

NATALI SHIMABUKURO

Efeito de probióticos do gênero *Bifidobacterium* sobre a modulação da resposta imune e nível de perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongos

São Paulo

2019

NATALI SHIMABUKURO

Efeito de probióticos do gênero *Bifidobacterium* sobre a modulação da resposta imune e nível de perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongo

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Periodontia

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

São Paulo

2019

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

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

Shimabukuro, Natali.

Efeito de probióticos do gênero *Bifidobacterium* sobre a modulação da resposta imune e nível de perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongo / Natali Shimabukuro; orientadora Marcia Pinto Alves Mayer -- São Paulo, 2019.

109 p. : fig. ; 30 cm.

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

Versão corrigida

1. Periodontite. 2. Probióticos. 3. *P. gingivalis*. 4. Perda óssea. 5. Imunomodulação. I. Mayer, Marcia Pinto Alves. II. Título.

Shimabukuro N. Efeito de probióticos do gênero *Bifidobacterium* sobre a modulação da resposta imune e nível de 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.

Aprovado em: 29 /11/ 2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Marinella Holzhausen Caldeira

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Adriana Bona Matos

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana

Instituição: Universidade Nove de Julho

Julgamento: Aprovada

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora Prof^a Dr^a Marcia Pinto Alves Mayer pela oportunidade e pelo grande aprendizado. Por me ensinar a fazer pesquisa de qualidade, com comprometimento, sabedoria e responsabilidade e mais que isso por ser uma grande amiga, me apoiar, ensinar em todas as instâncias da vida. Minha total admiração pela profissional, professora e mulher que tu és.

Aos meus pais Agnaldo e Maria de Fátima Shimabukuro por sempre me apoiarem e fazerem meus sonhos se tornarem realidade, sem vocês nunca teria conseguido chegar até aqui, vocês são à base de tudo. Meus maiores e melhores exemplos, me espelho a cada dia a ser como vocês.

À minha irmã Luana Shimabukuro por toda a ajuda a construir e concluir este trabalho. Por me apoiar em todos momentos da minha vida. Obrigada estar sempre comigo.

Ao meu namorado Eduardo Fonseca que foi fundamental nos momentos finais me dando apoio, carinho, segurando todas a barra sozinho, mas principalmente por ter ficado ao lado do início ao fim sem hesitar. Meu exemplo de companheirismo e amor.

À grande amiga que fiz através deste projeto Karin Ishikawa, que além de ter me ensinado todos os procedimentos laboratoriais com muita paciência e sabedoria, se tornou mais que uma amiga me acolheu, apoiou, e esteve ao lado sempre que precisei. Aprendi com você a fazer pesquisa e que a vida tem muito a nos proporcionar basta sabermos aproveitar. Meu grande exemplo de pesquisadora, professora e ser humano.

Às minhas amigas de laboratório Manuela Bueno, Ámalia Caturuci, Dione Kawamoto, Ellen Ando-Sugimoto por todo aprendizado, apoio e pela amizade que construímos em função da pesquisa. Continuo sempre aprendendo com vocês e as admiro muito. Grandes mulheres, profissionais e pesquisadoras.

À aluna de iniciação científica Marina Paraluppi que contribuiu de uma forma esplendida por esta pesquisa.

À minha técnica Bruna Eduarda de Oliveira que além de me ajudar a realizar inúmeras etapas para que esta dissertação fosse concluída, foi uma peça chave neste trabalho, se tornou uma grande amiga.

Aos professores da pós graduação em Periodontia, em especial ao Professor Dr. Cláudio Mendes Pannuti, por toda contribuição com esta pesquisa e por todos ensinamentos que me deram.

À Profª Draª Maria Regina Simionato por todo ensinamento, apoio e contribuição com esta pesquisa.

À equipe do laboratório do Professor Dr. Niels Olsen Saraiva, em especial ao aluno Jean de Lima, pelo aprendizado e contribuição com análises celulares.

À equipe do laboratório do Professor Dr. Carlos Taborda, em especial ao Professor Dr. Leandro Buffoni Roque da Silva pelo aprendizado e contribuição com experimentos e análises em camundongos.

Ao funcionário do biotério ICB-USP Marco André Alves pela atenção e ajuda fornecida nos cuidados com os camundongos.

Aos funcionários Glauci Elaine Damasio e Marcos Alipio Dramos, pelas correções realizadas.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esta dissertação. fosse realizada e concluída.

À FAPESP pelo auxílio à pesquisa e pela bolsa de Mestrado (Processo nº 2015/18273-9 e 2017/22345-0).

À CAPES pela bolsa de Mestrado concedida de julho/2017 à janeiro/2018.

*“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda
como se fosse viver para sempre.”*

Mahatma Ganhdi

RESUMO

Shimabukuro N. Dissertação Efeito de probióticos do gênero *Bifidobacterium* sobre a modulação da resposta imune e nível de perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongos. Dissertação. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão **Corrigida**.

A doença periodontal é uma doença inflamatória em resposta a microbiota disbiótica, que leva a destruição dos tecidos de suporte do dente. Estudos prévios *in vitro* mostraram o potencial de probióticos do gênero *Bifidobacterium* em afetar a colonização oral por *P. gingivalis* e modular a resposta ao patógeno periodontal. O presente estudo visou determinar a capacidade de duas cepas probióticas do gênero *Bifidobacterium* de controlar a destruição dos tecidos periodontais e modular a resposta imune em ensaio *in vivo*. As cepas *B. breve* 1101A e *B. bifidum* 1622A foram testadas em modelo animal de periodontite experimental induzida pela infecção oral por um consórcio microbiano (*Porphyromonas gingivalis* W83, capsulada/afimbriada e ATCC 33277, não capsulada/fimbriada, *Prevotella intermedia* 17, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 e *Streptococcus gordonii* DL1) em camundongos C57BL/6. Para a indução de periodontite (P+), os animais foram inoculados via oral, com 1×10^{11} UFC de cada espécie bacteriana por 25 vezes durante 5 semanas. Os probióticos (B+1101 ou B+1622) (1×10^9 UFC /animal) foram ministrados via oral, diariamente durante todo o período experimental. Grupos controle (P- e B-) foram avaliados. Após 45 dias, foram realizadas a eutanásia e a coleta das amostras. Foram analisados perda óssea alveolar por microCT, níveis de *P. gingivalis* por qPCR, expressão de genes associados a inflamação por RT-qPCR, perfil de citocinas séricas por ELISA, e fenótipo de células T por citometria de fluxo. Não houve diferenças no ganho de peso ao longo do experimento entre os grupos (ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05$), com exceção do grupo P+B+ (1101), que apresentou menor ganho de peso que o SHAM. Os probióticos não foram capazes de induzir perda óssea alveolar, pois o volume ósseo dos grupos P-B+(1101) e P-B+ (1622) foi semelhante ao controle (SHAM). O protocolo empregado permitiu a indução de periodontite experimental, evidenciada pela perda óssea alveolar no grupo P+B-. O grupo P+B+(1101) apresentou volume

ósseo alveolar semelhante a P+B-, enquanto P+B+ (1622) apresentou volume ósseo semelhante ao controle (SHAM). Por outro lado, *P. gingivalis* não foi detectada em amostras de biofilme oral, fezes e baço em nenhum dos grupos avaliados. No entanto, *P. gingivalis* foi detectada no grupo P+B+(1101) no fígado, sugerindo que *B. breve* 1101A favoreceu a colonização por *P. gingivalis*. A inoculação do consórcio microbiano (grupo P+B-) ou de *B. bifidum* 1622A [P-B+ (1622) e P+B+(1622)] não foi capaz de induzir a expressão de *il-1 β* e *tnf- α* no tecido gengival. Porém, a transcrição de *il-1 β* e *tnf- α* foi regulada positivamente no tecido gengival dos grupos que receberam a cepa *B. breve* 1101A, embora esta regulação tenha sido atenuada pelo consórcio microbiano [grupo P+B+(1101)]. O consórcio microbiano (grupo P+B-) não foi capaz de regular positivamente a expressão *tlr2*, *tlr4*, *nlrp3*. Porém foi observada regulação positiva da transcrição destes genes no grupo P-B+ (1101), atenuada pelo consórcio microbiano [grupo P+B+ (1101)]. Foi também demonstrada regulação positiva da transcrição de *tlr4* em amostras do grupo P+B+ (1622). A análise do fenótipo de células T no tecido gengival revelou que o consórcio microbiano (grupo P+B-) não alterou a proporção de Treg ou de Th17 em relação ao SHAM. Por outro lado, foi observado aumento na porcentagem de células Th17 nos grupos P-B+ (1101) e P+B+ (1101), em relação ao SHAM e ao grupo P+B-. Não houve diferença na porcentagem dos fenótipos Treg e TH17 em amostras do baço dos grupos P+B- e SHAM. Porém, amostras de baço dos grupos probióticos [P-B+ (1101), P+B+ (1101), P-B+ (1622) e P+B+ (1622)] apresentaram redução na população Treg e aumento na de Th17 em relação ao grupo P+B- e/ou SHAM. Não houve diferenças na porcentagem de Treg e Th17 nos linfonodos entre os grupos estudados. O consórcio microbiano não induziu alteração nos níveis séricos de IL-10 e TNF- α [P+B- ~ SHAM]. Porém os níveis de séricos de IL-10 foram menores nos grupos P+B+ (1101), P-B+ (1622) e P+B+ (1622) do que no SHAM. Os dados sugerem que ambos probióticos testados alteram a resposta imune em camundongos C57B/6 induzida por patógenos periodontais de origem humana ou pela microbiota residente. No entanto, a regulação da resposta é distinta entre as cepas, e *B. bifidum* 1622A, mas não *B. breve* 1101A, apresenta potencial de atenuar a perda óssea alveolar induzida por patógenos periodontais.

Palavras chaves: Periodontite experimental, *P. gingivalis*, *Bifidobacterium*, probióticos, imunomodulação, perda óssea alveolar.

ABSTRACT

Shimabukuro N. Dissertação. Effect of probiotics of the genus *Bifidobacterium* on the modulation of immune response and levels of alveolar bone loss promoted by experimental periodontitis in mice. Dissertação São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

Periodontal disease is an inflammatory disease in response to the dysbiotic microbiota, which leads to the destruction of tooth support tissues. Previous *in vitro* studies have shown the potential of *Bifidobacterium* probiotics to affect *P. gingivalis* oral colonization and to modulate the response to periodontal pathogen. The present study aimed to determine the ability of two probiotic strains of the genus *Bifidobacterium* to control the destruction of periodontal tissues and to modulate the immune response in an *in vivo* assay. *B. breve* 1101A and *B. bifidum* 1622A were tested in an animal model of experimental periodontitis induced by oral infection with a microbial consortium (*Porphyromonas gingivalis* W83, capsulated / afimbriated and ATCC 33277, uncapsulated / fimbriated, *Prevotella intermedia* 17, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 and *Streptococcus gordonii* DL1) in C57 / BL6 mice. For induction of periodontitis (P +), the animals were inoculated orally with 1×10^{11} UFC of each bacterial strain 25 times for 5 weeks. Probiotics (B + 1101 or B + 1622) (1×10^9 UFC) were administered orally daily throughout the experimental period. Control groups (P- and B-) were evaluated. After 45 days, euthanasia and samples collection were performed. Alveolar bone loss was determined by microCT, *P. gingivalis* levels by qPCR, expression of genes associated with RT-qPCR inflammation, serum cytokine profile by ELISA, and T-cell phenotype by flow cytometry. There were no differences in weight gain throughout the experiment among groups (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison, $p < 0.05$), except for the group P+B+1101. The groups that received only the probiotics [groups P-B + (1101) and P-B + (1622)] presented alveolar bone volume similar to the control (SHAM). The protocol employed allowed the induction of experimental periodontitis, evidenced by alveolar bone loss in the P + B- group. The group P+B+ (1101) presented alveolar bone volume similar to P + B-, whereas P+B+ (1622) presented bone volume similar to the control (SHAM). On the other hand, *P. gingivalis* was not detected in any oral

biofilm, feces and spleen samples of the studied groups. However, *P. gingivalis* was detected in liver samples of the P + B + group (1101), suggesting that *B. breve* 1101A favored the colonization of *P. gingivalis*. Inoculation of the microbial consortium (P + B-) and/or *B. bifidum* 1622A [P-B + (1622) and P + B + (1622)] was not able to induce the expression of *il-1 β* and *tnf- α* in gingival tissue. However, the transcription of *il-1 β* and *tnf- α* was up-regulated in the gingival tissue of the groups that received *B. breve* 1101A, which was attenuated by the microbial consortium [group P + B + (1101)]. The microbial consortium (group P + B-) was not able to positively regulate the expression of *tlr2*, *tlr4*, and *nlrp3*. However, the positive regulation of transcription of these genes was observed in the P-B + (1101) group, which was attenuated by the microbial consortium [group P + B + (1101)]. Up-regulation of *tlr4* was also demonstrated in samples from the group P + B + (1622). Analysis of the T cell phenotype in gingival tissue samples revealed that the microbial consortium (group P + B-) did not alter the proportion of Treg or Th17 in relation to SHAM. On the other hand, there was an increase in the percentage of Th17 in P-B + (1101) and P + B + (1101) groups, compared to SHAM and P + B- groups. There was no difference in the percentage of Treg and TH17 phenotypes in spleen samples from the P + B- and SHAM groups. However, samples from the probiotic groups [P-B + (1101), P + B + (1101), P-B + (1622) and P + B + (1622)] showed a reduction in the Treg population and an increase in Th17 compared to the P + B- group and/or SHAM. There were no differences in the Treg and Th17 lymph nodes populations among the studied groups. The microbial consortium did not induce alterations in serum levels of IL-10 and TNF- α [P+B- similar to SHAM]. However, IL-10 serum levels were lower in P+B+ (1101), P-B + (1622) and P+B+ (1622) groups than in SHAM. The data suggested that both tested probiotics alter the immune response in C57B / 6 mice induced by human periodontal pathogens or the resident microbiota. However, the regulation in response is distinct between the strains, and *B. bifidum* 1622A, but not *B. breve* 1101A, has the potential to attenuate the alveolar bone loss induced by periodontopathogens.

Keywords: Periodontitis, *P. gingivalis*, probiotics, immunomodulation, bone loss.

LISTA DE SIGLAS

AIM2	Proteína induzida por interferon 2
B-	Veículo dos probióticos carboximetilceluose a 2% em PBS
B+ (1101)	Grupo inoculado com probiótico <i>B. breve</i> 1101A
B+(1622)	Grupo inoculado com probiótico <i>B. bifidum</i> 1622A
β -actina	Isoforma da actina
BHI	Meio de cultura Infusão de cérebro e coração
BSM	Meio de cultura para Bifidobactérias
C5	Componente C5 do sistema complemento
C5a	Fragmento liberado após clivagem do componente C5
C5Ar	Receptor de componente do complemento 5 ^a
CD14	Grupo (cluster) de diferenciação 14

CO ₂	Gás Carbônico
CpG	Citosinas não metiladas
CT	Limiar do ciclo
CTX	Telopectídeo carboxiterminal do colágeno
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC tipo 4
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FBS	Solução tampão aquosa contendo soro fetal bovino

FimA	Subunidade da Fímbria principal de <i>P. gingivalis</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H ₂	Gás hidrogênio
IL-	Interleucina
INF-γ	Interferon gama
InpA	Interpaína A
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LPS	Lipopolisacarídeo
MAMPS	Padrões moleculares de microrganismos
MAPK	Proteína quinase p38 mitogêno-ativada
MD2	Proteína celular MD2

Mfa1	Subunidade da fímbria secundária de <i>P. gingivalis</i>
MicroCT	Microtomografia computadorizada
MRS	Meio de cultura De Man
N ₂	Gás nitrogênio
NF-KB	Fator de transcrição NF-Kb
NHANES	Exame Nacional de Saúde e Nutrição
NLR	Receptor NOD- like
NO	Óxido nítrico
NOD	Receptor NOD-like
OBA-09	Linha celular epitelial
OMS	Organização Mundial da Saúde

P-	Veículo do consórcio microbiano (Carboximetilcelulose a 2% em PBS)
P+	Consórcio microbiano para indução de periodontite
P+B-	Grupos inoculado com consórcio microbiano e veículo de probióticos
P+B+1101	Grupo inoculado com consórcio microbiano e probiótico <i>B. breve</i> 1101A
P+B+1622	Grupo inoculado com consórcio microbiano e probiótico <i>B. bifidum</i> 1622 ^a
PABA	Ácido 4-para aminobenzóico
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
P-B-	Grupo inoculado com veículo do consórcio microbiano e veículo de probióticos

P-B+1101	Grupo inoculado com veículo do consórcio microbiano e probiótico <i>B. breve</i> 1101 ^a
P-B+1622	Grupo inoculado com veículo do consórcio microbiano e probiótico <i>B. bifidum</i> 1622A
PBS	Solução Salina Tamponada
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RNA	Ácido ribonucleico
SapA/B	Peptídeo microbiano SapA/B
SerB	Serino fosfatase
SPF	Livre de patógenos específicos

Tc	Células T citotóxicas
TGF- β 1	Fator de transformação de crescimento beta
Th	Células T auxiliares
Th1	Célula T auxiliar 1
Th17	Célula T auxiliar 17
THP-1	Linhagem celular monocítica
TLR	Receptor Toll Like
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T reguladora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	PROPOSIÇÃO	39
2.1	Objetivos específicos	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Delineamento experimental	41
3.2	Considerações éticas	43
3.3	Cepas Utilizadas e condições de cultura	43
3.3.1	Amostras	43
3.3.2	Condições de cultura	44
3.4	Obtenção das culturas para liofilização	44
3.5	Liofilização	45
3.6	Recuperação das amostras liofilizadas e determinação de UFC	46
3.7	Animais e condições de manutenção	46
3.8	Antibioticoterapia	47
3.9	Inoculações do consórcio e dos probióticos	47
3.9.1	Inóculo para indução de periodontite experimental	47
3.9.2	Inoculação do consórcio microbiano para indução de periodontite experimental	48
3.9.3	Inóculo das amostras de Probióticos	48
3.9.4	Inoculações das amostras de Probióticos	48
3.10	Obtenção das amostras	49
3.11	Microtomografia computadorizada (MicroCT)	50
3.12	Determinação dos níveis de <i>P. gingivalis</i> em amostras de biofilme oral, fezes do conteúdo intestinal, fígado e baço	50
3.13	Estudo da expressão gênica (RT-PCR)	52
3.14	Estudo das subpopulações de células T	53
3.15	Determinação dos níveis de citocinas	54
3.16	Análise estatística	55
4	RESULTADOS	57
4.1	Liofilização de probióticos e patógenos	57

4.2	Efeitos colaterais e ganho de peso induzido pelos diferentes tratamentos	57
4.3	Perda óssea alveolar	59
4.4	Detecção de patógenos periodontais	62
4.5	Expressão gênica relativa no tecido gengival.....	64
4.6	Estudo das subpopulações de células T	66
4.7	Determinação dos níveis de citocinas	75
5	DISCUSSÃO.....	77
6	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

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). Estima-se que cerca de 25% da população adulta mundial seja afetada pela doença e entre 5-6% da população apresenta periodontite severa (2). Em 2010, a prevalência de adultos com periodontite nos EUA foi de mais de 47%, representando 64,7 milhões de adultos afetados, segundo dados do Exame Nacional de Saúde e Nutrição de 2009 e 2010 (NHANES) (3). Destes, cerca de 8,5% apresentavam periodontite severa e 30% apresentavam periodontite moderada. Outros estudos apontam maior prevalência de periodontite em pacientes acometidos de outras morbidades, como a diabetes (4). Até recentemente, a periodontite era classificada em periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (PA), e muitos estudos avaliam diferenças entre os dois fenótipos. No entanto, de acordo com a Academia Americana de Periodontia e a Federação Europeia de Periodontia, a doença periodontal foi classificada em 2018 com base em estágios definidos de acordo com a severidade da doença (relacionado ao nível de perda de inserção interdental, nível perda óssea radiográfica e quantidade de dentes perdidos), a complexidade (relacionado a profundidade de sondagem, perda óssea horizontal ou vertical, envolvimento de furca e mobilidade dentária) e a distribuição (> 30% dos sítios caracteriza a forma generalizada, < 30% dos sítios a forma localizada, que inclui o padrão molar/incisivo) (5).

A microbiota associada à periodontite foi classificada em complexos, onde organismos como *Streptococcus* (complexo amarelo), *Actinomyces* e *Veillonella parvula* (complexo roxo) iniciam a formação do biofilme dental, possibilitando a colonização por espécies de *Capnocytophaga*, *Eikenella* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a (complexo verde) e pelo denominado complexo laranja, composto por *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Prevotella*, *Parvimonas* e o grupo *Streptococcus constellatus*. Três dos complexos microbianos – amarelo, roxo e verde - são associados a espécies compatíveis com a saúde periodontal como *V. parvula*, *A. odontolyticus*, *Streptococcus* sp. E *Capnocytophaga* sp. (1). Além disso, outras espécies de *Actinomyces* foram apontadas como benéficas (6). No entanto,

estes propiciam as condições ambientais adequadas para colonização pelos organismos do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) (1), fortemente associado com a etiologia da doença (1,7).

Estudos longitudinais em humanos demonstraram que os níveis de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* se relacionam com a perda periodontal (8), e estudos intervencionais demonstraram relação entre a presença destes patógenos em sítios tratados e a progressão da doença (6).

