus reuteri* as an adjunct to the treatment of periodontitis in smokers: randomised clinical trial. *Benef Microbes*. 2019 Apr 19;10(4):375-384. doi: 10.3920/BM2018.0150
61. Toiviainen A, Jalasvuori H, Lahti E, Gursoy U, Salminen S, Fontana M, et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin Oral Investig*. 2015 Jan;19(1):77-83. doi: 10.1007/s00784-014-1221-6.
62. Alanzi A, Honkala S, Honkala E, Varghese A, Tolvanen M, Söderling E. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Benef Microbes*. 2018 Jun 15;9(4):593-602. doi: 10.3920/BM2017.0139
63. 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 Nov;40(11):1025-35. doi: 10.1111/jcpe.12155.
64. Laleman I, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. A dual strain *Lactobacilli reuteri* probiotic improves the treatment of residual pockets: a randomized controlled-clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2019 Sep 14. doi: 10.1111/jcpe.13198.
65. Gatej SM, Marino V, Bright R, Fitzsimmons TR, Gully N, Zilm P, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2018 Feb;45(2):204-212. doi: 10.1111/jcpe.12838.
66. Giorgetti GM, Brandimarte G, Fabiocchi F, Ricci S, Flamini P, Sandri G, et al. Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. *J Immunol Res*. 2015; 2015: 501361. doi: 10.1155/2015/501361

67. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol.* 2007 Apr 1;115(1):1-11. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.006
68. Gillor O, Vriezen JAC, Riley MA. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. *Microbiology.* 2008 Jun; 154(Pt 6): 1783–1792. doi: 10.1099/mic.0.2007/016139-0
69. Pronio A, Montesani C, Butteroni C, Vecchione S, Mumolo G, Vestri A, et al. Probiotic administration in patients with ileal pouch–anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 May;14(5):662-8. doi: 10.1002/ibd.20369.
70. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, et al. Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells. *J Exp Med.* 2004 Jun 7;199(11):1567-75. doi: 10.1084/jem.20032058
71. Wolowczuk I, Verwaerde C, Viltart O, Delanoye A, Delacre M, Pot B, et al. Feeding Our Immune System: Impact on Metabolism. *Clin Dev Immunol.* 2008;2008:639803. doi: 10.1155/2008/639803.
72. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, Lewis C, Asselin-Paturel C, Brière F, et al. Interferon γ and Interleukin 12 Responses to Viral Infections: Pathways Regulating Dendritic Cell Cytokine Expression In Vivo. *J Exp Med.* 2002 Feb 18;195(4):517-28. doi: 10.1084/jem.20011672
73. Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics Ameliorate Recurrent Th1-Mediated Murine Colitis by Inducing IL-10 and IL-10-Dependent TGF- β -Bearing Regulatory Cells. *J Immunol.* 2005 Mar 15;174(6):3237-46. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3237
74. Niers LEM, Timmerman HM, Rijkers GT, Van Bleek GM, Van Uden NOP, Knol EF, et al. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin Exp Allergy.* 2005 Nov;35(11):1481–9. doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02375.x
75. de Smedt T, van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol.* 1997 May;27(5):1229-35. doi: 10.1002/eji.1830270526

76. De Roock S, Van Elk M, Van Dijk MEA, Timmerman HM, Rijkers GT, Prakken BJ, et al. Lactic acid bacteria differ in their ability to induce functional regulatory T cells in humans. *Clin Exp Allergy*. 2010 Jan;40(1):103–10. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03344.x
77. Brown SA, Whiteley M. A novel exclusion mechanism for carbon resource partitioning in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol*. 2007 Sep;189(17):6407–14. doi: 10.1128/JB.00554-07
78. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol*. 2008 Nov;20(11):1361–8. doi: 10.1093/intimm/dxn106.
79. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121–33. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035
80. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:160–71. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00703.x.
81. Albuquerque-Souza E, Balzarini D, Sayuri Ando-Suguimoto E, Hitomi Ishikawa K, Regina M, Simionato L, et al. Probiotics alter the immune response of gingival epithelial cells challenged by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2019 Apr;54(2):115–127. doi: 10.1111/jre.12608.
82. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: Relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol*. 2007 Dec;150(3):531–8. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03522.x
83. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, et al. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. *Cell Host Microbe*. 2011 Nov 17;10(5):497–506. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.006.
84. Storrer CLM, Deliberador TM, Giovanini AF, Crivellaro V, Zielak JC, Romito GA. Effect of alendronate on the progression of periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: a study in rats. *Clin Oral Investig*. 2016 Dec;20(9):2565–2573. doi: 10.1007/s00784-016-1769-4