O desequilíbrio da microbiota, denominado disbiose, foi associado com a etiologia de múltiplas doenças, entre elas a periodontite (9). Atualmente, considera-se que a periodontite é iniciada por uma comunidade microbiana disbiótica e não por periodontopatógenos selecionados, sendo que *P. gingivalis* é considerado patógeno pedra angular por ser capaz de promover o desequilíbrio da microbiota mesmo em baixas proporções (10). No entanto, a doença não é causada por *P. gingivalis per se*, mas pelas alterações que este organismo provoca na microbiota oral, através da sua capacidade de subverter a resposta imune e induzir a inflamação, o que resulta na aquisição de nutrientes para grande parte da microbiota e permite a sobrevivência de organismos que são sensíveis à inflamação (11). *P. gingivalis* apresenta múltiplos fatores de virulência (12). A cápsula de polissacarídeo é implicada na evasão das defesas do hospedeiro, sendo que cepas capsuladas induzem uma resposta de citocinas pró-inflamatórias fraca (13) e abscessos difusos em modelos animais, ao contrário das cepas não capsuladas (14). Por outro lado, a fímbria principal foi associada com a colonização da cavidade oral e outros sítios (15) e com a invasão dos tecidos periodontais (16). Proteases bacterianas, como a gingipaínas, produzidas por *P. gingivalis* e também a interpaína A, produzida por *P. intermedia*, podem agir de maneira sinérgica para inibir o sistema complemento, o que pode proteger espécies suscetíveis ao complemento (17). *P. intermedia* também é capaz de evadir da morte mediada pelo complemento por capturar o fator H, um fator fisiológico inibidor do complemento (18).

Para estudar a etiologia e o controle da doença periodontal são realizados estudos em animais onde a doença periodontal é experimentalmente induzida. O periodontopatógeno *P. gingivalis* não é capaz de causar a doença em animais livres de microrganismos, necessitando de uma comunidade microbiana que dá condições para sua colonização. Além disso, de acordo com os novos conceitos de disbiose envolvendo a etiologia e patogênese das doenças periodontais, a virulência de

patógenos periodontais como *P. gingivalis* adquire importância apenas no contexto de uma comunidade microbiana sinérgica, a qual é requerida para a expressão da patogenicidade (10).

A microbiota comensal participa da periodontite por promover as condições necessárias para a colonização dos principais patógenos periodontais reconhecidos, que são colonizadores tardios do biofilme dental (1). *Streptococcus gordonii* é um patógeno colonizador precoce da placa (19), cuja superfície representa sítios para agregação de outras espécies bacterianas ao biofilme oral como *P. gingivalis* (20). A formação de biofilme por *P. gingivalis in vitro* é favorecida pela presença de *S. gordonii* (21). A co-agregação entre *P. gingivalis* e *S. gordonii* ocorre por meio da interação entre as fímbrias FimA e Mfa1 do patógeno que interagem com as proteínas de superfície GAPDH e SspA/B de *S. gordonii* (10). No entanto, muitas cepas de *P. gingivalis* não apresentam a fímbria FimA (22), incluindo cepas de virulência reconhecida como a cepa W83 (23), e a cápsula é a estrutura que media a co-agregação de *P. gingivalis* nesta amostra (24). PABA, precursor da síntese de folato produzido por *S. gordonii*, é requerido para o máximo acúmulo de *P. gingivalis in vivo*, e leva à maior aderência do patógeno às células epiteliais gengivais (25). Além disso, *S. gordonii* favorece a aquisição de heme a partir da hemoglobina por *P. gingivalis*, fonte de ferro fundamental para o desenvolvimento do patógeno (26). Estes dados sugerem maior adaptação de *P. gingivalis* ao ambiente subgengival quando na presença de *S. gordonii*.

Estudos indicam que a infecção por um consórcio formado por *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* induziu maior destruição periodontal, particularmente quando uma cepa capsulada de *P. gingivalis* foi empregada (24). Outros dados indicam que a inoculação oral do consórcio *F. nucleatum* e *P. gingivalis* em ratos resultou em grande destruição do osso alveolar (27). A adição de *F. nucleatum* a *P. gingivalis* como inóculo para indução da periodontite em animais possivelmente favorece a maior formação de biofilme e sua maturação, devido à propriedade de *F. nucleatum* em agir como uma ponte entre os colonizadores iniciais e tardios (24,28–30).

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, produzida por *P. intermedia*, atua em fatores do complemento, por exemplo através da captura do fator H do complemento (18),

aumentando a proteção das espécies suscetíveis a este fator (17). A interpaína A (InpA) também age em conjunto com a proteína siderófora HmuY de *P. gingivalis* para adquirir o grupo heme da hemoglobina (31). Além disso, *P. gingivalis* (cepas fimbriada e não-fimbriada) formam maior quantidade de biofilme quando associadas a *P. intermedia*, embora a associação *P. gingivalis*/ e *P. intermedia* seja cepa dependente (32). Em estudo recente neste laboratório, a infecção oral experimental por *P. gingivalis* fimbriada, associada a um isolado clínico de *P. intermedia* com alta capacidade de agregação a *P. gingivalis in vitro* (32), induziu maior destruição periodontal em camundongos C57BL/6 do que quando uma das espécies foi inoculada separadamente (Simionato, et al., dados não publicados).

O modelo de gavagem oral para indução de periodontite em camundongos é mais apropriado para abordar hipóteses relacionadas a estratégias putativas de evasão imunológica, identificadas a partir de estudos mecanicistas de hospedeiro-patógeno (33). Além disso, é usado com sucesso para vincular periodontite induzida por microrganismos orais a condições sistêmicas (34,35). Portanto, o modelo de gavagem oral é útil para abordar ampla variedade de hipóteses relacionadas à patogênese periodontal, que vão desde o papel da resposta do hospedeiro a fatores de virulência de periodontopatógenos e a relação desses fatores com parâmetros sistêmicos (33). Hoje em dia este modelo tem sido usado em uma variedade de estudos para indução da periodontite experimental (36–38).

Apesar de seu caráter infeccioso, a doença periodontal não cumpre os requisitos de uma doença infecciosa clássica (39). Embora a doença periodontal não se estabeleça sem a presença dos agentes microbianos, e o controle mecânico da microbiota ou a antibioticoterapia sejam estratégias usadas para o controle da destruição periodontal, o fator microbiano é apenas um dos muitos aspectos causais da complexidade etiológica da doença periodontal (39). Polimorfismos em genes associados ao processo inflamatório se refletem na suscetibilidade individual à colonização por determinados organismos e ao desenvolvimento da periodontite (40–42). Além disso, fenômenos epigenéticos (43–46) e condições ambientais, em que os múltiplos parâmetros são interdependentes, também participam da etiologia da doença.

A resposta imune nas doenças periodontais é induzida por padrões moleculares de microrganismos (MAMPS) que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) de células eucariontes (47). Estes receptores,

extracelulares, como receptores Toll Like (TLRs), e citosólicos como NLR (nucleotide binding domain/leucine rich repeat ou receptores NOD-like), vasculham o ambiente extracelular ou o citoplasma por sinais de patógenos (48).

Os receptores Toll-like (TLRs) reconhecem uma gama de fragmentos microbianos, oriundos de patógenos ou de organismos comensais. TLR4 reconhece o LPS de bactérias Gram negativas, em conjunto com CD14 e MD2 (49). No entanto, alguns patógenos como *P. gingivalis* podem alterar 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 misturado com um agonista forte como o LPS de *Escherichia coli* (50). TLR2 se dimeriza com TLR1 ou TLR6 e reconhecendo o ácido lipoteicoico da parede celular de bactérias Gram positivas (49). A ativação de TLR2 pode exercer também papel de antagonista de TLR4 por interagir com o co-receptor CD14 (51). TLR5 reconhece a flagelina, enquanto TLR9 reconhece os motivos CpG não metilados encontrados no DNA bacteriano (49).

Embora organismos patogênicos e comensais sejam reconhecidos pelos PPRs, os patógenos induzem a produção de sinais endógenos de perigo (padrões moleculares associados ao dano ou DAMPS) (52). Os receptores citosólicos de PAMPS e DAMPS incluem NLRP1, NLRP3, NLRC4, e AIM2 (53). Tanto as vias ativadas por TLRs como por NLRs ativam NF- κ B, o que induz a expressão de citocinas pro-inflamatórias. 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 (54).

O reconhecimento de DAMPS e PAMPS pelos receptores citosólicos leva a formação de complexos citoplasmáticos multiproteicos denominados inflamassomas. Estes complexos ativam caspase-1, que resulta na maturação e liberação de IL-1 β e IL-18 e induzem a piroptose (52). As evidências sugerem que estes receptores intracelulares envolvidos em inflamassomas têm papel importante na inflamação do periodonto. A expressão de NLRP3 é maior nos tecidos gengivais com periodontite crônica (PC) e agressiva do que nos tecidos saudáveis, especialmente na camada epitelial. Além disso, o receptor AIM2 é expresso em maiores níveis nos tecidos periodontais de PC (55).

Apesar do seu reconhecimento, patógenos apresentam estratégias para evadir das defesas do hospedeiro. *P. gingivalis* secreta uma serina fosfatase (SerB) que suprime a produção de CXCL-8 por desfosforilação de serina-536 da

subunidade p65 de NF- κ B, prevenindo a translocação nuclear e transcrição do gene *CXCL8*. A inibição transitória de CXCL-8 pode atrasar o recrutamento de neutrófilos e permitir a formação inicial de biofilme na ausência relativa de defesas de neutrófilos (56). Em neutrófilos, cujo reconhecimento de *P. gingivalis* é mediado por TLR-2, este patógeno coativa C5aR e TLR2. Esta sinalização C5aR–TLR2 leva a ubiquitinação e degradação da proteína MYD88, uma molécula adaptadora de TLR2 e assim suprime os efeitos antimicrobianos da resposta neutrofilica, possibilitando a sobrevivência do patógeno. Os neutrófilos expostos a *P. gingivalis* apresentam reduzida capacidade de eliminação de agentes bacterianos, promovendo aumento da contagem total de microrganismos no tecido periodontal (57). *P. gingivalis* expressa também Arg-gingipainas que clivam C5 e liberam C5a biologicamente ativa, independentemente da ativação canônica da cascata do complemento. Esta atividade reduz a ativação da polimerização de actina e a fagocitose (58).

Poucos macrófagos são encontrados no tecido gengival sadio, mas são mais notáveis por sua resposta rápida no tecido inflamado e, como tal, desempenham um papel principal na resposta imune, e na resolução da inflamação nos tecidos bucais. Normalmente, uma bactéria é detectada pelo macrófago através de PAMPS, é fagocitada em um fagolisossoma ácido, e com a liberação de espécies oxigênio reativas, ocorre à morte da bactéria. Durante este processo, o inflamassoma pode se formar levando à indução e liberação de citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18. No entanto, *P. gingivalis* inibe a fagocitose por macrófagos, por sequestrar rafts lipídicas na membrana celular destas células (56). Além disso, as fímbrias de *P. gingivalis* causam a associação de CXCR4 e TLR2, o que reduz a formação de NO pelos macrófagos, limitando sua capacidade microbicida, e induz a expressão do receptor de complemento 3, permitindo a entrada da bactéria no citoplasma (58). Além de não induzir o inflamassoma, *P. gingivalis* é capaz de suprimir o inflamassoma induzido por outros organismos, inibindo ao processamento de IL-1 β (59).

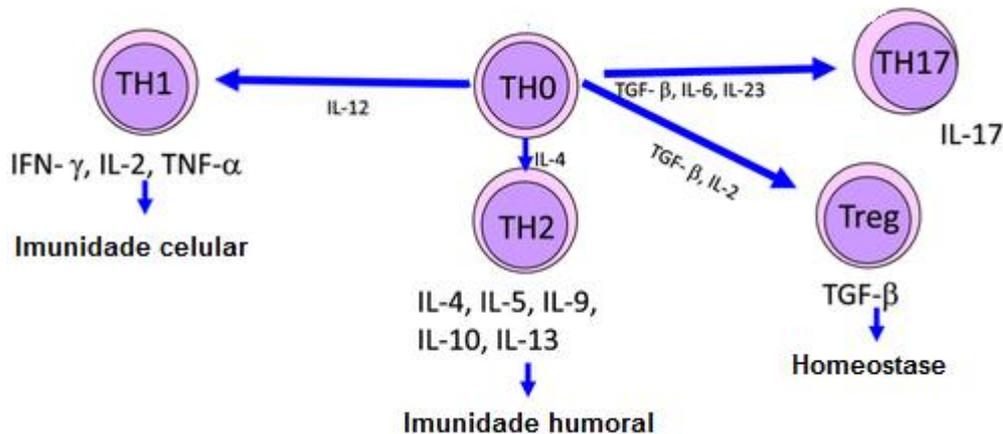
A resposta a patógenos é feita principalmente por macrófagos, neutrófilos, e linfócitos, mas também por fibroblastos e células epiteliais. Os linfócitos se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CD8+) ou linfócitos T auxiliares (Th, CD4+)(60). Os linfócitos T CD4+ ingênuos (T0) se diferenciam em subpopulações Th1, Th2, Treg e Th17, de acordo com as condições ambientais, como apresentado na figura 1 (61). Enquanto a proteção contra agentes infecciosos extracelulares

provêm de anticorpos solúveis produzidos pelas células B em colaboração com células Th2 CD4, a proteção contra agentes intracelulares provêm de produtos tóxicos secretados por macrófagos e neutrófilos, cuja ativação depende de citocinas como IFN- γ produzido por células Th1 (62). Os linfócitos T regulatórios (Treg) estão relacionados com o controle homeostático da resposta imunoinflamatória periodontal, suprimindo a proliferação e produção de citocinas das células T efetoras, principalmente células Th1 e Th17 (62). O processo de diferenciação de Treg ocorre através na presença de TGF β ativando o fator de transcrição FOXP3. As células Th17 sofrem processo de diferenciação na presença de TGF β , IL-1 β e IL-6 resultando na ativação do fator de transcrição ROR γ t, e o aumento de TNF- α e IL-1 β podem aumentar sinergicamente a diferenciação de células Th17. As células Th17 induzem a produção de IL-17, que por sua vez induz à secreção de CXCL-8, quimiocina associada com o recrutamento de neutrófilos, e também produzem IL-21, IL-22, INF- γ e TNF- α (63). Por outro lado, algumas bactérias comensais podem manter a tolerância da mucosa *in vivo* pela geração de Treg, mas, sob estímulo inflamatório, estas células podem se diferenciar no subtipo efector Th17, relevante para a defesa contra patógenos extracelulares (64).

As respostas à microbiota residente na periodontite envolvem a indução de células T regulatórias (Treg), essenciais para a manutenção da homeostase (9). A co-evolução do sistema imune com a microbiota residente em mucosas levou a uma relação principalmente cooperativa e microrganismos comensais podem induzir a produção e recrutamento de células Treg na mucosa e são associados com resistência a doenças inflamatórias (65). As células Treg suprimem a resposta adaptativa por mecanismos dependentes do contato célula-célula ou pela secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (49). As células T reg também são as principais envolvidas na produção de IgA T-dependente contra antígenos derivados da microbiota no intestino e também tem papel relevante na doença periodontal (66). Estudos em modelos animais mostraram que a inibição de Treg leva a aumento da inflamação periodontal e reabsorção óssea em camundongos infectados experimentalmente com *A. actinomycetemcomitans* (67).

Figura 1 - A polarização de linfócitos T auxiliares ingênuos (Th0) é dependente do ambiente (mediada por fatores indicados ao longo das setas) e cada subpopulação é caracterizada por um padrão de expressão gênica e apresenta funções específicas. As células Th1 produzem IFN- γ , IL-2 e TNF α , e são associadas a imunidade celular, por promoverem a ativação de macrófagos, citotoxicidade dependente de anticorpos e hipersensibilidade tardia. As

células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, e são associadas à resposta humoral, incluindo a imunidade das mucosas pela diferenciação e facilitação da síntese de IgA. As células T regulatórias (Treg) produzem IL-10, TGF β , baixos níveis de IFN γ , mas não IL-4. Estas regulam negativamente as células apresentadoras de antígeno e são associadas a homeostase. As células Th17 produzem IL-17, e sua expansão e sobrevivência é dependente de IL-23.



Fonte: modificado de Gonzales; 2015

Estudos recentes mostram que *P. gingivalis* W83 induz a estimulação de células dendríticas e monócitos que promovem a polarização de células Th17 (68). Além disso, foi demonstrado *in vitro* que o LPS de *P. gingivalis* induz a diferenciação de células Th17 (69). Foi demonstrado também que a periodontite experimental induzida por ligadura levou ao aumento de Th17 e IL-17 no tecido gengival (70). A indução da periodontite experimental com a inoculação oral de cepas de *P. gingivalis* também levou ao aumento da reabsorção óssea concomitante ao aumento de células Th17 nos linfonodos cervicais e no baço (71).

O biofilme subgengival e seus produtos secretados têm contato direto com o ambiente vascularizado do conjuntivo gengival (39). Assim, bactérias orais podem cair na corrente circulatória, e colonizar sítios à distância, induzindo resposta em locais além do tecido gengival. Por exemplo, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* foram detectadas não somente nos tecidos gengivais, mas em sítios distantes como placas de ateroma em modelos experimentais de infecção oral por patógenos (72), como em humanos (73).

Assim, consideramos que o modelo de periodontite experimental induzida por um consórcio bacteriano, como formado por *P. gingivalis* capsulada/não fimbriada e não capsulada/fimbriada, *S. gordonii* e *P. intermedia* e *F. nucleatum* é uma proposta

atraente para indução da doença periodontal experimental. A combinação de microrganismos em um consórcio microbiano para indução experimental da periodontite em animais visa otimizar a colonização da cavidade oral, induzir o processo inflamatório, selecionar as espécies inflamofílicas, levando à disbiose da microbiota oral e exercer efeito além da cavidade oral, pela capacidade de *P. gingivalis* colonizar sítios distantes (15,74) e alterar a permeabilidade da barreira intestinal (11), o que resultaria em maior inflamação sistêmica. Foi demonstrado em modelos experimentais que *P. gingivalis* altera a permeabilidade do epitélio do intestino, aumentando a translocação de produtos bacterianos como LPS, o que poderia contribuir com a maior resposta inflamatória (11). As bactérias inflamofílicas presentes na doença periodontal assim como os produtos inflamatórios decorrente desta infecção podem migrar para sítios à distância, como fígado, coração, placenta, intestino, podendo causar alteração na microbiota local e alterar o processo inflamatório levando a um quadro pró-inflamatório induzindo mudanças na resposta imune (11).

Probióticos foram sugeridos como forma prevenção à periodontite, ou como adjuvante ao tratamento periodontal (76). No entanto, os resultados não foram conclusivos devido a heterogeneidade de resposta às cepas probióticas, diferenças na dose e na frequência de uso tanto em estudos clínicos como em modelos experimentais (76)

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, seguras para consumo humano e que, quando ingeridos em quantidades adequadas, têm efeitos benéficos à saúde (FAO, WHO, 2006). As cepas probióticas mais comuns são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (77).

Estudo com periodontite experimental induzida por ligadura em ratos mostrou que o uso do probiótico *B. subtilis* cepa CH201 levou a menor perda de osso alveolar (78). Em estudo posterior, o mesmo probiótico induziu redução de proteína quinase p38 mitogêno-ativada (MAPK) nos animais com ligadura, maior produção de osteoprotegerina, diminuindo a atividade de osteoclastos, embora os níveis de RANKL não tenham sido afetados. O probiótico também levou a alteração na morfologia do intestino, com maior profundidade das criptas no jejuno e duodeno (79). O mesmo grupo mostrou que a suplementação com probióticos do gênero

Bacillus (*B. subtilis* e *B. licheniformis*) reduziu a destruição do osso alveolar em animais com periodontite induzida por ligadura, mas este efeito foi observado também quando os animais receberam raspagem e aplanamento radicular (80). A terapia com aplicação oral de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) promoveu menor perda óssea e reduziu a inflamação em camundongos induzidos com periodontite experimental com *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, mostrando efeito protetor significativo na perda óssea alveolar, que pode estar ligado a mudanças não apenas no microbioma oral mas também a alterações no microbioma intestinal (38).

Probióticos do gênero *Bifidobacterium* também mostraram resultados encorajadores no controle da periodontite experimental induzida pela colocação de ligaduras em ratos. A administração tópica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) HN019 na região subgengival, em animais com ligadura, promoveu redução da perda óssea alveolar, e da ativação de NF- κ B e da produção de IL-1 β , quando estes foram comparados aos animais controles que receberam apenas a ligadura. Além disso, o probiótico induziu maior produção de defensinas e osteoprotegerina no tecido gengival, e alterou a microbiota, induzindo maior proporção de *Actinomyces* e *Streptococcus*-like e menores proporções de *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*, e *Prevotella intermedia*-like (81). *B. lactis* exerceu também efeitos anti-inflamatórios no epitélio por regular negativamente a produção de CXCL-8 e reduzir o número de osteoclastos em modelo de periodontite experimental com ligadura. Além disso, o grupo que recebeu tratamento periodontal convencional associado ao probiótico *B. lactis* apresentou níveis reduzidos de perda óssea alveolar, e o infiltrado inflamatório na região de furca foi mais restrito do que o observado no grupo apenas com tratamento periodontal convencional (82).

Alguns estudos em humanos mostraram efeitos benéficos do uso de probióticos para o controle da gengivite. *L. reuteri* foi capaz de reduzir parâmetros clínicos de severidade de doença como sangramento a sondagem e inflamação gengival (83). O emprego de *L. brevis* (84) e *L. salivarius* (85) também promoveu a redução do índice gengival em humanos. Produtos como leite fermentado probiótico (86), chicletes contendo *L. reuteri* (87) e um produto comercial à base de *L. reuteri* (88) foram capazes de controlar a gengivite, reduzir citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular e inibir a formação de biofilme dental. Pastilhas contendo *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

(BB-12) usadas por voluntários saudáveis por 4 semanas levaram a redução de índice de placa e índice gengival, sem alterar a composição da microbiota da saliva (89). O efeito de pastilhas contendo *L. reuteri* concomitante ao tratamento com raspagem e aplanamento radicular foi testado em estudo com 15 pacientes com periodontite crônica por grupo (probiótico e controle), acompanhados por 12 semanas. As pastilhas probióticas promoveram redução nos níveis de *P. gingivalis* e *P. intermedia* na saliva e no biofilme em relação ao controle que recebeu apenas o tratamento mecânico, e o grupo com probióticos apresentou menor porcentagem de sítios com profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$ após 12 semanas de acompanhamento (90).

Os mecanismos de ação destes organismos benéficos incluem seu efeito direto, pela produção de bacteriocinas, ácidos e peróxidos que são tóxicos a vários patógenos; podem modificar o pH e o potencial de oxi-redução do meio, prejudicando o estabelecimento de agentes patogênicos; inibir a adesão e formação de biofilmes e interferir na resposta do hospedeiro promovendo a inibição da produção de metaloproteases e citocinas pró-inflamatórias ou modular a proliferação celular e a apoptose (77,91,92). *L. lactis* mostrou atividade antibacteriana *in vitro*, sendo capaz de inibir a concentração desses patógenos em 50%. Além disso, *L. lactis* inibiu de maneira dose-dependente a produção de IL-6 e TNF- α induzidas por LPS na linhagem monocítica THP-1 (93).

Bifidobactérias apresentam propriedades antimicrobianas, agindo diretamente em *P. gingivalis* (94). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que cepas de Bifidobactérias e seus produtos são capazes de inibir a formação de biofilme misto formado por *P. gingivalis* cepas ATCC 33277 (fimbriada e não capsulada) ou W83 (afimbriada e capsulada), e *Streptococcus oralis* e *S. gordonii*. É interessante notar que esta atividade foi restrita à inibição do biofilme misto, e não à inibição do biofilme formado apenas pelos *Streptococcus*. Além disso, os probióticos foram capazes de regular a transcrição gênica, em alguns casos atenuando a expressão de fatores de virulência de *P. gingivalis* (Ishikawa et al., dados não publicados) .

A atividade antimicrobiana de Bifidobactérias poder ser relacionada à produção de ácido lático (95). No entanto, os dados indicam que a inibição do biofilme misto contendo *P. gingivalis* foi observada também em produtos solúveis secretados pelas Bifidobactérias em mecanismo independente do pH (Ishikawa et al. dados não publicados).

P. gingivalis pode invadir células epiteliais e ultrapassar a barreira epitelial atingindo tecidos mais profundos. Quando no citoplasma das células, o patógeno explora diferentes vias que permitem a sua saída das células invadidas, propiciando a sua persistência nos tecidos gengivais (96). Dados obtidos pelo nosso grupo mostraram que probióticos são capazes de alterar a resposta de células epiteliais gengivais contra *P. gingivalis*, e inibir o processo de adesão e invasão do patógeno nestas células (97). *P. gingivalis* ATCC 33277 e W83 são capazes de reduzir a viabilidade de células epiteliais gengivais OBA-09, em 29,12%±9.90 e 30,02%±5,12, respectivamente. No entanto, entre as cepas de *Bifidobacterium* probióticas testadas, *B. breve* 1101A, *B. bifidum* 1622A, mas não *B. longum* 51A, *B. longum infantis*, *B. lactis* BB12 e *B. pseudolongum* 1191A foram capazes de prevenir a perda de viabilidade destas células após os desafios com *P. gingivalis*. Além disso, *B. breve* 1101A, *B. bifidum* 1622A, *B. longum* 51A, *B. longum infantis* e *B. lactis* BB12 foram capazes de inibir a adesão de *P. gingivalis* a células epiteliais e todas as bifidobactérias testadas foram capazes de inibir o processo de invasão a estas células, embora a maior inibição tenha sido promovida por *B. bifidum* 1622A, *B. longum infantis* e *B. lactis* BB12. Os dados também mostraram que embora a eficiência da adesão das bactérias probióticas às células epiteliais seja baixa, a eficiência de adesão aumenta após desafio com *P. gingivalis*, sugerindo que a presença do patógeno poderia favorecer a colonização dos sítios orais por probióticos Bifidobactérias. Além disso, Bifidobactérias probióticas foram encontradas mesmo após o tratamento das células epiteliais infectadas com gentamicina, sugerindo que alguns probióticos testados podem invadir células epiteliais gengivais (*B. longum infantis* e *B. lactis* BB12), sendo este processo favorecido pelo desafio com *P. gingivalis* para *B. bifidum* 1622A.

A produção de citocinas por células epiteliais gengivais desafiadas com *P. gingivalis* também foi alterada pelas cepas probióticas, sendo que *B. bifidum* 1622A foi capaz de reduzir drasticamente os níveis de IL-1 β no sobrenadante, enquanto *B. breve* 1101A reduziu a síntese de TNF- α e CXCL-8 pelas células desafiadas com *P. gingivalis*. Esta redução promovida pelos probióticos foi acompanhada de redução na expressão de *TLR4* por *B. breve* 1101A e *B. bifidum* 1622A. Dados preliminares *in vitro* sobre o efeito de probióticos Bifidobactérias sobre macrófagos estimulados com LPS de *E. coli* e desafiados com *P. gingivalis* ATCC 33277 mostraram também que *B. breve* 1101A regulou positivamente a expressão de TLR2, TLR4, NLRP3, IL-

1 β , CXCL-8 e TNF α quando comparado com controle apenas com macrófagos com estimulação e desafiado com *P. gingivalis*.

Os dados obtidos *in vitro* são promissores, pois indicam que Bifidobactérias podem ser capazes de controlar a colonização por *P. gingivalis*, por controlar a formação de biofilme, e a adesão a células epiteliais, e também agindo na modulação da resposta imune, por alterar a expressão de PPRs e a produção de citocinas associadas ao processo inflamatório.

Para o uso clínico de probióticos, há necessidade do conhecimento das suas propriedades, com seleção do agente mais apropriado para cada quadro (98). 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. Portanto, para o presente estudo, foram selecionadas 2 cepas de *Bifidobacterium*, *B. breve* 1101A e *B. bifidum* 1622A, que se mostraram mais promissoras e com comportamento distinto para o estudo em animais. As propriedades imunomodulatórias dos probióticos foram investigadas neste modelo *in vivo*, avaliando seu efeito sobre a doença periodontal induzida por consórcio microbiano em animais experimentais. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar o efeito de cepas probióticas do gênero *Bifidobacterium* em modelo experimental de periodontite.

2 PROPOSIÇÃO

Esse estudo visou determinar o potencial de duas cepas probióticas do gênero *Bifidobacterium* no controle da periodontite.

2.1 Objetivos específicos

O efeito da administração oral dos probióticos *B. breve* 1101A e *B. bifidum* 1622A foi determinado em modelo experimental *in vivo* de periodontite, avaliando-se:

- Perda óssea alveolar por microCT,
- Ganho de peso,
- Perfil de citocinas séricas,
- Expressão de genes no tecido gengival que codificam receptores intra- e extra-celulares e citocinas,
- Níveis de *P. gingivalis* em amostras do biofilme, fígado, baço e conteúdo intestinal,
- Fenótipo de linfócitos T no tecido gengival, baço e linfonodos, pela determinação da proporção de células Th17 e Treg.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foram realizados ensaios *in vivo*, em camundongos C57BL/6, como apresentado na figura 3.1.1. A periodontite experimental foi induzida após redução da carga microbiana, pela inoculação de um consórcio microbiano formado por *P. gingivalis* W83 e ATCC 33277, *P. intermedia* 17, *S. gordonii* DL1 e *F. nucleatum* ATCC 25586, cerca de 4 horas após a inoculação das cepas probióticas, visto que a proposta do presente estudo foi avaliar a possível influência dos probióticos na colonização oral pelas bactérias do consórcio microbiano, e, assim na prevenção e controle da doença periodontal. As cepas probióticas foram inoculadas uma vez/dia, por volta das 11h da manhã, durante todo o período experimental. As amostras do consórcio microbiano e de probióticos foram liofilizadas em condições padronizadas e recuperadas no dia da inoculação. Após 45 dias de período experimental, os animais dos grupos avaliados foram eutanasiados e obtidas às amostras e realizadas as análises. Foram avaliados a perda óssea alveolar na maxila, os níveis séricos de IL-10 e TNF- α , a expressão gênica em tecido gengival, a detecção de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* no biofilme oral, no fígado, no baço e nas fezes, e a proporção de células T reguladoras e Th17 no tecido gengival, baço, e linfonodos.

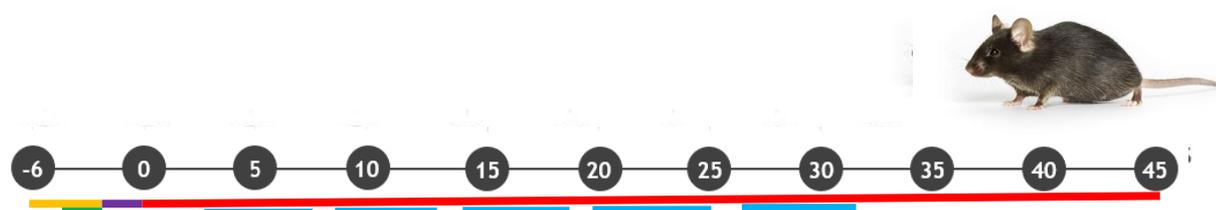
Foram avaliados os seguintes grupos, formados por 8 animais cada (P: patógenos periodontais; B: bifidobactérias probióticas):

1. SHAM: P-B- (inoculado com veículo do consórcio microbiano e veículo de probióticos)
2. Controle positivo: P+B- (inoculado com consórcio microbiano e veículo de probióticos)
3. Probiótico *B. breve* 1101A: P-B+ (1101) (inoculado com veículo do consórcio microbiano e probiótico *B. breve* 1101A)

4. Probiótico *B. bifidum* 1622A: P-B+ (1622) (inoculado com veículo do consórcio microbiano e probiótico *B. bifidum* 1622A)
5. Periodontite + Probiótico *B. breve* 1101A: P+B+ (1101) (inoculado com consórcio microbiano e probiótico *B. breve* 1101A)
6. Periodontite + Probiótico *B. bifidum* 1622A: P+B+ (1622) (inoculado com consórcio microbiano e probiótico *B. bifidum* 1622A)

Os ensaios foram realizados 2 vezes, com exceção da análise de linfócitos, devido à quantidade de tecido gengival. Cada grupo foi formado por 8 animais, compreendendo o total de 48 animais/ensaio, sendo realizados dois ensaios independentes, totalizando 96 animais experimentais.

Figura 3.1 -. Delineamento experimental do estudo



Fonte: O autor

- Quatro dias de antibioticoterapia.
- Dois dias de aplicação oral de digluconato de clorexidina 2% em gel.
- Dois dias de *washout*.
- Quarenta e cinco dias de inoculação de 1×10^9 UFC/probiótico [B+(1101A) ou B+(1622A)] 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);
- B- (Veículo dos probióticos *Bifidobacterium*)

B+1101 - *B. breve* 1101A (Inóculo de probiótico *B. breve* 1101A)

B+1622 - *B. bifidum* 1622A (Inóculo de probiótico *B. breve* 1622A)

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 111), e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ FO protocolo 19/2019) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo 113), 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 *Bifidobacterium breve* 1101A e *Bifidobacterium bifidum* 1622A, isolados de amostras de fezes de crianças saudáveis (99).

Para os ensaios de interação microbiana foram empregados organismos orais de origem humana, na indução de periodontite experimental, *P. gingivalis* (ATCC 33277, não capsulada e fimbriada, fimA I), *P. gingivalis* (W83 capsulada e não fimbriada), *Prevotella intermedia* (17) (32), *F. nucleatum* (ATCC 25586) (29) e *S. gordonii* (DL1) (100).

3.3.2 Condições de cultura

Todas as cepas bacterianas foram mantidas em glicerol 20% em freezer em temperatura de -80°C . Alíquotas de $25\mu\text{l}$ de *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* 17 (32), e *F. nucleatum* ATCC 25586 (29), foram inoculadas em placa de cultura de ágar sangue suplementado com hemina (10 mg/ml; Sigma-Aldrich) e menadione (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) e incubadas em condições de anaerobiose em câmara de anaerobiose (85% N_2 , 5% H_2 e 10% CO_2) à 37°C por 48 horas.

Para o organismo comensal *S. gordonii*. DL1 (100), alíquotas de $25\mu\text{l}$ 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 (10% CO_2) à 37°C por 24-48 horas.

Alíquotas de $25\mu\text{l}$ das amostras de probióticos, foram inoculadas em placas de ágar BSM (Sigma-Aldrich) e incubadas em condições de anaerobiose (85% N_2 , 5% H_2 e 10% CO_2) à 37°C por 24-48 horas.

3.4 Obtenção das culturas para liofilização

Optamos por realizar a liofilização das amostras na fase de cultura estacionária, portanto todas as bactérias utilizadas foram incubadas por um período de 16 a 18 horas.

Após o crescimento das amostras de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* em placas de cultura, como descrito no item 3.3, as colônias foram transferidas para novas placas de cultura de ágar sangue e incubadas em anaerobiose (85% N_2 , 5% H_2 e 10% CO_2) à 37°C por 24 horas. As colônias foram suspensas em 2 ml de meio de cultura caldo BHI e então foram inoculadas em caldo BHI (suplementado com 1mg hemina/ml e 0,1mg menadione/ml) e ajustada a densidade óptica inicial ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,65$ para *P. gingivalis* e *P. intermedia*, $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,1$ a $0,3$ para *F.nucleatum*) em volume final de 50ml. As culturas foram incubadas em câmara de anaerobiose (85% N_2 , 5% H_2 e 10% CO_2) por 16 a 18 horas até atingir

$DO_{600nm} = 1$ a $1,2$ para *P. intermedia* e *P. gingivalis*, e a $DO_{600nm} = 0,7$ a $0,8$ para *F. nucleatum*.

Após o crescimento de *S. gordonii* em placa de cultura como descrito no item 3.3, as colônias foram transferidas para nova placa de cultura de BHI e então incubada em condições de microaerofilia (10% CO_2 , 85% N_2 e 5% H_2) à $37^\circ C$ por 24 horas. Alíquotas de $25\mu l$ de cultura de *S. gordonii* foram transferidas para 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 50ml. As culturas foram incubadas em 10% de CO_2 (condição de microaerofilia) a $37^\circ C$ por 4h até atingir $DO_{600nm} = 0,8$ a $0,9$.

Após o crescimento dos probióticos em placas de cultura como descrito no item 3.3, as colônias foram transferidas para novas placas de cultura de ágar BSM e incubadas em anaerobiose (85% N_2 , 5% H_2 e 10% CO_2) à $37^\circ C$ por 24 horas. Alíquotas de $25\mu l$ das culturas de probióticos foram inoculadas em 10 ml caldo de MRS seguindo-se incubação por 16 a 18 horas. Após este período, as culturas foram ajustadas a $DO_{600nm} = 1$, diluídas 1:10 em volume final de 50ml de caldo MRS, seguindo-se incubação em anaerobiose. A cultura de *B. bifidum* 1622A foi incubada por 16h em anaerobiose e de *B. breve* 1101A por 8h.

3.5 Liofilização

As amostras foram então centrifugadas 3.700 rpm (2.464 Xg), 10 min em temperatura ambiente, e ressuspendidas em $500\mu l$ de solução para liofilização [leite desnatado Molico a 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 $100\mu l$ foram transferidas para criotubos e mantidas em freezer $-80^\circ C$. As amostras foram então liofilizadas utilizando o equipamento Freezone Triad Freezer Dryers (Labconco, Kansas, EUA) ajustado em $-40^\circ C$, sob vácuo. O material liofilizado foi armazenado em freezer $-80^\circ C$.

3.6 Recuperação das amostras liofilizadas e determinação de UFC

As amostras foram ressuspensas em caldo BHI (suplementado com 1mg hemina/ml e 0,1mg menadione/ml) por 6 horas e mantidas em câmara de anaerobiose, quando então foi realizada a determinação do número de organismos viáveis /criotubo. Para os probióticos, as amostras foram ressuspensas em caldo MRS, quando então foi realizada a determinação do número de organismos viáveis /criotubo. As suspensões bacterianas foram diluídas em série em PBS (pH 7,0) e alíquotas de 25µl foram inoculadas em triplicata na superfície de ágar sangue hemina/menadione para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, ágar BSM para bifidobactérias e ágar BHI para *S. gordonii*. Após incubação em câmara de anaerobiose por 2-4 dias, as colônias foram contadas e o número de UFC/criotubo estimado. Este processo foi repetido a cada 2 meses para avaliação da manutenção do número de organismos viáveis/ criotubo.

3.7 Animais e condições de manutenção

Foram utilizados 96 camundongos da linhagem C57BL/6 SPF (Specific Pathogen Free), com 4 semanas de idade, mantidos no biotério de criação de camundongos do Depto 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 8 animais por grupo experimental. Foram realizados dois ensaios independentes. Os animais foram acompanhados observando-se o peso, perda de mobilidade e presença de lesões cutâneas.

3.8 Antibioticoterapia

Para reduzir a microbiota residente, e favorecer a colonização por organismos isolados de humanos, os animais receberam 1mg de canamicina/ml (38, 101) e 1mg de amoxicilina/ml em água, durante 4 dias consecutivos. Nos últimos dois dias de tratamento com antibióticos, as cavidades orais dos camundongos foram lavadas com gluconato de clorexidina 2% em gel através de um microbrush (38, 101) (Peridex; Procter and Gamble). Foi respeitado um intervalo de 2 dias antes do início das inoculações com probióticos (3 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 1ml de caldo infusão de cérebro e coração (BHI, BD; Becton; Dickinson and Company, Sparks; EUA) suplementado com hemina (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e menadione (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), seguindo-se incubação em condições de anaerobiose em câmara de anaerobiose (85% N₂, 5%H₂ e 10% CO₂) à 37°C por 6 horas. Alíquotas de 50µl com 2x10¹² UFC/ml de cada bactéria foram adicionadas a 750µl de solução de PBS em 2% carboximetilcelulose (LabSynth Produtos para laboratório, Ltda, São Paulo, Brasil) (38,101).

3.9.2 Inoculação do consórcio microbiano para indução de periodontite experimental

Os animais dos grupos P+ foram inoculados por 25 dias, sendo 5 dias/semana durante as cinco primeiras semanas do ensaio. As inoculações foram realizadas através da administração do volume de 50µl contendo 10^{11} UFC/ml de cada bactéria, diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio da agulha de gavagem (figura 3.9.4.1). Animais controles inoculados apenas com veículo (PBS em 2% carboximetilcelulose) foram também avaliados.

3.9.3 Inóculo das amostras de Probióticos

As amostras liofilizadas de *B. breve* 1101A e *B. bifidum* 1622A foram ressuspensas em 1ml de caldo Lactobacilli MRS (BD; Becton; Dickinson and Company, Sparks; EUA). Alíquotas de 50µl contendo 2×10^{10} UFC/ml de cada uma das cepas probióticas foram adicionadas em 950µl PBS em 2% carboximetilcelulose (101).

3.9.4 Inoculações das amostras de Probióticos

Os animais dos grupos B+ foram inoculados 1X/dia, durante todo o período experimental (45 dias). As inoculações foram realizadas através da administração do volume de 50µl contendo 10^9 UFC/ml de cada bactéria (38), diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio da agulha de gavagem. Animais controles B-, inoculados apenas com veículo (PBS em 2% carboximetilcelulose), foram também avaliados.

Figura 3.2 -. Inoculação oral de camundongo C57BL/6 com auxílio de agulha de gavagem



Fonte: O autor

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 Vertbrands, Brasil) e xilazina (Ansedan 2%, Laboratório Vertbrands, 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). Amostra de sangue foi obtida por punção intracardíaca, a fim de minimizar a contaminação, e os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. O sangue foi centrifugado a 461 Xg por 10 minutos e o soro armazenado a -80°C. Amostras de tecido gengival, foram coletadas, com auxílio de pinça das duas hemiarquadas da maxila, permitindo a remoção de todo o tecido gengival da superfície maxilar ao redor dos molares dos camundongos, segundo a técnica descrita por Mizraji (168). Parte do tecido gengival foi imediatamente transferida para solução de RNA^{later}TM Stabilization Solution (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia), para análise da expressão gênica e armazenadas a -80°C,

Amostras do biofilme oral foram obtidas com auxílio de microbrush estéril passado 10X na cavidade oral de cada animal. Também foram obtidos o fígado e o baço, além de conteúdo do intestino delgado e linfonodos cervicais, inguinais e braquiais. As amostras de biofilme oral, fígado, conteúdo intestinal e parte do baço e foram imediatamente transferidas para tampão TRIS EDTA, pH 8.0 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia). Parte do tecido gengival, parte do baço e os linfonodos foram imediatamente transferidos para meio de cultura de células RPMI 1640 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA), como descrito no item 3.14, para determinação do fenótipo de células T. Após a remoção do tecido gengival, uma hemimaxila foi transferida para tubo contendo solução de formaldeído a 4% e assim mantida por 24 horas à temperatura ambiente, seguindo-se transferência para solução salina fosfatada -PBS (8g NaCl; 1g KCl; 3,5g Na₂HPO₄; 1g KH₂PO₄) 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 (SkayScan 1176 versão 1.1, Bélgica) a 45kV de voltagem, 550uA de corrente, 8,71µm tamanho do pixel, filtro de alumínio 0,2mm. As hemimaxilas foram escaneadas e as imagens analisadas calculando o volume ósseo (CTAnalyser software Version 1.15.4.0, Skyscan) da região que compreende a maxila entre a mesial do primeiro molar até a mesial do segundo molar (102,103).