85. Blasco-Baque V, Garidou L, Pomié C, Escoula Q, Loubieres P, Le Gall-David S, et al. Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut*. 2017 May;66(5):872-885. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309897.
88. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med*. 2015 Mar;21(3):172-83. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.004
87. Daep CA, Novak EA, Lamont RJ, Demuth DR. Structural Dissection and In Vivo Effectiveness of a Peptide Inhibitor of *Porphyromonas gingivalis* Adherence to *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun*. 2011 Jan;79(1):67-74. doi: 10.1128/IAI.00361-10.
88. Bélanger M, Reyes L, von Deneen K, Reinhard MK, Progulske-Fox A, Brown MB. Colonization of maternal and fetal tissues by *Porphyromonas gingivalis* is strain-dependent in a rodent animal model. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Jul;199(1):86.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2007.11.067.
89. Rivera MF, Lee JY, Aneja M, Goswami V, Liu L, Velsko IM, et al. Polymicrobial Infection with Major Periodontal Pathogens Induced Periodontal Disease and Aortic Atherosclerosis in Hyperlipidemic ApoE null Mice. *PLoS One*. 2013;8(2):e57178. doi: 10.1371/journal.pone.0057178.
90. Oliveira LFF, Salvador SL, Silva PHF, Furlaneto FAC, Figueiredo L, Casarin R, et al. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol*. 2017 Feb;88(2):197-208. doi: 10.1902/jop.2016.160217.
91. Lee C-T, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Starr JR, et al. Resolvin E1 Reverses Experimental Periodontitis and Dysbiosis. *J Immunol*. 2016 Oct 1;197(7):2796-806. doi: 10.4049/jimmunol.1600859
92. Graves DT, Fine D, Teng YTA, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008 Feb;35(2):89-105. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01172.x.
93. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt a M. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontal Res*. 1998 Oct;33(7):387-99. doi: 10.1111/j.1600-0765.1998.tb02335.x

94. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(8):1117-24. doi: 10.1172/JCI8942
95. Pakula R, Walczak W. On the Nature of Competence of Transformable Streptococci. *J Gen Microbiol*. 1963 Apr;31:125-33. doi: 10.1099/00221287-31-1-125
96. Kang J, de Brito Bezerra B, Pacios S, Andriankaja O, Li Y, Tsiagbe V, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Infection Enhances Apoptosis *In Vivo* through a Caspase-3-Dependent Mechanism in Experimental Periodontitis. *Infect Immun*. 2012 Jun;80(6):2247-56. doi: 10.1128/IAI.06371-11.
97. Mizraji G, Segev H, Wilensky A, Hovav AH. Isolation, processing and analysis of murine gingival cells. *J Vis Exp*. 2013 Jul 2;(77):e50388. doi: 10.3791/50388.
98. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
99. Bull M, Plummer S, Marchesi J, Mahenthiralingam E. The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: A tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. *FEMS Microbiol Lett*. 2013 Dec;349(2):77-87. doi: 10.1111/1574-6968.12293.
100. Pozharitskaia MM, Morozova LV, Mel'nichuk GM, Mel'nichuk SS. The use of the new bacterial biopreparation Acilact in the combined treatment of periodontitis. *Stomatologiya (Mosk)*. 1994 Apr-Jun;73(2):17-20.
101. Ciorba MA, Stenson WF. Probiotic Therapy in Radiation-Induced Intestinal Injury and Repair. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 May;1165:190-4. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04029.x.
102. Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microb Cell Fact*. 2014 Aug 29;13 Suppl 1:S7. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S7
103. Teanpaisan R, Piwat S, Dahlén G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 2011 Oct;53(4):452-9. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03132.x.