3.12 Determinação dos níveis de *P. gingivalis* em amostras de biofilme oral, fezes do conteúdo intestinal, fígado e baço

A extração do DNA das amostras de biofilme oral, conteúdo intestinal (fezes), fígado e baço foi realizada com a utilização do kit Meta-G-Nome™ DNA Isolation - MGN0910 (Epicentre, EUA). com auxílio do Mini-BeadBeater (BioSpec 3110BX Mini-BeadBeater-1 High Energy CellDisrupter) por 20 segundos, duas vezes. Após a

extração, a quantidade e qualidade do DNA foi estimada por espectrometria (Nanodrop ND1000 - Thermo Fisher Scientific Inc.). Os níveis de *P. gingivalis* foram determinados por PCR em tempo real, usando pares de primers específicos para *P. gingivalis* (5'-TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC-3' e 5'-ACG TCA CCA CCT CCT TC-3') (104,105). A reação foi composta de 1µl de DNA da amostra (contendo 10ng/µl de DNA), 5µl de SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia); 0,25µl de cada primer (concentração final 25pMol) e 3,5ul de água livre de RNase (UltraPure™ DNase/RNase-Free Water, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi ajustada a 50° C / 2 min., 95° C / 10 min., seguindo-se 40 ciclos a 95° C / 15 seg., 60°C / 1min, em termociclador StepOne Plus (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA).

A curva padrão foi obtida pela amplificação de *16SrRNA* de *P. gingivalis* ATCC 33277 em PCR convencional. A reação foi composta de 2,5µl (10X PCR buffer), 1µl (1,5mM de MgCL₂, 0,7µl (100µl de cada dNTP), 0,3µl (0,3U Taq Polymerase, 1µl do DNA da amostra, 18,5µl água livre de RNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 0,5µl de cada primer (na concentração 12,5pMol). Após corrida eletroforética em gel de agarose em tampão Tris-Acetato-EDTA, a banda única foi excisada e o fragmento purificado com a utilização do kit Illustra™ GFX™ PCR DNA (GE Healthcare, Amershan, UK). O produto de DNA foi quantificado Qubit® (Invitrogen™) e calculado o número de cópias de DNA de *P. gingivalis* utilizando o site: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. O produto de DNA foi diluído em série e utilizado nas concentrações entre 10⁸ a 10¹ cópias na reação em tempo real, como descrito. Com base na equação da reta obtida com a curva padrão (eficiência ~ 100%) foi realizado o cálculo para determinação do número de cópias de *16SrRNA* de *P. gingivalis*:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de cópias} = \frac{\text{valor do CT} - \text{valor da intersecção entre os eixos x e y}}{-(\text{valor da inclinação da reta da curva padrão})}$$

Os dados foram relatados como número de cópias de *16SrRNA* de *P. gingivalis*/µg de DNA de cada amostra.

3.13 Estudo da expressão gênica (RT-PCR)

As amostras de tecido gengival foram submetidas à extração de RNA utilizando TRizol LS Reagente (Invitrogen Life Technologies), conforme instruções do fabricante com auxílio do Mini-BeadBeater (BioSpec 3110BX Mini-BeadBeater-1 High Energy CellDisrupter) por 20 segundos, duas vezes. Foi utilizado 1,0 ml de TRizol por fragmento de tecido gengival. Após a incubação por 30 minutos, foram adicionados 100µl 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) e os sais removidos com lavagem por duas vezes com etanol (75%) (LabSynth). 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, CA/EUA), e tratado com desoxirribonuclease (Ambion™ DNase I, RNase-free, Life Technologies, Carlsbad, CA/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 280nm (Nanodrop Technologies ND-1000-DE/ EUA) e então utilizado para a síntese de cDNA.

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

Após o ciclo inicial de 10 minutos a 25°C, a reação foi realizada 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) para análise da expressão gênica. Foram utilizados primers e sondas comerciais Taqman (Applied Biosystem) para camundongos: *tlr-2* (Mm01213946_g1), *tlr-4* (Mm00445273_m1), *nlrp3* (Mm04210224_m1), *il-1β* (Mm00434228_m1) e *tnf-α* (Mm00443258_m1) e *β-actin* (Mm00607939_s1). Cada

reação foi realizada utilizando 0,5µl 20x TaqMan™ Gene Expression Assay (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia), 5µl 2x PCR Master Mix 2x (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia), 2µl de cDNA (100ng), 2,5µl água RNase free (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA/EUA).

Nestes ensaios a quantificação relativa da expressão dos genes alvo foi feita pelo método do $\Delta\Delta CT$, utilizando o gene β -actina como controle endógeno (106).

3.14 Estudo das subpopulações de células T

A caracterização das subpopulações de células T *Treg* e *Th17*, conforme estudos anteriores (107–109), foi realizada utilizando o tecido gengival removido da maxila direita, baço e linfonodos cervical, inguinal e braquial de todos os grupos experimentais. As amostras foram coletadas e imediatamente colocadas em meio RPMI 1640 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com NaHCO_3 , penicilina/estreptomicina/gentamicina e 0,28 de enzima (Wunsch/ mL de liverase blendyme CI, Pen Strep., Gibco by Life Technologies., New York; EUA). As células foram dissociadas utilizando o Kit Tumor Dissociation mouse (Miltenyi Biotec Inc., Auburn; EUA) de acordo com as recomendações do fabricante com auxílio do aparelho gentle MACS™ Octo Dissociator with Heaters (Miltenyi Biotec Inc., Auburn; EUA). As células T auxiliares foram determinadas por marcação fluorescente, seguida de análise de citometria de fluxo utilizando partículas de compensação como padrão interno (Anti.-Rat and Anti-Hamster Ig κ /Negative Control Compensation Peticles Set, BD Comp Beads, EUA) e anticorpos monoclonais comerciais (BD; Becton; Dickinson and Company, San Diego; EUA), diluídos 1:200, de acordo com as instruções do fabricante. As células mortas e debris celulares foram excluídos pela marcação com anticorpo Fixable Viability Stain 570. Para a citometria, alíquotas contendo 10µl de células de cada amostra foram coradas com azul de tripan e contadas no Countess™ Automated cell conter (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia). Cerca de $1-10 \times 10^6$ células foram transferidas para um tubo e marcadas para determinação da viabilidade celular,

utilizando o kit BD Horizon™ Fixable Viability Stain 570 (BD; Becton; Dickinson and Company, San Diego; EUA), seguindo-se incubação por 20 minutos a temperatura ambiente protegida da luz. As células foram lavadas com 1ml de FBS e precipitadas por centrifugação (250XG por 10 minutos/4°C). A marcação de linfócitos CD4+ foi realizada com anticorpos monoclonais para CD3 (APC-Cy™ 7 Rat Anti-Mouse CD3 Molecular Complex), CD4 (FITIC Rat Anti-Mouse CD4), e CD45 (BV510 Rat Anti-Mouse CD45) pela adição de 25µl de cada anticorpo diluído 1:200, seguindo-se incubação por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A seguir, as células foram fixadas e permeabilizadas com auxílio do kit BD Pharmingen™ Mouse Foxp3 Buffer Set (BD; Becton; Dickinson and Company, San Diego; CA, EUA). As células foram suspensas em 1ml de FBS, centrifugadas a 500XG por 5 minutos e as células precipitadas foram fixadas com 1ml da solução de fixação durante 30 minutos a 4°C, sob proteção de luz. A permeabilização foi realizada pela adição de 1ml da solução de permeabilização e manutenção por 30 minutos a 37°C sob proteção de luz. Após lavagem das células com 1ml de FBS, as células foram precipitadas por centrifugação 500xg por 5 minutos, e ressuspensas em soluções com os anticorpos monoclonais para marcação de linfócitos Treg e Th17. Alíquotas de 25µl de cada anticorpo [Alexa Flour® 647Rat anti-MOUSE Foxp3 (Treg), e BV421 Mouse Anti-Mouse RORγt (Th17)] diluídos 1:2000 foram adicionadas às células, seguindo-se incubação *overnight*, a 4°C, ao abrigo da luz. As células foram centrifugadas e ressuspensas em 50µl de FBS e analisadas por citometria de fluxo, utilizando o citômetro BD FACSCanto™ II (BD; Becton; Dickinson and Company, San Diego;CA, EUA), e comprimento de onda adequado para cada fluoróforo. 100.000 eventos foram reunidos em uma região de linfócitos vivos com base em padrões de dispersão frontal e lateral e analisados utilizando o programa FlowJo 10.6 (BD; Becton; Dickinson and Company, San Diego; EUA).

3.15 Determinação dos níveis de citocinas

As amostras de soro foram analisadas quanto aos níveis de IL-10 e TNF-α através de ELISA, utilizando kit BD Opteia Mouse ELISA Set (BD; Becton; Dickinson and Company, San Diego; CA, EUA). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com

o anticorpo de captura para cada citocina e incubadas overnight a 4°C. Após este período, 100µl de amostras de soro de cada animal, em duplicata, diluído 1:5 em PBS, pH 7,0 foram adicionados aos poços. Uma curva padrão foi realizada para cada citocina com concentração inicial de 500 pg/ml, em diluição seriada (1:2). As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, e após este período adicionados 100µl do anticorpo de detecção (diluído 40:10000) Após incubação por 1 hora em temperatura ambiente, foi realizada a revelação da reação pela adição de 100µl da solução de substrato e manutenção por 30 minutos em temperatura ambiente, sob abrigo da luz, seguindo-se adição de 50µl de ácido sulfúrico para bloquear a reação. A cada etapa, os poços foram lavados com PBS-Tween (PBS pH 7,0 acrescido de 0,5% tween 20, Sigma–Aldrich, Darmstadt, Alemanha). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Microplate Manager[®] Software Version 5.2.1. Bio-Rad Laboratories, INC. Hercules, EUA) ajustado no comprimento de onda de 450nm.

3.16 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 $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico GraphPad Prisma[®] Versão 6.0 (Software GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Liofilização de probióticos e patógenos

Os dados obtidos com culturas de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *S. gordonii* e dos probióticos liofilizados indicaram que as condições utilizadas foram adequadas para a manutenção da viabilidade microbiana quando estes foram estocados em freezer a -80°C por até 6 meses.

Optamos por utilizar as culturas dos organismos orais liofilizados como inóculo visando oferecer as condições apropriadas para a colonização oral. Por isso as amostras bacterianas liofilizadas foram ressuspensas em caldo BHI e mantidas sob condições anaeróbicas a 37°C por 6 horas.

Os probióticos foram ressuspensos em meio de cultura, ajustada a concentração de acordo com o número de organismos viáveis/tubo de cada lote, para serem imediatamente usados como inóculo. Esta opção deveu-se ao uso comum de probióticos na sua forma liofilizada.

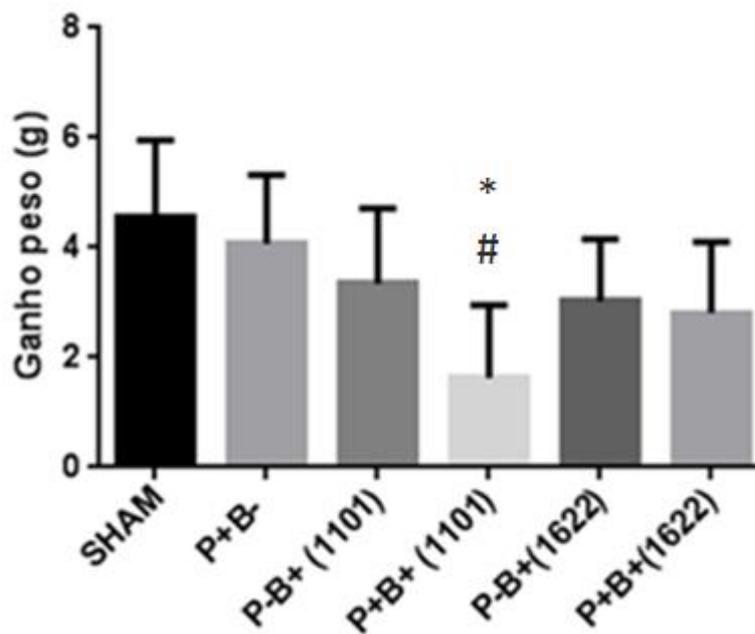
O número de células viáveis por tubo foi avaliado e determinado o protocolo para a inoculações de maneira a permitir que 1×10^{11} UFC de cada microrganismo do consórcio e 1×10^9 UFC de cada probiótico fossem utilizados nos inóculos ressuspensos na solução de carboximetilcelulose a 2% em PBS. Os dados da recuperação dos organismos orais variaram entre os lotes, mas foram utilizados os lotes que apresentavam 10^{20} e 10^{13} UFC/tubo de cada cepa.

4.2 Efeitos colaterais e ganho de peso induzido pelos diferentes tratamentos

O estudo *in vivo* foi realizado sem maiores intercorrências, não sendo observados efeitos colaterais dos diferentes tratamentos a que os animais foram submetidos como alteração na pelagem, alterações comportamentais ou de locomoção que indicassem comprometimento visível. Os dados de ganho de peso ao final dos ensaios de cada um dos grupos avaliados estão apresentados na figura

4.1, indicando um ganho de peso menor nos animais do grupo P+B+ (1101) comparado ao SHAM. Após a eutanásia, as amostras obtidas foram avaliadas quanto à perda óssea alveolar.

Figura 4.1 - Média e desvio padrão do ganho de peso dos animais em gramas determinado pela diferença entre o peso final (após 45 dias de experimentação) e inicial nos grupos submetidos aos diferentes tratamentos: SHAM (controle negativo: Veículo consórcio microbiano + Veículo Probiótico), P+B- (Consórcio Microbiano + Veículo Probiótico), P-B+ (1101) (Veículo consórcio microbiano + Probiótico *B. breve* 1101A), P+B+ (1101) (consórcio microbiano + Probiótico *B. breve* 1101A), P-B+ (1622) (Veículo consórcio microbiano + Probiótico *B. bifidum* 1622A), P+B+ (1622) (consórcio microbiano + Probiótico *B. bifidum* 1622A). * Diferença estatisticamente significante em relação ao controle (SHAM), ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$.

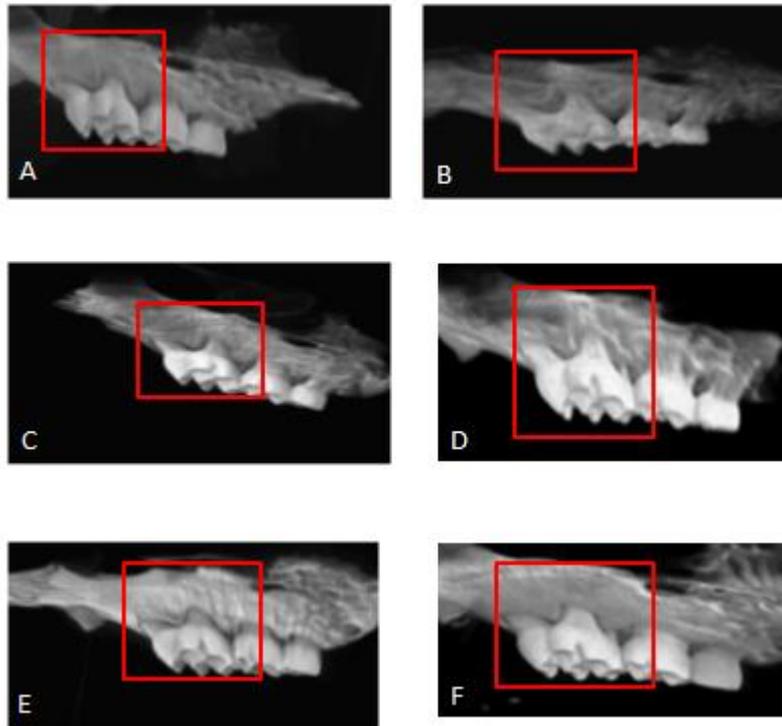


Fonte: O autor

4.3 Perda óssea alveolar

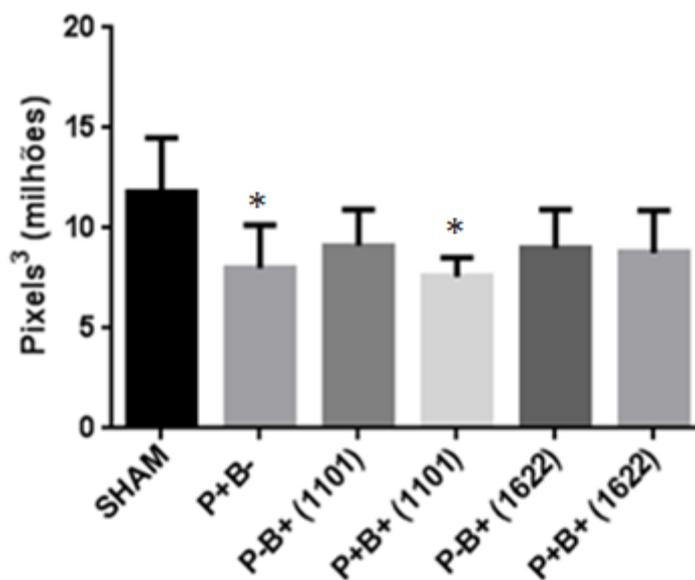
A análise da perda óssea alveolar foi realizada pela estimativa do volume ósseo na região que compreende mesial do primeiro molar até a mesial do segundo molar da maxila direita, como apresentado na figura 4.2. Os dados indicaram que o volume ósseo (pixels³) diferiu entre os grupos SHAM e P+B- e entre os grupos SHAM e P+B+ (1101) (ANOVA, $p < 0,05\%$), como mostrado na figura 4.3. Portanto, o modelo utilizado de indução de doença periodontal experimental foi efetivo, uma vez que a inoculação oral do consórcio microbiano foi capaz de induzir a perda óssea nos animais. O tratamento com probióticos não levou a redução do volume ósseo, não havendo diferença entre os grupos SHAM e P-B+, tanto para o grupo que recebeu *B. breve* 1101A quanto para *B. bifidum* 1622A. No entanto, o volume ósseo apresentado pelo grupo que recebeu o consórcio microbiano associado ao probiótico *B. breve* 1101A [P+B+ (1101)] foi menor que o observado no grupo SHAM, indicando que este probiótico não foi capaz de controlar a perda do osso alveolar induzida pela inoculação com o consórcio microbiano. Por outro lado, o grupo que recebeu o consórcio microbiano associado ao probiótico *B. bifidum* 1622A [P+B+ (1622)] apresentou volume ósseo semelhante ao grupo SHAM, sugerindo que este probiótico foi capaz de controlar a perda óssea alveolar nos animais submetidos à periodontite experimental. No entanto, deve ser ressaltado que o volume ósseo deste grupo não diferiu do volume observado nos grupos P+B- e P-B+ (1622).

Figura 4.2 – Representação da área analisada (mesial do primeiro molar até a mesial do segundo molar da maxila direita) para mensuração do volume ósseo. Figura 4.2 A ilustra a análise para o grupo SHAM, figura 4.2 B para o grupo P+B-, figura 4.2 C para o grupo P-B+ (1101), figura 4.2 D para o grupo P+B+ (1101), figura 4.2 E para o grupo P-B+ (1622), e figura 4.2 F para o grupo P+B+ (1622).



Fonte: O autor

Figura 4.3 - Dados de volume ósseo (média e desvio padrão) (pixels³) da hemi-maxila direita de camundongos C57BL/6 após 45 dias de diferentes tratamentos: SHAM (controle negativo: Veículo consórcio microbiano + Veículo Probiótico), P+B- (Consórcio Microbiano + Veículo Probiótico), P-B+ (1101) (Veículo consórcio microbiano + Probiótico B. breve 1101A), P+B+ (1101) (consórcio microbiano + Probiótico B. breve 1101A), P-B+ (1622) (Veículo consórcio microbiano + Probiótico B. bifidum 1622A), P+B+ (1622) (consórcio microbiano + Probiótico B. bifidum 1622A). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, p <0,05%

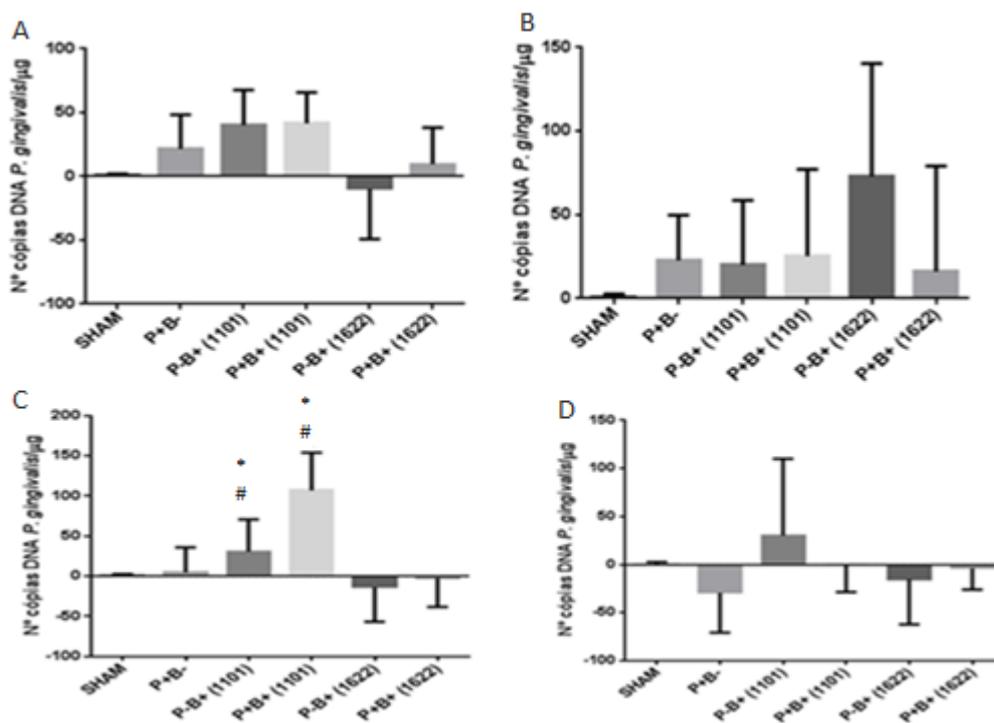


Fonte: O autor

4.4 Detecção de patógenos periodontais

Para quantificação de *P. gingivalis* foi realizada a amplificação de *16SrRNA* de *P. gingivalis* usando como DNA molde, o DNA extraído de amostras de biofilme oral, fezes, fígado e baço dos animais dos diferentes grupos. Os dados foram normalizados em relação aos valores de CT observados no grupo SHAM, como pode ser observado na figura 4.4. Existem diferenças na capacidade da reação possivelmente pela qualidade do próprio DNA, oriundo de diferentes tecidos. Por isso, o negativo foi considerado para cada tipo de amostra distintamente. Pode ser observado que a inoculação oral do consórcio microbiano não induziu a colonização persistente da cavidade oral ou de diferentes órgãos dos camundongos C57BL/6 por *P. gingivalis*, visto que o intervalo entre a última inoculação e a eutânasia foi de 12 dias. Por outro lado, os dados sugerem que a administração de *B. brevis* 1101A no grupo submetido também ao consórcio microbiano [P+B+(1101)] favoreceu a colonização por *P. gingivalis* no fígado.

Figura 4.4 - Número de cópias de DNA de *P. gingivalis* detectada por RT-qPCR. As amostras de DNA de biofilme oral (Figura 4.4 A), fezes (Figura 4.4 B), fígado (Figura 4.4.C) e baço (Figura 4.4.D) dos grupos: SHAM (controle negativo: Veículo consórcio microbiano + Veículo Probiótico), P+B- (Consórcio Microbiano + Veículo Probiótico), P-B+ (1101) (Veículo consórcio microbiano + Probiótico *B. breve* 1101A), P+B+ (1101) (consórcio microbiano + Probiótico *B. breve* 1101A), P-B+ (1622) (Veículo consórcio microbiano + Probiótico *B. bifidum* 1622A), P+B+ (1622) (consórcio microbiano + Probiótico *B. bifidum* 1622A). As amostras de foram obtidas do após a eutanásia, ao término do período experimental de 45 dias. * ANOVA - Comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05$ P+B+ (1622) (consórcio microbiano + Probiótico *B. bifidum* 1622A). As amostras de foram obtidas do após a eutanásia, ao término do período experimental de 45 dias. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), # diferença estatisticamente significativa em relação ao P+B-, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05$ %



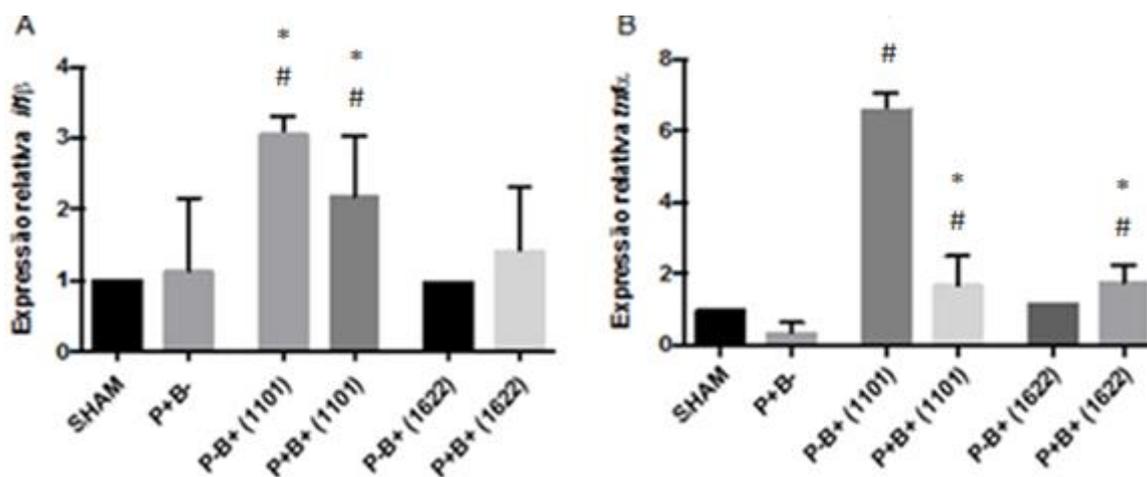
Fonte: O autor

4.5 Expressão gênica relativa no tecido gengival

A análise da expressão gênica dos genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α revelou que a administração do consórcio microbiano não foi capaz de induzir a expressão destes genes no tecido gengival ao final do período experimental, 12 dias após a última inoculação, como apresentado na figura 4.5. No entanto, a administração do probiótico *B. breve* 1101A foi capaz de induzir a expressão de *il-1 β* no tecido gengival, isoladamente [P-B+(1101)] ou no grupo que recebeu a inoculação do consórcio microbiano [P+B+(1101)] (figura 4.5A). Contudo, a administração do consórcio (P+B-) parece regular negativamente *tnf- α* (não significativa), observação corroborada pela redução da regulação positiva da transcrição relativa de *tnf- α* induzida por *B. breve* 1101A no grupo que recebeu o consórcio [P+B+(1101)] em relação ao grupo que recebeu apenas esta cepa probiótica [grupo P-B+(1101)]. Além disso, o probiótico *B. bifidum* 1622A não induziu a expressão de *tnf- α* ou *il-1 β* quando usado isoladamente [P-B+(1622) similar ao SHAM], mas regulou positivamente *tnf- α* na presença do consórcio microbiano [P+B+(1622) maior que SHAM e que P+B-] (figura 4.5B).

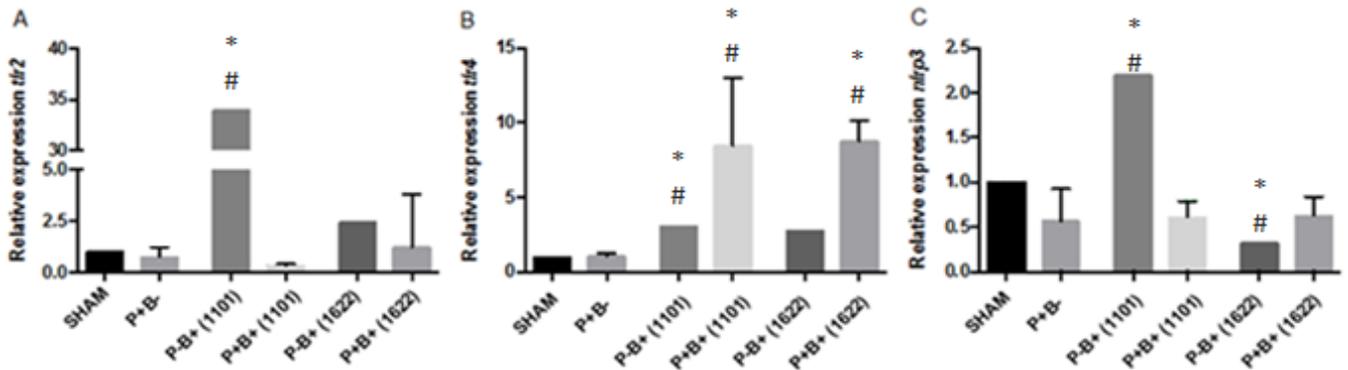
Os dados da expressão de genes associados a receptores indicam que o probiótico *B. breve* 1101A induz a expressão de *tlr2*, mas esta regulação positiva foi suprimida pela inoculação com o consórcio microbiano. Por outro lado, ambos os probióticos regularam positivamente a expressão de *tlr4*, na ausência e presença do consórcio microbiano, enquanto *nrlp3* foi regulado positivamente apenas pelo probiótico *B. breve* 1101A, e esta regulação positiva foi suprimida pelo consórcio microbiano, tanto na ausência (SHAM) como na presença de probióticos (figura 4.6).

Figura 4.5 - Expressão relativa dos genes *il1-β* (Figura 4.5 A) e *tnf-α* (Figura 4.5 B) por RT-qPCR em tecido gengival dos diferentes grupos: SHAM (controle negativo), P+ (inoculados com consórcio microbiano), P-B+ (1101) (inoculado com o probiótico *B. breve* 1101A), P+B+ (1101) (consórcio + probiótico), P-B+ (1622) (inoculado com o probiótico *B.bifidum* 1622A) e P+B+ (1622) (consórcio + probiótico). As amostras foram obtidas do após a eutanásia, ao término do período experimental de 45 dias. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), # diferença estatisticamente significativa em relação ao P+B-, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$



Fonte: O autor

Figura 4.6 - Expressão relativa dos genes *tlr2* (Figura 4.6 A), *tlr4* (Figura 4.6. B) e *nlrp3* (Figura 4.6 C) por RT-qPCR em tecido gengival dos diferentes grupos: SHAM (controle negativo), P+B- (inoculado com consórcio microbiano), P-B+ (1101) (inoculado com o probiótico *B. breve* 1101A), P+B+ (1101) (consórcio + probiótico *B. breve* 1101A), P-B+ (1622) (inoculado com o probiótico *B.bifidum* 1622A) e P+B+ (1622) (consórcio + probiótico *B.bifidum* 1622A). As amostras foram obtidas após a eutanásia, ao término do período experimental de 45 dias. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), # diferença estatisticamente significativa em relação ao P+B-, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$



Fonte: O autor

4.6 Estudo das subpopulações de células T

Foram realizadas as análises das subpopulações de linfócitos T em tecido gengival, linfonodos e baço utilizando os anticorpos anti - CD4, CD3, CD45, FOXP3, e ROR- γ t (BD; Becton; Dickinson and Company, Sparks; EUA) para os grupos SHAM (animais inoculados apenas com veículo), P+B- (animais inoculados apenas com o consórcio microbiano), P-B+(1101) (animais inoculados apenas com probiótico *B. breve* 1101 A), P+B+(1101) (animais inoculados com consórcio de patógenos periodontais e probiótico *B. breve* 1101 A), P-B+(1622) (animais inoculados apenas com probiótico *B. bifidum* 1622 A), P+B+(1622) (animais inoculados com consórcio microbiano e probiótico *B. bifidum* 1622 A). Na estratégia utilizada para análises selecionamos a população de linfócitos, em seguida selecionamos as células vivas. Após a seleção da população utilizamos os filtros para determinar as células CD45+ CD3+ CD4+ (Figura 4.7), em seguida analisamos,

dentro da população duplo positiva para linfócitos Th, as células Treg (FOXP3⁺) e Th17 (RORγt⁺). Pela escassez de tecido gengival, as amostras foram analisadas em pool do tecido gengival de 4 animais de cada grupo, sendo realizados 2 pools de células de 4 animais, totalizando a análise do tecido gengival de 8 animais.

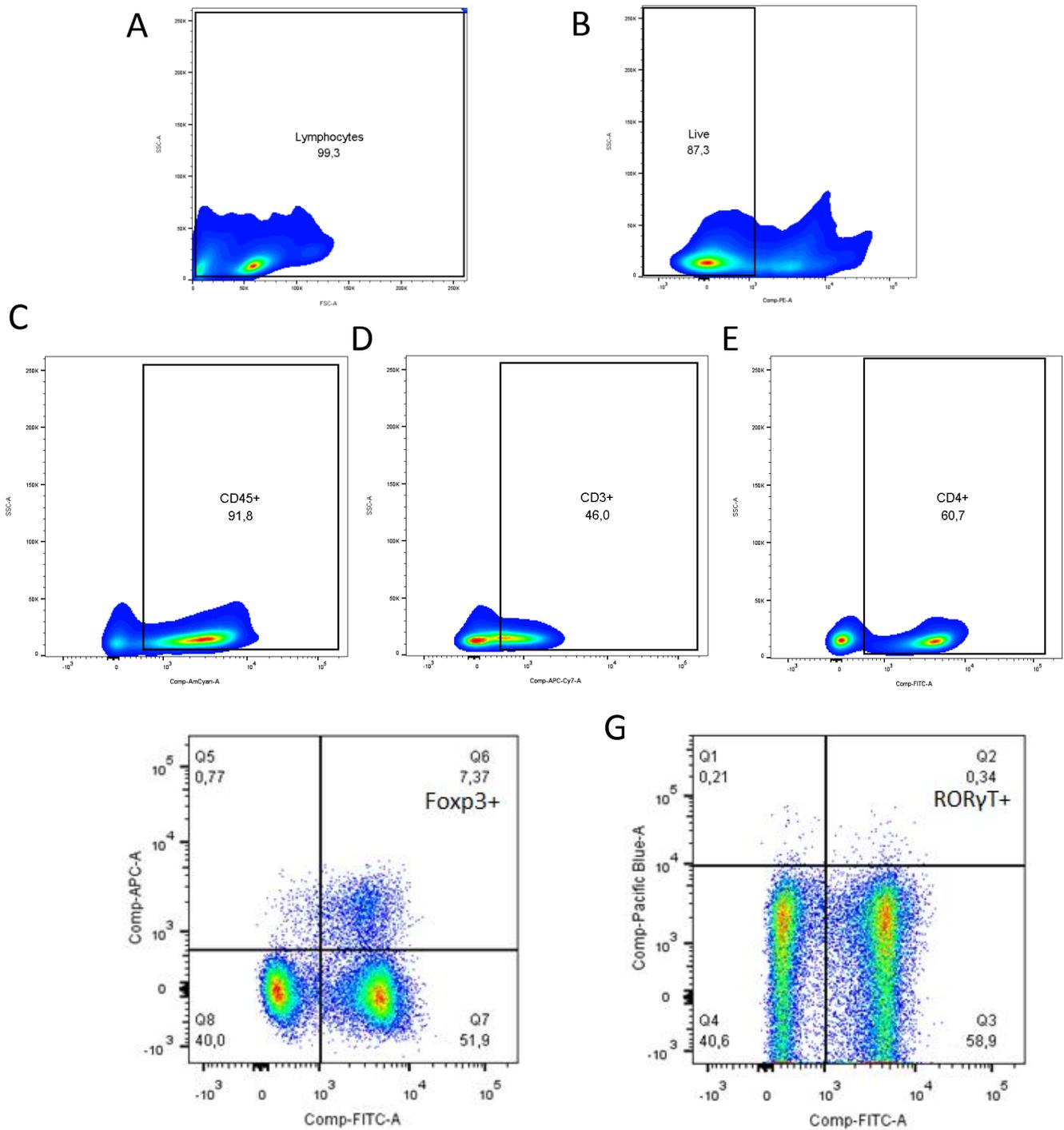
Observamos, em amostras de tecido gengival (figuras 4.8 e 4.9), que o consórcio microbiano [grupo P+B-] não induziu alteração na proporção de células Treg, ou Th17 em relação ao SHAM. Os grupos que receberam a cepa *B. breve* 1101A na presença [P+B+ (1101)] e ausência do consórcio microbiano [P-B+ (1101)], mas não os grupos que receberam *B. bifidum* 1622A, apresentaram maior proporção de células Th17 em relação ao SHAM e ao grupo P+B-. Por outro lado, ambos os probióticos *B. breve* 1101A e *B. bifidum* 1622A [grupos P-B+ (1101), P+B+ (1101), P-B+ (1622) e P+B+ (1622)] não levaram alteração na frequência de Treg em relação SHAM e ao grupo P+B-.

Em amostras de baço não houve diferença na frequência de Treg ou de Th17 no grupo P+B- em relação ao SHAM (figura 4.10 e 4.11). Porém ambos probióticos inoculados sozinhos ou concomitantes ao consórcio microbiano [grupos P-B+ (1101), P+B+ (1101), P-B+ (1622) e P+B+ (1622)] levaram a uma redução na frequência de Treg e ao aumento na frequência de Th17 em relação ao SHAM e ao grupo P+B-.

Não houve diferenças na frequência de Treg e Th17 para o grupo P+B- em amostras de linfonodos em relação ao grupo SHAM (figura 4.11 e 4.12). Ambos probióticos inoculados sozinhos ou concomitantes ao consórcio microbiano [grupos P-B+ (1101), P+B+ (1101), P-B+ (1622) e P+B+ (1622)] não levaram a alterações nas frequências de Treg e Th17 em relação ao SHAM e ao grupo P+B-.

Em resumo, a inoculação de *B. breve* 1101A isoladamente ou associado ao consórcio microbiano levou ao aumento de Th17 no tecido gengival e no baço, além disso, levou a uma redução de Treg no baço. Por outro lado, o probiótico *B. bifidum* 1622A também induziu a redução de Treg e aumento da proporção de Th17 no baço, mas não alterou o fenótipo de Treg e Th17 no tecido gengival.

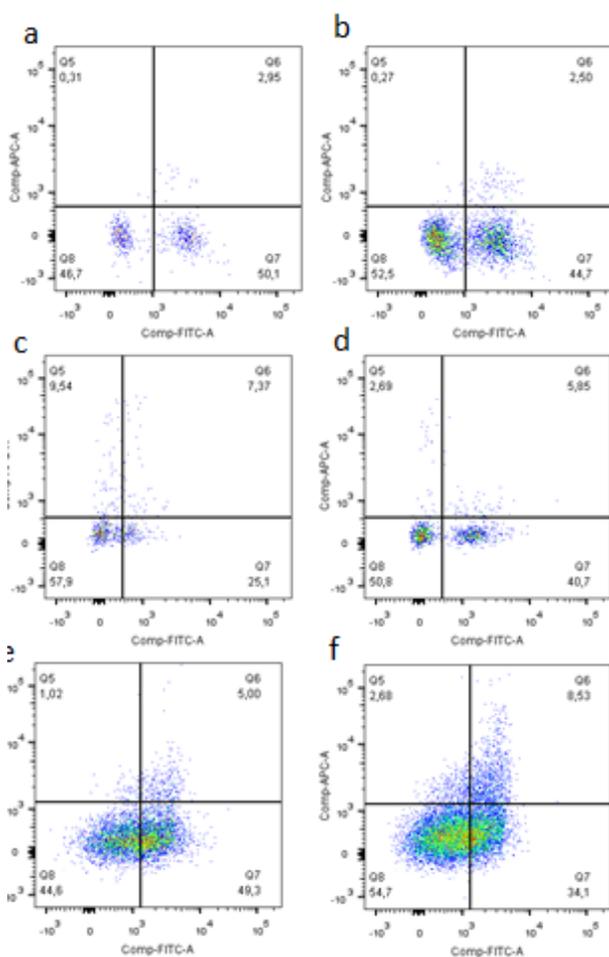
Figura 4.7 - Estratégia empregada para determinação das subpopulações de linfócitos em tecido gengival, baço, e linfonodos. Após a seleção dos linfócitos pelo tamanho e granulação (Figura 4.7 A), as células mortas e debris foram excluídas da análise (Figura 4.7 B). As células foram coradas para múltiplos marcadores de superfície para caracterizar linfócitos T auxiliares ($CD45^+ CD3^+ CD4^+$) (Figuras 4.7 C, D e E), e determinada a população de linfócitos Treg (Figura 4.7 F) pela determinação da expressão do fator de transcrição p3 ($FOXP3^+$) e de Linfócitos Th17 (Figura 4.7 G) pela expressão de $ROR\gamma T$.