104. Asgharian H, Homayouni-Rad A, Mirghafourvand M, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S. Effect of probiotic yoghurt on plasma glucose in overweight and obese pregnant women: a randomized controlled clinical trial. *Eur J Nutr*. 2019 May 8. doi: 10.1007/s00394-019-01900-1.
105. Rezazadeh L, Gargari BP, Jafarabadi MA, Alipour B. Effects of probiotic yogurt on glycemic indexes and endothelial dysfunction markers in patients with metabolic syndrome. *Nutrition*. 2019 Jun;62:162-168. doi: 10.1016/j.nut.2018.12.011.
106. Koohestani M, Moradi M, Tajik H, Badali A. Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Vet Res Forum*. 2018 Sep 1;9(4):301–6. doi: 10.30466/vrf.2018.33086
107. Bafna H, Ajithkrishnan C, Kalantharakath T, Singh R, Kalyan P, Vathar J, et al. Effect of short-term consumption of amul probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 on salivary streptococcus mutans count in high caries risk individuals. *Int J Appl Basic Med Res*. 2018;8(2):111. doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR_447_16.
108. Zarrati M, Shidfar F, Nourijelyani K, Mofid V, Hossein zadeh-Attar MJ, Bidad K, et al. *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium* BB12, and *Lactobacillus casei* DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *BioFactors*. 2013 Nov;39(6):633–43. doi: 10.1002/biof.1128.
109. Bhat MI, Sowmya K, Kapila S, Kapila R. Potential Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC-5897) Inhibits *Escherichia coli* Impaired Intestinal Barrier Function by Modulating the Host Tight Junction Gene Response. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019 Nov 15. doi: 10.1007/s12602-019-09608-8
110. Poupet C, Saraoui T, Veisseire P, Bonnet M, Dausset C, Gachinat M, et al. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 as an effective treatment for preventing *Candida albicans* infection in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights. *PLoS One*. 2019 Nov 6;14(11):e0216184. doi: 10.1371/journal.pone.0216184.
111. Miao Z, Cheng R, Zhang Y, Liang H, Jiang F, Shen X, et al. Antibiotics can cause weight loss by impairing gut microbiota in mice and the potent benefits of lactobacilli. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019 Oct 29:1-10. doi: 10.1080/09168451.2019.1676696.

112. Wang T, Yan H, Lu Y, Li X, Wang X, Shan Y, et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus rhamnosus* LS-8 and *Lactobacillus crustorum* MN047 on high-fat and high-fructose diet mice base on inflammatory response alleviation and gut microbiota regulation. *Eur J Nutr*. 2019 Oct 28. doi: 10.1007/s00394-019-02117-y.
113. Kumova OK, Fike AJ, Thayer JL, Nguyen LT, Mell JC, Pascasio J, et al. Lung transcriptional unresponsiveness and loss of early influenza virus control in infected neonates is prevented by intranasal *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLOS Pathog* 2019 Oct 11;15(10):e1008072. doi: 10.1371/journal.ppat.1008072.
114. Friedrich AD, Campo VE, Cela EM, Morelli AE, Shufesky WJ, Tkacheva OA, et al. Oral administration of lipoteichoic acid from *Lactobacillus rhamnosus* GG overcomes UVB-induced immunosuppression and impairs skin tumor growth in mice. *Eur J Immunol*. 2019 Nov;49(11):2095-2102. doi: 10.1002/eji.201848024.
115. Surendran Nair M, Amalaradjou MA, Venkitanarayanan K. Antivirulence Properties of Probiotics in Combating Microbial Pathogenesis. *Adv Appl Microbiol*. 2017;98:1–29. doi: 10.1016/bs.aambs.2016.12.001.
116. Crovesy L, Ostrowski M, Ferreira DMTP, Rosado EL, Soares-Mota M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: A systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Obes (Lond)*. 2017 Nov;41(11):1607-1614. doi: 10.1038/ijo.2017.161.
117. Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb Pathog*. 2012 Aug;53(2):100–8. doi: 10.1016/j.micpath.2012.05.007
118. Okesene-Gafa KAM, Li M, McKinlay CJD, Taylor RS, Rush EC, Wall CR, et al. Effect of antenatal dietary interventions in maternal obesity on pregnancy weight-gain and birthweight: Healthy Mums and Babies (HUMBA) randomized trial. *Am J Obstet Gynecol*. 2019 Aug;221(2):152.e1-152.e13. doi: 10.1016/j.ajog.2019.03.003.
119. Drissi F, Merhej V, Angelakis E, Kaoutari A El, Carrière F, Henrissat B, et al. Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutr Diabetes*. 2014 Feb 24;4:e109. doi: 10.1038/nutd.2014.6
120. Klaenhammer TR, Altermann E, Pfeiler E, Buck BL, Goh Y-J, O'Flaherty S, et al. Functional Genomics of Probiotic *Lactobacilli*. *J Clin Gastroenterol*. 2008 Sep;42 Suppl 3 Pt 2:S160-2. doi: 10.1097/MCG.0b013e31817da140.

121. Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, et al. Oral Administration of *P. gingivalis* Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver. PLoS One. 2015 Jul 28;10(7):e0134234. doi: 10.1371/journal.pone.0134234
122. Fontaine DA, Davis DB. Attention to background strain is essential for metabolic research: C57BL/6 and the international knockout mouse consortium. Diabetes. 2016 Jan 1;65(1):25–33. doi: 10.2337/db15-0982.
123. Maekawa S, Katagiri S, Takeuchi Y, Komazaki R, Ohtsu A, Udagawa S, et al. Bone metabolic microarray analysis of ligature-induced periodontitis in streptozotocin-induced diabetic mice. J Periodontal Res. 2017 Apr;52(2):233-245. doi: 10.1111/jre.12387.
124. Oliveira LFF, Salvador SL, Silva PHF, Furlaneto FAC, Figueiredo L, Casarin R, et al. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis Probiotic in Experimental Periodontitis . J Periodontol. 2017 Feb;88(2):197–208. doi: 10.1902/jop.2016.160217
125. Bron PA, Van Baarlen P, Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. Nat Rev Microbiol 10, 66–78 (2012) doi:10.1038/nrmicro2690
126. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased Expression of Toll-Like Receptor-4 and MD-2 Correlates with Intestinal Epithelial Cell Protection Against Dysregulated Proinflammatory Gene Expression in Response to Bacterial Lipopolysaccharide. J Immunol. 2001 Aug 1;167(3):1609–16. DOI: 10.4049/jimmunol.167.3.1609
127. Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 2008 Oct;23(5):425-31. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00448.x.
128. Kantrong N, To TT, Darveau RP. Gingival Epithelial Cell Recognition of Lipopolysaccharide. Adv Exp Med Biol. 2019;1197:55-67. doi: 10.1007/978-3-030-28524-1_5.
129. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. Cell. 2004 Jul 23;118(2):229-41. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.002

130. Villena J, Kitazawa H. Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: Lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Front Immunol*. 2014 Jan 14;4:512. doi: 10.3389/fimmu.2013.00512.
131. Shang L, Deng D, Buskermolen JK, Roffel S, Janus MM, Krom BP, et al. Commensal and Pathogenic Biofilms Alter Toll-Like Receptor Signaling in Reconstructed Human Gingiva. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Aug 7;9:282. doi: 10.3389/fcimb.2019.00282.
132. Inomata M, Horie T, Into T. Effect of the Antimicrobial Peptide LL-37 on Gene Expression of Chemokines and 29 Toll-like Receptor-Associated Proteins in Human Gingival Fibroblasts Under Stimulation with *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019 Nov 4. doi: 10.1007/s12602-019-09600-2.
133. Qi W, Yang X, Ye N, Li S, Han Q, Huang J, et al. TLR4 gene in the regulation of periodontitis and its molecular mechanism. *Exp Ther Med*. 2019 Sep;18(3):1961-1966. doi: 10.3892/etm.2019.7809.
134. Huang L, Zhao Z, Duan C, Wang C, Zhao Y, Yang G, et al. *Lactobacillus plantarum* C88 protects against aflatoxin B1-induced liver injury in mice via inhibition of NF- κ B-mediated inflammatory responses and excessive apoptosis. *BMC Microbiol* 2019 Dec 29;19(1):170. doi: 10.1186/s12866-019-1525-4.
135. Wang Q, Sun Q, Qi R, Wang J, Qiu X, Liu Z, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* on the intestinal morphology, intestinal barrier function and microbiota composition of suckling piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2019 Nov;103(6):1908-1918. doi: 10.1111/jpn.13198.
136. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 2012 Feb 1;122(4):143–59. doi: 10.1042/CS20110340.
137. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Oct 1;6(10). doi: 10.1101/cshperspect.a016295.
138. 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 Apr 3;7(1):545. doi: 10.1038/s41598-017-00623-9.

139. van Baarlen P, Troost F, van der Meer C, Hooiveld G, Boekschoten M, Brummer RJM, et al. Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4562-9. doi: 10.1073/pnas.1000079107.
140. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr*. 2000 Feb;83(2):167-76. doi: 10.1017/s0007114500000210
141. Paturi G, Phillips M, Kailasapathy K. Effect of Probiotic Strains *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 on Systemic Immune Functions and Bacterial Translocation in Mice. *J Food Prot* 2008 Apr;71(4):796–801. doi: 10.4315/0362-028x-71.4.796
142. Egholm C, Heeb LEM, Impellizzieri D, Boyman O. The Regulatory Effects of Interleukin-4 Receptor Signaling on Neutrophils in Type 2 Immune Responses. *Front Immunol* 2019 Oct 24;10. doi: 10.3389/fimmu.2019.02507.
143. Kang YE, Kim HJ, Shong M. Regulation of Systemic Glucose Homeostasis by T Helper Type 2 Cytokines. *Diabetes Metab J*. 2019 Oct;43(5):549-559. doi: 10.4093/dmj.2019.0157.
144. Wynn TA. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol* 2015 May 17;15(5):271–82. doi: 10.1038/nri3831.
145. Fiorentino DF. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989 Dec 1;170(6):2081–95. doi: 10.1084/jem.170.6.2081
146. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001 Apr;19(1):683–765. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683
147. Neumann C, Scheffold A, Rutz S. Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10. *Semin Immunol*. 2019 Nov;101344. doi: 10.1016/j.smim.2019.101344.
148. Bedke T, Muscate F, Soukou S, Gagliani N, Huber S. Title: IL-10-producing T cells and their dual functions. *Semin Immunol*. 2019 Nov;101335. doi: 10.1016/j.smim.2019.101335

149. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. *J Biol Chem* 2007 Mar 30;282(13):9358–63. doi: 10.1074/jbc.C600321200
150. Müller M, Kersten S. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet.* 2003 Apr;4(4):315–22. doi: 10.1038/nrg1047
151. Marco ML, Peters THF, Bongers RS, Molenaar D, van Hemert S, Sonnenburg JL, et al. Lifestyle of *Lactobacillus plantarum* in the mouse caecum. *Environ Microbiol* 2009 Oct;11(10):2747–57. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02001.x.
152. Corcoran B, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R. Life Under Stress: The Probiotic Stress Response and How it may be Manipulated. *Curr Pharm Des* 2008 May 1;14(14):1382–99. doi: 10.2174/138161208784480225
153. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008 Mar;22(3):659-61. doi: 10.1096/fj.07-957

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Pirajussu" - Vila Arns, São Paulo - SP - Av. Prof. Dr. Lineu Costa, 2413 - 05508-900
CEUA-ICB/USP - Telefone: (11) 5081-6755 - e-mail: cap@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Efeito dos probióticos sobre a modulação da resposta imune e nível de perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongos saudáveis e diabéticos*", registrado sob o protocolo nº **111/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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 e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **09/10/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de 4 anos(a) a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Márcia Pinto Alves Mayer**

- Departamento: *Microbiologia*

- Membros da Equipe: *Natali Shimabukuro (Pós-Graduanda), Amalia Cristina de Souza Cataruci (Pós-Graduanda), Karim Hitomi Ishikawa (Pós-Doutoranda), Emmanuel Albuquerque (Pós-Graduando), Danilo Balzarini (Iniciação Científica), Diana Kawamoto (Pós-Doutoranda), Ellen Sayumi Ando Sugimoto (Pesquisador Colaborador), Ellen Evangelista Ignácio (Iniciação Científica)*

Até o fim do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar à esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, relatório final de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), com o modelo constante no endereço eletrônico www2.icb.usp.br/ceb/ceug. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Effect of probiotics on the modulation of immune response, and alveolar bone loss promoted by periodontitis in diabetic and normal experimental mice*", protocol nº **111/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific Research Purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/9/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 years(a) from the date of approval.

Principal Investigator: **Dr.(a.) Márcia Pinto Alves Mayer**

- Team members: *Natali Shimabukuro (Graduate Student), Amalia Cristina de Souza Cataruci (Graduate Student), Karim Hitomi Ishikawa (Postdoctoral Researcher), Emmanuel Albuquerque (Graduate Student), Danilo Balzarini (Undergraduate Student), Diana Kawamoto (Postdoctoral Researcher), Ellen Sayumi Ando Sugimoto (Collaborator Researcher), Ellen Evangelista Ignácio (Undergraduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Macho/female	5-6 semanas/weeks	302

São Paulo, 18 de outubro de 2017.

Luciane Valéria Sita
Prof. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora CEUA-ICB/USP

ANEXO B – Parecer Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



Fundada em 1900

"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Tel. (11) 3091 7842

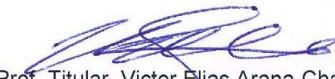
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada : “Efeito Probióticos do gênero Lactobacillus sobre a modulação do inflamasoma e da perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongos saudáveis” registrada com o nº **20/2019**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer, e dos pesquisadores Amália Cristina de Souza Cataruci, Natali Shimabukuro, Karin Kitomi Ishikawa, Manuela Rocha Bueno, Danilo Balzarini, Marina Paraluppi e Carlos Yudi Ramos Okoshi, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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 (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 10/06/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2018 a 31/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	48
Peso/Idade	4 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério da FM/USP

São Paulo, 11 de junho de 2019.


Prof. Titular. Victor Elias Arana-Chavez
Vice-Coordenador do CEUA-FOUSP