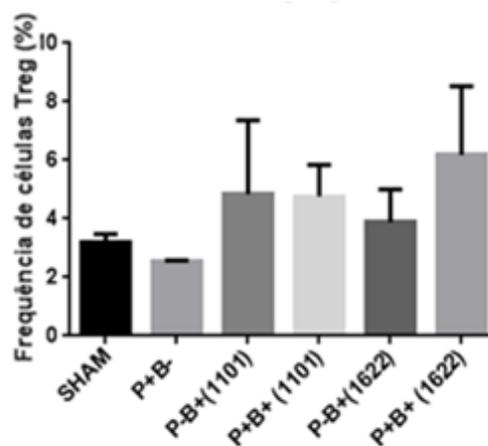
Fonte: O autor

Figura 4.8. Determinação da população Treg em tecido gengival de camundongos C57BL6 dos grupos controle (SHAM Figura 4.8 A a) e dos grupos submetidos a inoculação com consórcio microbiano (P+B- figura 4.8 A b) e tratados com os probióticos P- B+ (1101) (animais inoculados apenas com probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.8 A c), P+ B+ (1101) (animais inoculados com consórcio de patógenos periodontais e probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.8 A d), P-B+ (1622) (animais inoculados apenas com probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.8 A e), P+B+ (1622) (animais inoculados com consórcio microbiano e probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.8 A f). Em 4.7 A. Representação de um experimento para determinação da subpopulação de linfócitos T reg (Foxp3+). A porcentagem de células expressando o fator de transcrição Foxp3 e mostrada em cada condição. Em figura 4.8 B. Expressão de linfócitos T reg (Foxp3+) a partir dos dados obtidos com análises em dois ensaios, cada um formado com tecido gengival de três animais. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), # diferença estatisticamente significativa em relação ao P+B-, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$

A



B

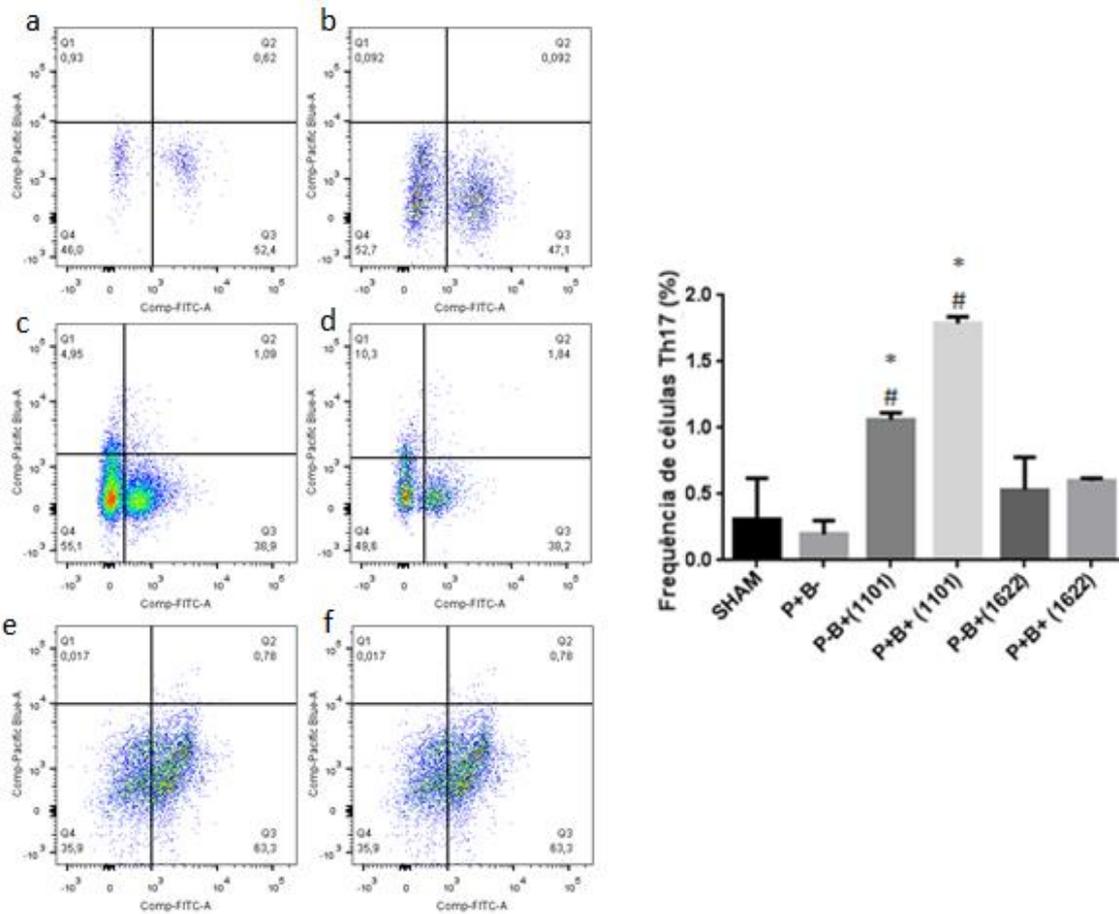


Fonte: O autor

Figura 4.9. Determinação da população Th17 em tecido gengival de camundongos C57BL6 dos grupos controle (SHAM Figura 4.9 A a) e dos grupos submetidos a inoculação com consórcio microbiano (P+B- Figura 4.9 A b) e tratados com os probióticos P- B+ (1101) (animais inoculados apenas com probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.9 A c), P+ B+ (1101) (animais inoculados com consórcio de patógenos periodontais e probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.9 A f), P- B+ (1622) (animais inoculados apenas com probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.9 A e), P+ B+ (1622) (animais inoculados com consórcio microbiano e probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.9 A f). Em 4.8 A. Representação de um experimento para determinação da subpopulação de linfócitos T reg (Foxp3+). A porcentagem de células expressando o fator de transcrição Foxp3 e mostrada em cada condição. Em figura 4.9 B. Expressão de linfócitos T reg (Foxp3+) a partir dos dados obtidos com análises em dois ensaios, cada um formado com tecido gengival de três animais. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), # diferença estatisticamente significativa em relação ao P+B-, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$

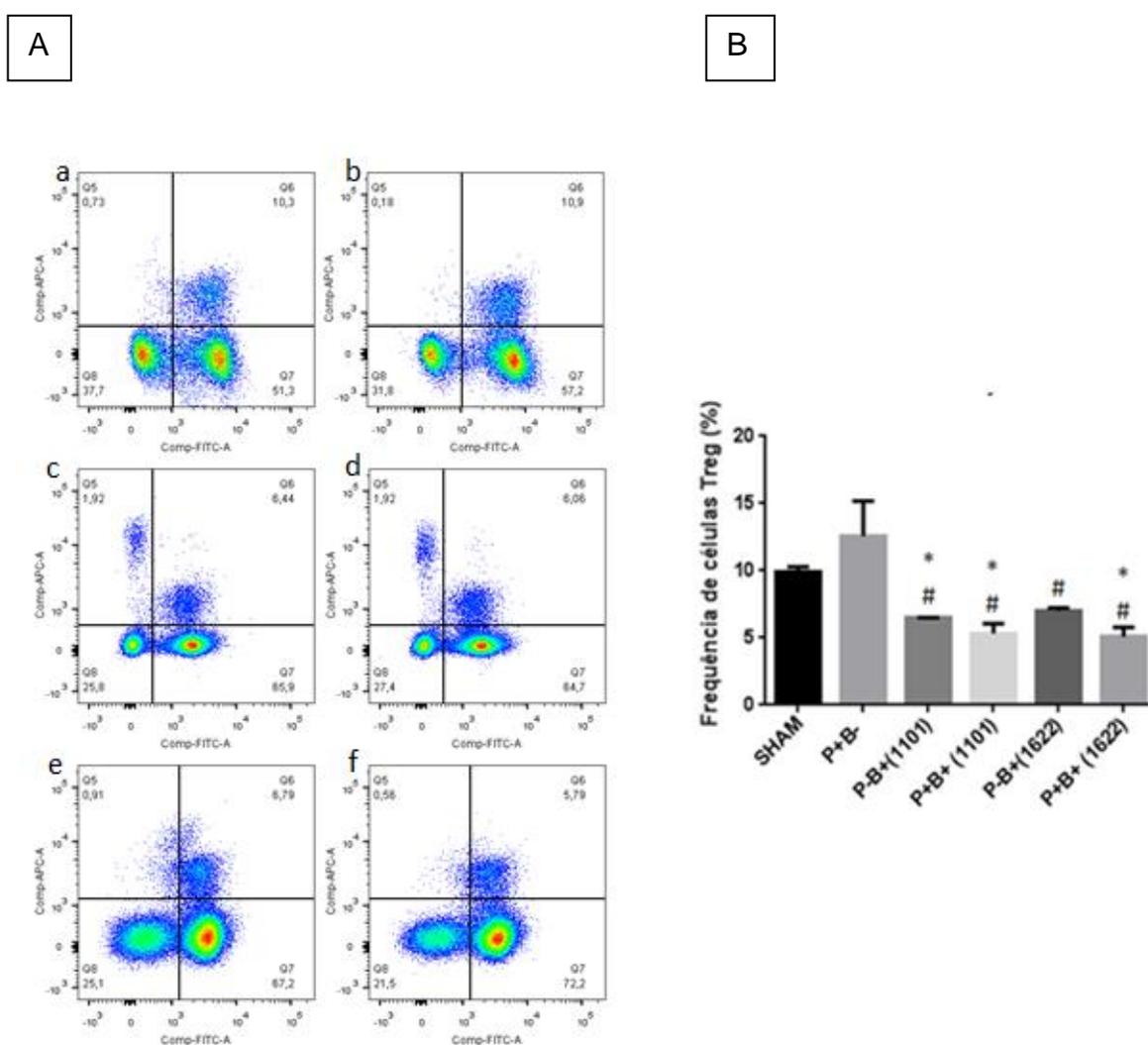
A

B



Fonte: O autor

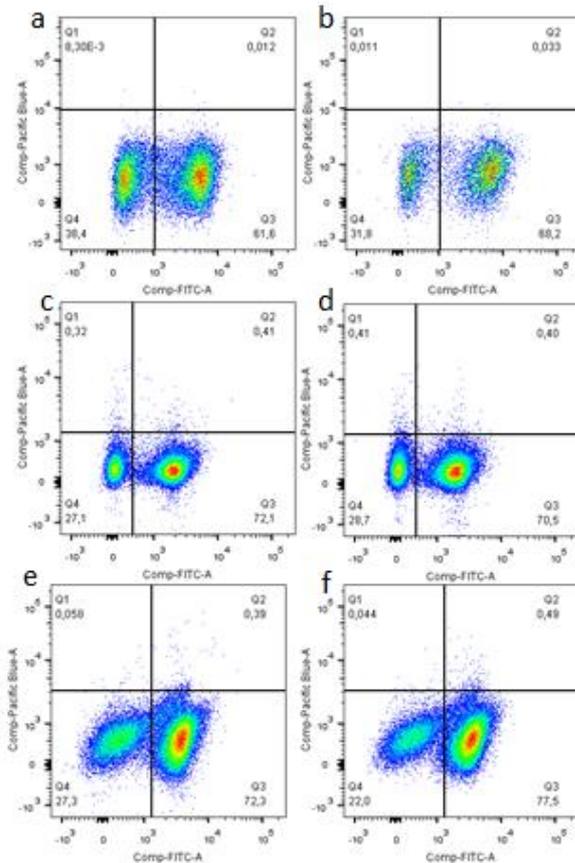
Figura 4.10. Determinação da população Treg em baço de camundongos C57BL6 dos grupos controle (SHAM Figura 4.10 A a) e dos grupos submetidos a inoculação com consórcio microbiano (P+B- Figura 4.10 A b) e tratados com os probióticos P- B+ (1101) (animais inoculados apenas com probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.10 A c), P+ B+ (1101) (animais inoculados com consórcio de patógenos periodontais e probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.10 A d), P-B+ (1622) (animais inoculados apenas com probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.10 A e), P+B+ (1622) (animais inoculados com consórcio microbiano e probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.10 A f). Em 4.9 A. Representação de um experimento para determinação da subpopulação de linfócitos T reg (Foxp3+). A porcentagem de células expressando o fator de transcrição Foxp3 e mostrada em cada condição. Em figura 4.10 B. Expressão de linfócitos T reg (Foxp3+) a partir dos dados obtidos com análises em dois ensaios, cada um formado com tecido gengival de três animais. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), # diferença estatisticamente significativa em relação ao P+B-, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$



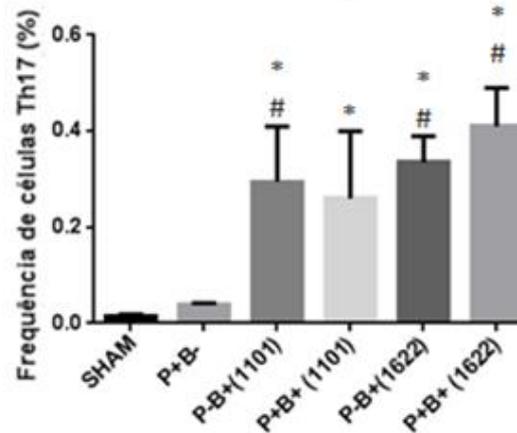
Fonte: O autor

Figura 4.11. Determinação da população Th17 em baço de camundongos C57BL6 dos grupos controle (SHAM Figura 4.11 A a) e dos grupos submetidos a inoculação com consórcio microbiano (P+B- Figura 4.11 A b) e tratados com os probióticos P- B+ (1101) (animais inoculados apenas com probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.11 A c), P+ B+ (1101) (animais inoculados com consórcio de patógenos periodontais e probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.11 A d), P-B+ (1622) (animais inoculados apenas com probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.11 A e), P+B+ (1622) (animais inoculados com consórcio microbiano e probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.11 A f). Em 4.10 A. Representação de um experimento para determinação da subpopulação de linfócitos T reg (Foxp3+). A porcentagem de células expressando o fator de transcrição Foxp3 e mostrada em cada condição. Em figura 4.11 B. Expressão de linfócitos T reg (Foxp3+) a partir dos dados obtidos com análises em dois ensaios, cada um formado com tecido gengival de três animais. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), # diferença estatisticamente significativa em relação ao P+B-, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$

A

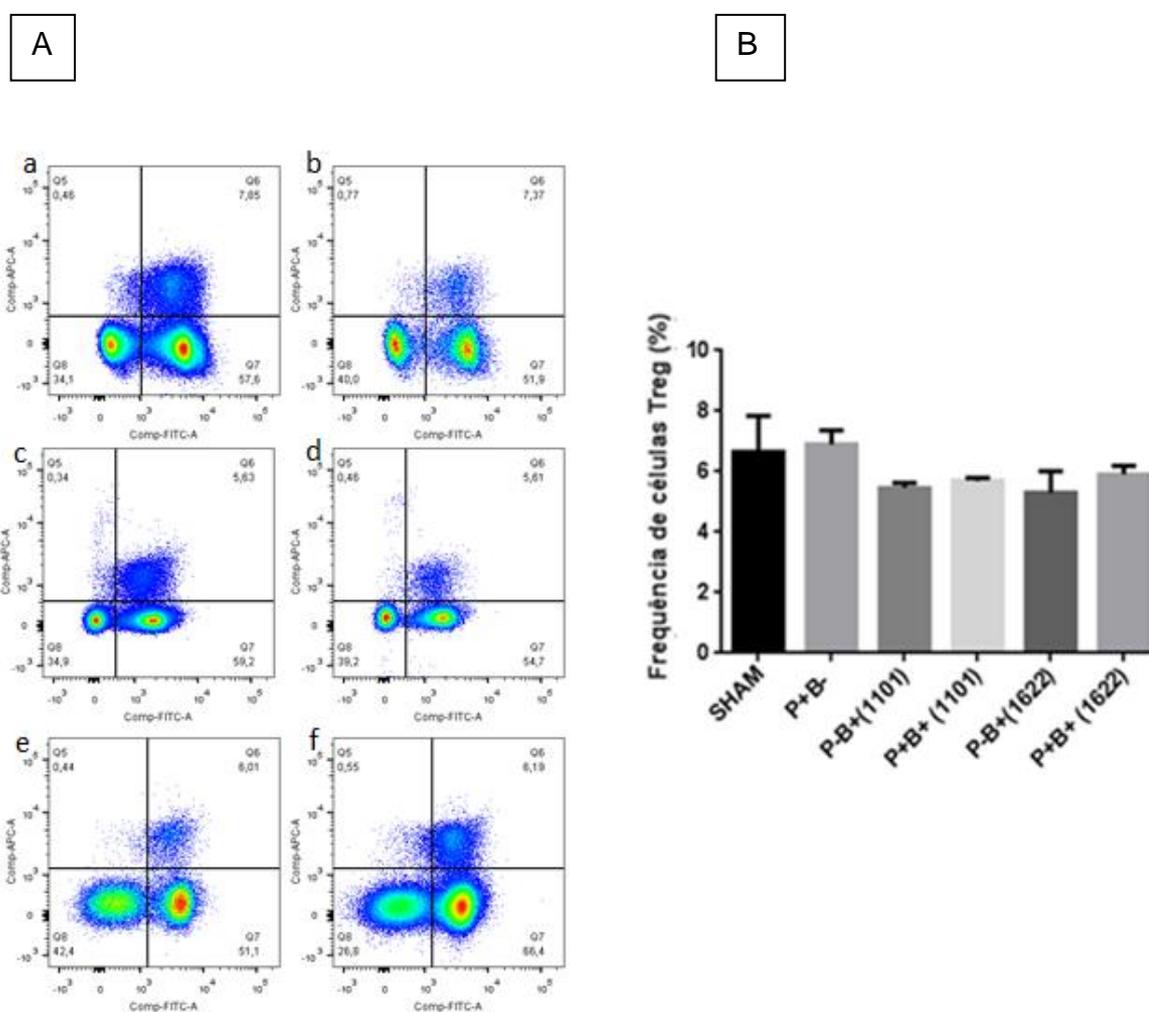


B



Fonte: O auto

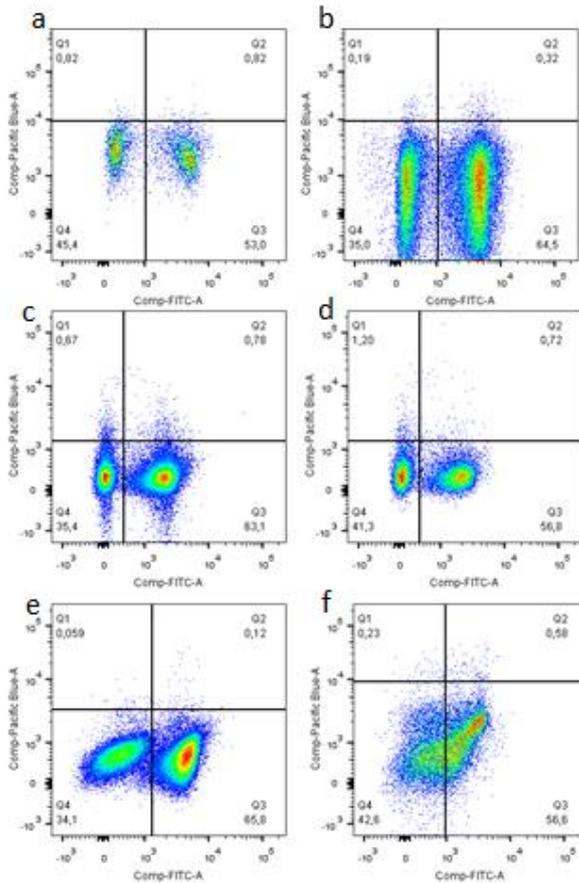
Figura 4.12. Determinação da população Treg em linfonodo de camundongos C57BL6 dos grupos controle (SHAM Figura 4.12 A a) e dos grupos submetidos a inoculação com consórcio microbiano (P+B- Figura 4.12 A b) e tratados com os probióticos P- B+ (1101) (animais inoculados apenas com probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.12 A c), P+ B+ (1101) (animais inoculados com consórcio de patógenos periodontais e probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.12 A d), P-B+ (1622) (animais inoculados apenas com probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.12 A e), P+B+ (1622) (animais inoculados com consórcio microbiano e probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.12 A f). Em 4.11 A. Representação de um experimento para determinação da subpopulação de linfócitos T reg (Foxp3+). A porcentagem de células expressando o fator de transcrição Foxp3 e mostrada em cada condição. Em figura 4.12 B. Expressão de linfócitos T reg (Foxp3+) a partir dos dados obtidos com análises em dois ensaios, cada um formado com tecido gengival de três animais. Não há diferenças estatísticas entre os grupos -, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$.



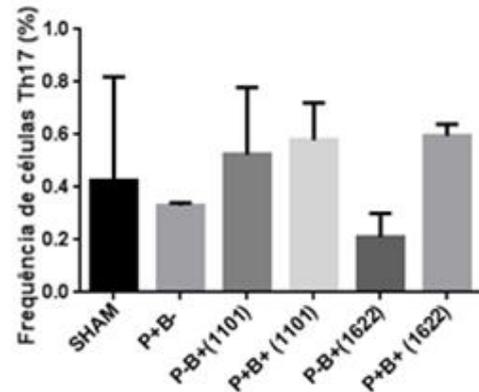
Fonte: O autor

Figura 4.13. Determinação da população Th17 em linfonodo de camundongos C57BL6 dos grupos controle (SHAM Figura 4.13 A a) e dos grupos submetidos a inoculação com consórcio microbiano (P+B- Figura 4.13 A b) e tratados com os probióticos P- B+ (1101) (animais inoculados apenas com probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.13 A c), P+ B+ (1101) (animais inoculados com consórcio de patógenos periodontais e probiótico *B. breve* 1101 A Figura 4.13 A d), P-B+ (1622) (animais inoculados apenas com probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.13 A e), P+B+ (1622) (animais inoculados com consórcio microbiano e probiótico *B. bifidum* 1622 Figura 4.13 A f). Em 4.12 A. Representação de um experimento para determinação da subpopulação de linfócitos T reg (Foxp3+). A porcentagem de células expressando o fator de transcrição Foxp3 e mostrada em cada condição. Em figura 4.13 B. Expressão de linfócitos T reg (Foxp3+) a partir dos dados obtidos com análises em dois ensaios, cada um formado com tecido gengival de três animais. Não há diferenças estatísticas entre os grupos -, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$.

A



B

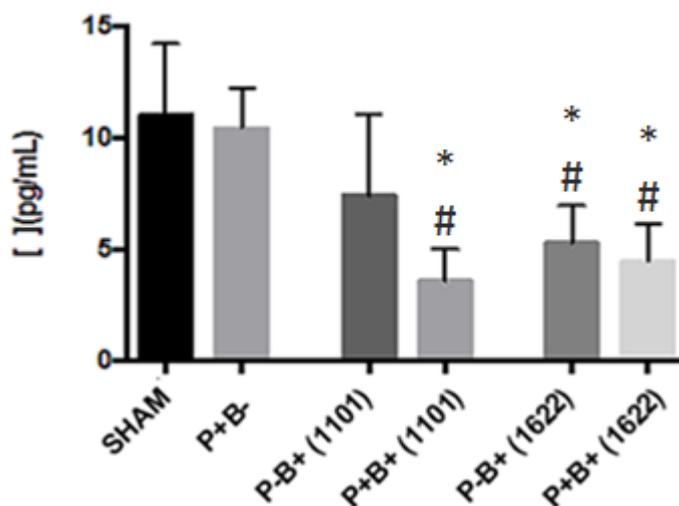


Fonte: O autor

4.7 Determinação dos níveis séricos de citocinas

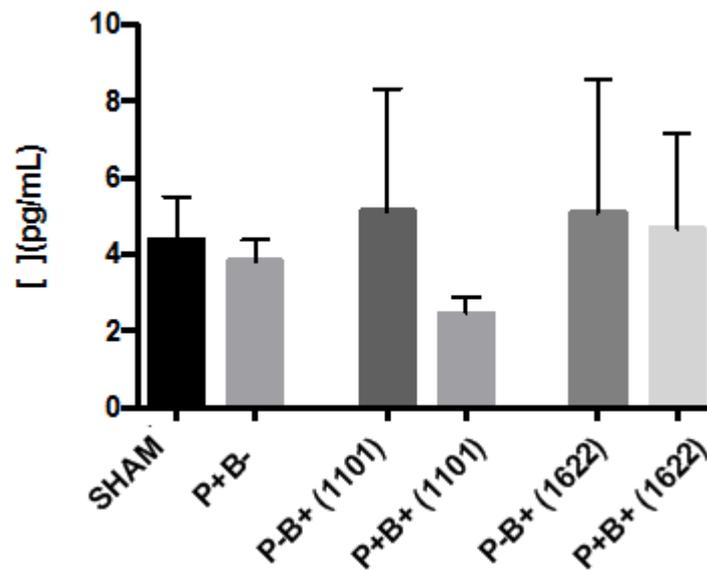
A análise de citocinas séricas por ELISA revelou que não há diferenças nos níveis de IL-10 entre animais dos grupos SHAM e P+B-. No entanto, diferindo do esperado, os probióticos induziram redução nos níveis desta citocina imunoregulatória, particularmente naqueles grupos inoculados também com os patógenos (Figura 4.15). Por outro lado, não houve diferença nos níveis séricos de TNF- α entre os grupos (Figura 4.15).

Figura 4.14 - Nível sérico de IL-10 avaliado em amostras de soro, por ELISA, dos diferentes grupos: SHAM (controle negativo), P+ (inoculados com consórcio microbiano), P-B+ (1101) (inoculado com o probiótico *B. breve* 1101A), P+B+ (1101) (consórcio + probiótico), P-B+ (1622) (inoculado com o probiótico *B.bifidum* 1622A) e P+B+ (1622) (consórcio + probiótico). As amostras foram obtidas do após a eutanásia, ao término do período experimental de 45 dias. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (SHAM), # diferença estatisticamente significativa em relação ao P+B-, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$



Fonte: O autor

Figura 4.15 - Nível sérico de TNF- α avaliado em amostras de soro, por ELISA, dos diferentes grupos: SHAM (controle negativo), P+ (inoculados com consórcio microbiano), P-B+ (1101) (inoculado com o probiótico *B. breve* 1101A), P+B+ (1101) (consórcio + probiótico), P-B+ (1622) (inoculado com o probiótico *B.bifidum* 1622A) e P+B+ (1622) (consórcio + probiótico). As amostras foram obtidas do após a eutanásia, ao término do período experimental de 45 dias. Não há diferenças entre os grupos, ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$



Fonte: O autor

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, optamos por utilizar um modelo de periodontite experimental induzida por um consórcio bacteriano de isolados humanos, formado por *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *S. gordonii*. Como *P. gingivalis* é um colonizador tardio do biofilme dental, considera-se que a colonização com outros microrganismos favoreceria a colonização pelo patógeno (32).

O emprego de camundogos C57BL/6 infectados por via oral com *P. gingivalis* é um modelo atualmente utilizado em vários estudos. A periodontite experimental promovida por *P. gingivalis* foi demonstrada por vários métodos, como o uso de ligadura infectada com *P. gingivalis* (110–115), o uso de produtos de *P. gingivalis* como a gingipaína (116) ou LPS, e o uso de células vivas de *P. gingivalis* (38,117–120). Optamos por utilizar células vivas de *P. gingivalis*, pois os dados prévios de nosso grupo demonstraram que os probióticos inibem a adesão e invasão de *P. gingivalis* em células epiteliais (97), afetam a formação de biofilme de *P. gingivalis* e alteram a expressão de fatores de virulência (ISHIKAWA et al. dados não publicados). Além disso, o modelo empregado se aproximaria mais da realidade, onde o patógeno coloniza a cavidade oral, e desenvolve a periodontite em ação sinérgica com outros microrganismos (121).

Nossos dados mostraram que o modelo proposto para a indução da doença periodontal em animais foi eficiente para induzir reabsorção do osso alveolar com perda de cerca de 20% do volume ósseo nos animais inoculados com o consórcio de patógenos periodontais, corroborando com os dados presentes na literatura onde a inoculação oral com patógenos periodontais como *P. gingivalis* e *F. nucleatum* levaram a perda óssea em camundongos (38), assim como a inoculação de *P. gingivalis* apenas (36,122). Outros estudos de indução da doença periodontal experimental adicionam ao consórcio microbiano *P. intermedia* (123) e *S. gordonii* (111,124). Em estudo recente neste laboratório, a infecção oral experimental por *P. gingivalis* fimbriada, associada a *P. intermedia* 17, que apresenta alta capacidade de agregação a *P. gingivalis in vitro* (32), induziu maior destruição periodontal em camundongos C57BL/6 do que quando uma das espécies foi inoculada separadamente (SIMIONATO, et al., dados não publicados).

No presente estudo, a análise de *P. gingivalis* em biofilme dental não revelou a presença de *P. gingivalis*. Estes dados sugerem que a colonização persistente por *P. gingivalis* não foi atingida na cavidade oral dos animais. Além disso, esta espécie não foi detectada nas fezes ou no baço. Porém, os dados sugerem que o probiótico *B. breve* 1101A favoreceu a colonização de *P. gingivalis* no fígado. A saliva deglutida por pacientes com periodontite contem cerca de 10^9 bactérias / ml, em 1,0-1,5 L / dia, perfazendo um total superior a 10^{12} bactérias / dia (117). Organismos orais são deglutidos e poderiam ultrapassar a barreira intestinal, sendo transportados via hematogênica dentro de células imunes e assim como causar alterações inflamatórias a distância (125). Além disso, a exposição a patógenos no interior da bolsa periodontal pode propiciar as condições para a disseminação microbiana via hematogênica. Estudos experimentais prévios mostraram que a administração oral de *P. gingivalis* foi capaz de causar alterações na expressão gênica e níveis de citocinas no fígado (120,126), além de induzir aumento da concentração de lipídios em hepatócitos e aumento nos níveis de triglicérides (117). Apesar disso, a literatura mostra que não há diferenças significativas no microbioma do fígado entre os animais inoculados e controle não infectados (127). A colonização persistente do intestino por *P. gingivalis*, por outro lado, não foi ainda relatada. *P. gingivalis* foi detectado no conteúdo jejunal, ileal, e colônico em períodos até 16 horas após uma única administração oral do microrganismo, mas não após 24 horas em um estudo de 5 semanas (117). Outros estudos também indicaram que *P. gingivalis* não é encontrado nas fezes dos animais infectados oralmente com este microorganismo (120,127).

A maioria dos estudos utilizando modelos animais não mostra um alto nível de colonização persistente por *P. gingivalis* na cavidade oral, e ainda não há um protocolo padronizado que propicie esta colonização similar ao que ocorre no homem. A diferença mais dramática no protocolo entre nossos dados e outros estudos reside no período entre a última inoculação e a eutanásia. Em muitos estudos, este período não é superior a um dia (117,120), mas existem relatos de 2 semanas (128). O número de inoculação diárias varia de 1 (120) a três vezes ao dia (128), e os intervalos entre as inoculações variam consideravelmente, de inoculações diárias (129) a 2 vezes por semana (117). No entanto, embora a perda óssea e os parâmetros imunológicos tenham sido observados nesses estudos, os

níveis de colonização por *P. gingivalis* não foram relatados (38,113,114,117,120,128,130).

O presente modelo de indução de periodontite é ainda pouco estudado, e apresenta muitas diferenças em relação a outros modelos, particularmente aqueles que utilizam ligadura, por um curto espaço de tempo. O modelo por ligadura propõe indução da doença periodontal por meio do acúmulo de bactérias em torno do fio utilizado na ligadura (131), e o acúmulo microbiano leva a reabsorção óssea alveolar e alterações no sistema imune, em 7 a 14 dias, sendo o reparo observado após a remoção da ligadura.

P. gingivalis não é capaz de colonizar animais livres de germes indicando a necessidade de uma microbiota residente para estabelecer a doença (117). Por outro lado, vários estudos relataram que a reabsorção óssea alveolar foi obtida quando os animais receberam tratamento antimicrobiano antes da infecção (38,118,119,132), indicando a resiliência da microbiota residente ao agente microbiano exógeno. Os mecanismos de probióticos para reduzir a perda óssea alveolar em camundongos com periodontite experimental ainda não estão bem elucidados. Um estudo recente, mostrou que o grupo de camundongos com periodontite induzida por inoculação oral de *P. gingivalis* e o probiótico *L. salivarius* apresentou menor perda óssea alveolar do que os controle com periodontite (120). Outros estudos, realizados em ratos com doença periodontal induzida por ligadura sugerem que cepas probióticas de *B. animalis* foram capazes de reduzir a perda óssea nestes animais, além de reduzir os níveis de IL-1 β e RANK-L no tecido gengival e aumentar os níveis de IL-10 e OPG nos animais com doença periodontal inoculados com probióticos (81,82).

No presente estudo foi realizada a análise da expressão gênica em tecido gengival entre os grupos avaliados (SHAM, controle positivo, probiótico *B. breve* 1101A, probiótico *B. bifidum* 1622A, periodontite + probiótico *B. breve* 1101A, periodontite + probiótico *B. bifidum* 1622A), avaliando-se a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de receptores para PAMPS.

IL-1 β e IL-18 diferem das demais citocinas pro-inflamatórias, porque são expressas como pro-IL-1 β e pro-IL-18, e devem ser processadas por caspase 1 para serem convertidas em citocinas maduras. A ativação de caspase 1 é dependente da ativação de inflamassoma, um complexo composto pela caspase 1, pelo receptor intracitoplasmático NLR e por uma proteína adaptadora ASC. A ativação dos

inflamassomas pode ter um papel benéfico, colaborando com a manutenção da homeostase, e é relevante no controle de patógenos (133,134), mas a desregulação da ativação dos inflamassomas pode levar à exacerbação de sintomas em doenças infecciosas e é relacionada à patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias (135). Na periodontite, a destruição dos tecidos é associada à regulação positiva de receptores associados ao inflamassoma como NLRP3 e AIM2 (55), e da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-17 (54). Por outro lado, a capacidade de ativação de inflamassoma por *P. gingivalis* é ainda controversa. Enquanto alguns estudos indicam que o organismo induz inflamassoma dependente de NLRP3 e AIM2 (136), outros dados indicam que *P. gingivalis* é capaz de inibir a indução do inflamassoma, induzido por outros microrganismos como *F. nucleatum*, o que consistiria em um importante fator de evasão das defesas deste periodontopatógeno (59). Estes dados contraditórios se relacionam a diferentes produtos de *P. gingivalis*. Estudo *in vitro* mostrou que produtos secretados por *P. gingivalis* são capazes de induzir o inflamassoma, mas gingipaínas são capazes de degradar caspase 1 ativa, inativando os inflamassomas. Além disso, estas proteases também degradam outros produtos como IL-1 β madura e TNF- α (137). Por outro lado, a monoinoculação de *P. gingivalis* foi capaz de induzir a expressão de pro-IL-1 β , pro-IL-18, e RANKL, e de ativar o inflamassoma NLRP3 dependente em tecido gengival, em modelo experimental murino (138). Em macrófagos humanos da linhagem THP-1, a síntese de IL-1 β é 10X maior quando estas células, ativadas ou não com LPS de *E. coli*, são infectadas pela cepa W83 do que pela cepa ATCC 33277. No presente estudo, ambas as cepas de *P. gingivalis* foram utilizadas, procurando mimetizar o que ocorre no homem, onde foi demonstrada a colonização por múltiplas cepas deste patógeno (104,139).

Os nossos dados sugerem que, apesar da perda óssea observada no grupo P+B-, não foi observado ao final do período experimental, o aumento da expressão de *il-1 β* nem de *tnf- α* neste grupo em relação ao controle. No presente estudo foram inoculadas duas cepas de *P. gingivalis*, W83 e ATCC 3377, que apresentam diferenças nos mecanismos associados a virulência. Estudo anterior relatou que a cepa W83 não foi capaz de regular positivamente a expressão relativa de *TNF- α* e *IL-1 β* no tecido gengival de camundongos (120). Por outro lado, nossa observação pode ser devida à finalização do uso do consórcio microbiano 12 dias antes da eutanásia, mas também poderia representar um controle exercido por *P. gingivalis*,

cuja serino-fosfatase serB degrada componentes associados a ativação da via do NF-kappaB (125).

Por outro lado, nossos dados indicam que o probiótico *B. breve* 1101A foi capaz de regular positivamente a expressão de *il1-β* e *tnf-α* no tecido gengival (Figura 4.4), e que esta regulação positiva foi observada mesmo no tecido gengival dos animais que receberam o consórcio microbiano. Estes dados estão de acordo com dados prévios de nosso grupo em que *B. breve* 1101A, mas não *B. bifidum* 1622A induz a expressão de *il-1β* e *tnfα* em macrófagos ativados com PMA ou com *P. gingivalis* ATCC 33277 ou *P. gingivalis* W83. Outras cepas probióticas, como *L. salivarius* também são capazes de aumentar os níveis de *il1-β* e de não alterar os níveis de *tnf-α* (120). Além disso, estudos utilizando a cepa probiótica *B. animalis* demonstraram níveis elevados de IL1-β em amostras de tecido gengival de ratos com doença periodontal induzida por ligadura (81,82). Deve ser destacado, no entanto, que nestes estudos não houve a inoculação de *P. gingivalis*, cujas gingipaínas são capazes de degradar estas citocinas(140–142). Assim, os dados aqui demonstrados de que *B. breve* 1101A levou a regulação positiva de *il-1β* e de *nrlp3* nos tecidos gengivais são consistentes, e sugerem que esta cepa é capaz de ativar o inflamassoma. Além disso, a adição do consórcio contendo as duas cepas de *P. gingivalis* foi capaz de reduzir a expressão de *il-1β* induzida pelo probiótico. No entanto, apenas com a análise dos níveis desta citocina nos tecidos gengivais, além da análise em outros períodos experimentais, como imediatamente após o término das inoculações com o consórcio, conclusões definitivas poderão ser obtidas.

A análise da expressão de genes codificando receptores TLR no tecido gengival dos animais dos diferentes grupos revelou regulação positiva na expressão de *tlr2* induzida pelo probiótico *B. breve* 1101A, e regulação positiva de *tlr4*, principalmente nos grupos que receberam consórcio microbiano e probióticos (Figura 4.6) .

TLR4 é capaz de reconhecer o LPS de bactérias Gram negativas, em conjunto com o CD14 e MD2 (49). No entanto, o LPS de *P. givalivalis* ativa TLR2 e não o TLR4, como a maioria dos LPS de organismos Gram negativos (125,143). Por outro lado, outros estudos revelam que embora FimA, a fímbria principal, e o LPS de *P. gingivalis* possam ser reconhecidos por TLR2 (144), as células vivas são reconhecidas por TLR2 e TLR4 (57,145,146). Um estudo recente (147) mostrou

também o reconhecimento de FIMA por TLR4, e que este desencadeia a cascata de produção de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-6 e metaloproteases.

TLR2 reconhece peptidoglicano e ácido lipoteicóico, que estão presentes na membrana celular das bactérias Gram-positivas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (148). Conseqüentemente, camundongos deficientes em TLR2 são altamente sensíveis à infecção por bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (149). O mecanismo pelo qual o TLR2 reconhece uma variedade de componentes bacterianos pode ser parcialmente representado pela associação do TLR2 ao TLR1 e TLR6 (150,151). O reconhecimento por TLR2 via MyD88 leva a produção de TNF- α através da ativação da via NF- κ B (152). Estudos recentes mostram que a combinação de probiótico *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* leva ao aumento na expressão de TLR2 em células de colón humano (153). Cepas probióticas são capazes de regular positivamente a produção de CXCL-8 via reconhecimento do ácido teicóico por TLR2, levando a ativação de NF- κ B em macrófagos humanos (154)

TLR4 é detectado no tecido gengival em queratinócitos e fibroblastos sendo que a expressão de TLR4 no epitélio gengival atinge seus níveis mais baixos no epitélio juncional (155). Patógenos periodontais são capazes de alterar a sinalização celular por meio de receptores TLR e conseqüentemente alterar o perfil inflamatório do hospedeiro. É interessante notar que a capacidade de ativar TLR2 ou TLR4 e de 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 a doença foi agonista deste receptor (156). Foi demonstrado que *P. gingivalis* é capaz de alterar a expressão de TLR2 e TLR4 em outras condições sistêmicas como a aterosclerose associada a doença periodontal. Animais inoculados com *P. gingivalis* regulam positivamente a expressão desses receptores em amostras de aorta, demonstrando mais uma vez o efeito a distância a *P. gingivalis* e sua capacidade de regular a expressão de genes associados com a resposta inflamatória (126). *P. gingivalis* é capaz de alterar a sinalização por meio do receptor TLR2 em neutrófilos, alterando a sua capacidade fagocítica e assim promovendo a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (57). Portanto, seria esperado aumento da expressão de TLR4 nos grupos inoculados com consórcio de patógenos periodontais, como observado (Figura 4.6). No entanto, observamos um aumento ainda mais expressivo

na expressão de *tlr4* nos grupos inoculados com o consórcio microbiano e os probióticos *B. breve* 1101A, ou *B. bifidum* 1622A. Assim, o aumento da expressão de *tlr4* no tecido gengival de animais que receberam o consórcio microbiano induzido pelos probióticos poderia favorecer o reconhecimento dos patógenos, favorecendo em um primeiro momento a destruição tecidual, mas por outro lado esta regulação poderia favorecer a eliminação dos patógenos.

Quando comparados os dados de expressão gênica nos animais com dados *in vitro* produzidos no mesmo laboratório, pudemos observar que tanto o probiótico *B. breve* 1101A quanto o probiótico *B. bifidum* 1622A foram capazes de reduzir a adesão e a invasão de *P. gingivalis* em células epiteliais, assim como foram capazes de reduzir a formação de biofilme multiespécie (formado por *P. gingivalis*, *S. gordonii* e *S. oralis*). Os dados de expressão gênica mostraram que em co-cultivo de *P. gingivalis* com os probióticos foram capazes de aumentar a expressão de *il1- β* , *tnf- α* , *tlr2*, *tlr4* em células epiteliais (97). Porém em todas as análises, foram observadas diferenças na ativação do sistema imune e no efeito dos probióticos em relação a cepa alvo de *P. gingivalis*.

Probióticos do gênero *Lactobacillus* e do gênero *Bifidobacterium* são capazes de produzir ácido lático que estimula a expressão de TLR4, mas não alteram a expressão de TLR2 em macrófagos humanos (157). Por outro lado quando testado em células tronco gengivais, os probióticos do gênero *Lactobacillus* induziram aumento na expressão de TLR2 e TLR4 quando co-cultivadas com as células, enquanto na presença de *P. gingivalis* houve uma redução da expressão de TLR2 e TLR4 (158). Nossos dados apontam que o *B. breve* 1101A é capaz de aumentar a expressão de TLR2 quando inoculado isoladamente, sugerindo que possa ser devido a ação de produção de ácido lático, porém este comportamento não é observado para a cepa *B. bifidum* 1622A. Em contrapartida ambos probióticos quando inoculados com o consórcio microbiano induziram aumento na expressão de TLR4, sugerindo uma ação sinérgica do LPS bacteriano e o ácido lático produzido pelos probióticos.

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa semi-específica e fornece a resposta inicial do hospedeiro a lesões teciduais, traumas e patógenos (159). A imunidade inata ativa a imunidade adaptativa e ambas agem altamente reguladas juntas para estabelecer e manter a homeostase tecidual. Qualquer desregulação dessa interação pode resultar em inflamação crônica e auto-imunidade

e é considerada uma das principais causas associadas ao início e progressão de doenças inflamatórias mediadas por imune altamente prevalentes, como a periodontite (160,161).

Os linfócitos T reguladores (Tregs) desempenham um papel fundamental no controle homeostático da resposta imunoinflamatória do hospedeiro, suprimindo a proliferação e produção de citocinas das células T efetoras, principalmente os linfócitos T auxiliares (Th) 1 e Th17 (62). No entanto, seu papel durante a patogênese da periodontite não foi totalmente esclarecido. De fato, a escassez de evidências humanas, bem como a heterogeneidade entre diferentes modelos animais que avaliam o papel dos Tregs durante a patogênese da periodontite, dificultam a interpretação precisa de sua função e seu potencial para suprimir a reabsorção óssea alveolar imune-inflamatória (62,162).

As células Th17 estão tipicamente envolvidas em respostas pró-inflamatórias vigorosas, mas também permanecem nos tecidos, como pele e mucosas, como células inativas (163). As funções inflamatórias das células Th17 dependem das diferentes combinações de citocinas expressas no ambiente local. Por exemplo, demonstrou-se que as células Th17 produzem a citocina anti-inflamatória IL-10 quando estimulada com IFN α/β , regulando negativamente suas funções patogênicas. Em contraste com isso, a IL-23 mostrou reduzir os níveis de expressão da IL-10 no desenvolvimento de células Th17 e induzir células Th17 pró-inflamatórias que produzem IL-17. A exposição ao TGF β / IL-1 β e IL-6 resulta na inibição de FOXP3 e na ativação de ROR γ t, iniciando assim a cascata de diferenciação das células Th17 (161,164,165)

Os nossos dados sugerem que ambos os probióticos são capazes de modular a resposta adaptativa celular nos diferentes tecidos. *B. breve* 1101A foi capaz de alterar a frequência de células T de uma maneira independente do consórcio microbiano, levando a redução de Treg e ao aumento Th17 no tecido gengival e baço. Quando administrado concomitantemente ao patógeno periodontal a modulação na frequência de células imunes ficou mais evidente. Os dados sugerem também que *B. bifidum* 1622A foi capaz de alterar a resposta adaptativa celular, levando a redução na frequência de células Treg e aumento Th17 no baço.

Níveis elevados de IL-10 no tecido gengival foram encontrados em animais com doença periodontal induzida por ligadura (70), podendo sugerir que a doença periodontal pode levar aumento desta citocina e conseqüentemente induzir a

diferenciação de células Th2. A inoculação oral de *A. actinomycetencomitans* induz aumento nos níveis de Treg no tecido gengival, em modelo experimental. Por outro lado a inibição de Treg pelo tratamento com anti-GITR (anti-glicocorticóide) resultou em maior perda óssea alveolar (166).

A literatura mostra aumento de Th17 assim como nos níveis de IL-17 em animais com doença periodontal induzida por ligadura (70). Foi demonstrado na literatura que animais inoculados oralmente com patógenos periodontais, como *P. gingivalis*, também são capazes de induzir o aumento na expressão de Th17 (células CD4⁺ RORγt⁺) no tecido gengival e linfonodos cervicais (167). Entretanto, um estudo mais recente mostrou que não houve diferença na proporção de Treg e Th17 em amostras de linfonodos mesentéricos e baço em camundongos infectados com *P. gingivalis* e *L. salivarius* (120).

Os dados sugerem que o probiótico *B. breve* 1101A altera os parâmetros inflamatórios de uma forma sistêmica e local, diminuindo fatores regulatórios como IL-10 sérica e Treg nos diferentes tecidos, ao mesmo tempo em que leva um aumento nos fatores pró inflamatórios com regulação positiva da expressão de *il-1β*, *tnf-α*, *tlr2*, *nlrp3* aumento de Th17 no tecido gengival. A regulação positiva da expressão de *tlr4* (que é ativado por células vivas de *P. gingivalis*) e *il-β* no tecido gengival em associação com aumento de Th17 pode ter contribuído para a perda do volume ósseo alveolar mostrada no grupo P+B+ (1101), similar ao grupo P+B-. Além disso, a ação deste probiótico na alteração da resposta imune dos animais ficou evidenciada no ganho de peso, onde os animais inoculados com P+B+ (1101) ganharam 50% menos peso do que animais do grupo SHAM, além de apresentarem colonização por *P. gingivalis* no fígado. Embora *Bifidobacterium breve* 1101A não tenha sido até hoje associado a doenças, os dados sugerem que esta amostra utilizada poderia potencializar o efeito inflamatório induzido por patógenos, um aspecto que requer maiores estudos.

Por outro lado, *B. bifidum* 1622A não levou a alterações expressivas nos parâmetros inflamatórios, não induzindo a expressão de *il-1β*, *tnf-α*, *tlr2*, *nlrp3* no tecido gengival e na produção de TNF-α sérico. Além disso, este probiótico foi capaz evitar o aumento da frequência de Th17 no tecido gengival, corroborando com os dados de volume ósseo das maxilas, onde os animais do grupo P+B+ (1622) apresentaram um volume ósseo semelhante aos animais P-B+ (1622) e SHAM. Assim, os dados sugerem ação de modulação de *B. bifidum* 1622 sobre a resposta a

patógenos periodontais, pois, apesar da regulação positiva da expressão de *tlr4* no tecido gengival no grupo P+B+ (1622), esta não resultou em regulação positiva de mediadores inflamatórios.

6 CONCLUSÃO

Frente as limitações do modelo experimental empregado, os dados obtidos permitem concluir que:

A administração oral do probióticos *B. bifidum* 1622A

- não afetou o ganho de peso dos animais.
- foi capaz de controlar a perda óssea alveolar induzida pelo consórcio microbiano
- promoveu a redução de níveis séricos de IL-10.
- não alterou a expressão de *il-1 β* , *tnf- α* , *tlr2*, e *nrlp3*, mas regulou positivamente a expressão de *tlr4*.
- não foi relacionada a detecção de *P. gingivalis* na gengiva ou em locais distantes.
- alterou a polarização de linfócitos T, promovendo a redução de Treg e aumento Th17 no baço.

A administração oral do probióticos *B. breve* 1101A

- reduziu o ganho de peso nos animais infectados também pelo consórcio microbiano.
- não foi capaz de controlar a perda óssea alveolar induzida pelo consórcio microbiano
- promoveu a redução de níveis séricos de IL-10 e aumento de TNF- α .
- promoveu a expressão de genes associados com o processo inflamatório como *il-1 β* , *nrlp3*, *tlr2* e *tlr4*.
- propiciou a presença de *P. gingivalis* no fígado.
- alterou a polarização de linfócitos T, promovendo a redução de Treg no baço, e aumento de Th17 no baço e tecido gengival.

Assim, os dados sugerem que *B. bifidum* 1622A teria potencial de regular a doença periodontal, necessitando de maiores estudos antes da sua indicação clínica. Por outro lado, o potencial pró-inflamatório de *B. breve* 1101A revelado no presente estudo, sugere que seu uso deve ser evitado no controle de doenças de caráter inflamatório, como a periodontite.

REFERÊNCIAS¹

1. Socransky SS, Haffajee a D, Cugini M a, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
2. Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontol 2000*. 2010;52(1):218–37.
3. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2015 May;86(5):611–22.
4. de Miguel-Infante A, Martinez-Huedo MA, Mora-Zamorano E, Hernández-Barrera V, Jiménez-Trujillo I, de Burgos-Lunar C, et al. Periodontal disease in adults with diabetes, prevalence and risk factors. Results of an observational study. *Int J Clin Pract*. 2019;73(3):0–1.
5. 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. 2018;45:162–70.
6. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28(1):12–55.
7. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Potentiel pathogénique de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia*, le complexe bactérien rouge associé à la parodontite. *Pathol Biol*. 2007;55(3–4):154–62.
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;24(6):469–77.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

9. Palm NW, de Zoete MR, Flavell RA. Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clin Immunol*. 2015;159(2):122–7.
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;27(6):409–19.
11. Hajishengallis G. *Inflammation*. 2015;15(1):30–44.
12. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1244–63.
13. 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;10(1): 2-11.
14. 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;23(5):413–8.
15. 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;199(1).
16. Lamont RJ, Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(34):341–9.
17. 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;5(2): 1-14.
18. 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): 1-10.
19. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* [Internet]. 1990;24(4):267–72.

20. Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. *Periodontol* 2000. 2010;52(1):38–52.
21. Zhang K, Wang S, Zhou X, Xu HHK, Weir MD, Ge Y, et al. Effect of antibacterial dental adhesive on multispecies biofilms formation. *J Dent Res*. 2015 Apr;94(4):622–9.
22. 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;77:100–4.
23. Laine ML, van Winkelhoff AJ. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* [Internet]. 1998 Oct;13(5):322–5.
24. 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;88(5):1–15.
25. 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*. Springer US; 2017;2(11):1493–9.
26. Brown JL, Yates E, Bielecki M, Olczak T, Smalley JW. Potential role for *Streptococcus gordonii* -derived hydrogen peroxide in haem acquisition by *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol*. 2018;33(4): 322-335..
27. 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*. *Clinical Oral Investigations*; 2016;20(9):2565–73.
28. Ahn SH, Song JE, Kim S, Cho SH, Lim YK, Kook JK, et al. NOX1/2 activation in human gingival fibroblasts by *Fusobacterium nucleatum* facilitates attachment of *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Microbiol*. Springer Berlin Heidelberg; 2016;198(6):573–83.
29. 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;11(2):94–100.

30. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. Role of *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal Health and Disease. 2011;25–36.
31. 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;28(3):219–29.
32. 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;10(9):1–14.
33. 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;35(2):89–105.
34. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt a M. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontal Res [Internet]*. 1998;33(7):387–99.
35. 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;105(8):1117–24.
36. Palioto DB, Finoti LS, Kinane DF, Benakanakere M. Epigenetic and inflammatory events in experimental periodontitis following systemic microbial challenge. *J Clin Periodontol*. 2019;46(8):819–29.
37. Alshammari A, Amar S. Proposal for a novel murine model of human periodontitis using *Porphyromonas gingivalis* and type II collagen antibody injections. *Saudi Dent J*. 2019;31(2):181–7.
38. 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;45(2):204–12.
39. Lopez R, Hujoel P, Belibasakis GN. On putative periodontal pathogens: An epidemiological perspective. *Virulence*. 2015;6(3):249–57.

40. Anovazzi G, Medeiros MC de, Pigossi SC, Finoti LS, Mayer MPA, Rossa C, et al. Functional Haplotypes in Interleukin 4 Gene Associated with Periodontitis. *PLoS One*. 2017;12(1):1-13.
41. Cirelli T, Finoti LS, Corbi SCT, Anovazzi G, Nepomuceno R, Orrico SRP, et al. Absolute quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients carrying haplotypes associated with susceptibility to chronic periodontitis: multifaceted evaluation with periodontitis covariants. *Pathog Dis*. 2017;29;75(7).1-11.
42. Toker H, Görgün EP, Korkmaz EM. Analysis of IL-6, IL-10 and NF- κ B Gene Polymorphisms in Aggressive and Chronic Periodontitis. *Cent Eur J Public Health*. 2017;25(2):157–62.
43. Andia DC, Planello AC, Portinho D, da Silva RA, Salmon CR, Sallum EA, et al. DNA methylation analysis of SOCS1, SOCS3, and LINE-1 in microdissected gingival tissue. *Clin Oral Investig*. 2015;19(9):2337–44.
44. Baptista NB, Portinho D, Casarin RC V, Vale HF, Casati MZ, De Souza AP, et al. DNA methylation levels of SOCS1 and LINE-1 in oral epithelial cells from aggressive periodontitis patients. *Arch Oral Biol*. 2014;59(7):670–8.
45. Luo Y, Peng X, Duan D, Liu C, Xu X, Zhou X. Epigenetic Regulations in the Pathogenesis of Periodontitis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018; 13(2):144-150.
46. Larsson L, Castilho RM, Giannobile W V. Epigenetics and its role in periodontal diseases: a state-of-the-art review. *J Periodontol*. 2015;86(4):556–68.
47. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007;19(1):24–32.
48. Ferrand J, Ferrero RL. Recognition of Extracellular Bacteria by NLRs and Its Role in the Development of Adaptive Immunity. *Front Immunol*. 2013;4:344.
49. 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;18;5(60):1–7.
50. Coats SR, Reife RA, Bainbridge BW, Pham TT-T, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect*

Immun. 2003;71(12):6799–807.

51. Sugawara S, Arakaki R, Rikiishi H, Takada H. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblasts and monocytes in a CD14-dependent manner. *Infect Immun*. 1999;67(4):1623–1632.
52. 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.
53. Franchi L, Muñoz-planillo R, Núñez G. *NIH Public Access*. 2012;13(4):325–32.
54. 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;83(7):948–54.
55. Xue F, Shu R, Xie Y. The expression of NLRP3, NLRP1 and AIM2 in the gingival tissue of periodontitis patients: RT-PCR study and immunohistochemistry. *Arch Oral Biol*. Elsevier Ltd; 2015;60(6):948–58.
56. Zenobia C, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*. 2015;6(3):236–43.
57. 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;15(6):768–78.
58. Zenobia C, Hajishengallis G, Zenobia C, Hajishengallis G, Zenobia C, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*. 2015;6(3):236-43.
59. Taxman DJ, Swanson K V, Broglie PM, Wen H, Holley-guthrie E, Huang MT, et al. *Porphyromonas gingivalis* Mediates Inflammasome Repression in Polymicrobial Cultures through a Novel Mechanism Involving Reduced Endocytosis. 2012;287(39):32791–9.

60. Meyle J, Dommisch H, Groeger S, Giacaman RA, Costalonga M, Herzberg M. The innate host response in caries and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2017;44(12):1215–25.
61. Mitchison NA. Control of the immune response by events at the lymphocyte surface. *In Vitro*. 1971;7(2):88–94.
62. Gonzales JR. T- and B-cell subsets in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015;69(1):181–200.
63. Sciences M. Th17 Cells and the IL-23 / IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 10;20(14): 1-24.
64. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(27):12204–9.
65. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013;8;500(7461):232–6.
66. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000*. 2007;43:14–40.
67. Garlet GP. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. *J Dent Res*. 2010;89(12):1349–63.
68. Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, et al. Porphyromonas gingivalis promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun*. 2012;39(4):294–303.
69. Zhang L, Gao L, Xu C, Li X, Wang P, Zhang C, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide promotes T-helper 17 cell differentiation from human CD4+ naïve T cells via toll-like receptor-2 in vitro. *Arch Oral Biol*. 2019; 18;107:104483.

70. Sommer MEL, Dalia RA, Nogueira AVB, Cirelli JA, Vinolo MAR, Fachi JL, et al. Immune response mediated by Th1 / IL-17 / caspase-9 promotes evolution of periodontal disease. *Arch Oral Biol.* 2019 Jan;97:77–84.
71. Monasterio G, Fernández B, Castillo F, Rojas C, Cafferata EA, Rojas L, et al. Capsular-defective *Porphyromonas gingivalis* mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *J Periodontol.* 2019;90(5):522–34.
72. Velsko IM, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Chen H, Zheng D, Bhattacharyya I, et al. *Fusobacterium nucleatum* alters atherosclerosis risk factors and enhances inflammatory markers with an atheroprotective immune response in ApoE mice. *PLoS One.* 2015;10(6):1–19.
73. Calandrini CA, Ribeiro AC, Gonnelli AC, Ota-Tsuzuki C, Rangel LP, Saba-Chujfi E, et al. Microbial composition of atherosclerotic plaques. *Oral Dis.* 2014;20(3):128–34.
74. 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).
75. Velsko IM, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Zheng D, Aukhil I, Lucas AR, et al. Periodontal pathogens invade gingiva and aortic adventitia and elicit inflammasome activation in $\alpha\beta6$ integrin-deficient mice. *Infect Immun.* 2015;83(12):4582–93.
76. 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;14(7):643–55.
77. Gupta G. Probiotics and periodontal health. *J Med Life.* 2011;4(4):387–94.
78. Messori MR, Oliveira LFF, Foureaux RC, Taba M, Zangerônimo MG, Furlaneto F a C, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol.* 2013;84(12):1818–26.

79. Foureaux R de C, Messoria MR, de Oliveira LFF, Napimoga MH, Pereira ANJ, Ferreira MS, et al. Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. *J Periodontol.* 2014;85(7):975–83.
80. Messoria MR, Pereira LJ, Foureaux R, Oliveira LFF, Sordi CG, Alves AJN, et al. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2016;66:108–19.
81. 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;88(2):197–208.
82. Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One.* 2017;12(6):1–15.
83. 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.
84. 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;13(4):376–85.
85. 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.
86. Staab B, Eick S, Knöfler G, Jentsch H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: A pilot study. *J Clin Periodontol.* 2009;36(10):850–6.
87. 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.

88. Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (prodentis) in the management of periodontal disease: A preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol.* 2010;2:2.
89. 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;19(1):77–83.
90. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: A randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2013;40(11):1025–35.
91. Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17(2):204–10.
92. 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;115(1):1–11.
93. Shin H-S, Baek D-H, Lee S-H. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* on the bioactivity of periodontopathogens. *J Gen Appl Microbiol.* 2018;61:55–61.
94. Jäsberg H, Söderling E, Endo A, Beighton D, Haukioja A. Bifidobacteria inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. *Eur J Oral Sci.* 2016;124(3):251–8.
95. Gillor O, Vriezen J a C, Riley M a. NIH Public Access. 2009;154(6):1783–92.
96. Sakanaka A, Takeuchi H, Kuboniwa M, Amano A. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells. *Microb Pathog.* 2016;94:42–7.
97. Albuquerque-Souza E, Balzarini D, Ando-Suguimoto ES, Ishikawa KH, Simionato MRL, Holzhausen M, et al. Probiotics alter the immune response of gingival epithelial cells challenged by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2019 Apr;54(2):115–27.

98. 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;150(3):531–8.
99. Souza TC, Silva AM, Drews JRP, Gomes DA, Vinderola CG, Nicoli JR. *In vitro* evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. *Benef Microbes*. 2013 Jun;4(2):179–86.
100. Pakula R. Factors Regulating Competence in Transformation of Streptococci. 1965;90(5):1320-4.
101. 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.
102. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Otremba J, Kriegl JM, Protter TAA, et al. A p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor arrests active alveolar bone loss in a rat periodontitis model. *J Periodontol*. 2007 Oct;78(10):1992–8.
103. Lopes DEM, Jabr CL, Dejadi NN, Saraiva AC, de Aquino SG, Medeiros AI, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase attenuates inflammation and BONE resorption in lipopolysaccharide-induced periodontal disease. *J Periodontol*. 2018;89:235-245.
104. Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. *J Dent Res*. 2000 Sep;79(9):1664–8.
105. Tran SD, Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*. 1996 Nov;34(11):2674–8.
106. Pfaffl MW. <Nucleic acids research 2001 PfaffIA new mathematical model for.pdf>. 2001;29(9):16–21.
107. Schmitt V, Rink L, Uciechowski P. The Th17/Treg balance is disturbed during

aging. *Exp Gerontol.* 2013 Dec;48(12):1379–86.

108. Souto GR, Queiroz-Junior CM, de Abreu MHNG, Costa FO, Mesquita RA. Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 cytokines and dendritic cells: a cross-sectional study in chronic periodontitis. *PLoS One.* 2014;9(3):e91636.
109. Sabarish R, Rao SR, Lavu V. Natural T Regulatory Cells (n Treg) in the Peripheral Blood of Healthy Subjects and Subjects with Chronic Periodontitis - A Pilot Study. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(3):36-9.
110. Francis N, Ayodele BA, O'Brien-Simpson NM, Birchmeier W, Pike RN, Pagel CN, et al. Keratinocyte-specific ablation of protease-activated receptor 2 prevents gingival inflammation and bone loss in a mouse model of periodontal disease. *Cell Microbiol.* 2018;20(11):e12891.
111. 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.* 201;2(11):1493–9.
112. Nagashima H, Shinoda M, Honda K, Kamio N, Hasuike A, Sugano N, et al. CXCR4 signaling contributes to alveolar bone resorption in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in mice. *J Oral Sci.* 2017;27;59(4):571–7.
113. Ting Y, Li Z, Jincai Z, Dongying X. Efeito da periodontite no peso visceral e coeficiente em camundongos obesos. *West China Journal of Stomatology.* 2018;36(5):514–20.
114. Yu T, Zhao L, Huang X, Xie B, Zhang J, Xuan D. Aberrant Periodontal and Systemic Immune Response of Overweight Rodents to Periodontal Infection. *Biomed Res Int. Hindawi;* 2019;2019:1–10.
115. Zhuang Z, Yoshizawa-Smith S, Glowacki A, Maltos K, Pacheco C, Shehabeldin M, et al. Induction of M2 Macrophages Prevents Bone Loss in Murine Periodontitis Models. *J Dent Res.* 2019;98(2):200–8.
116. Ilievski V, Zuchowska PK, Green SJ, Toth PT, Ragozzino ME, Le K, et al. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS One.* 2018;13(10):e0204941.

117. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep.* 2014; 6;4:4828.
118. Ebbers M, Lübcke PM, Volzke J, Kriebel K, Hieke C, Engelmann R, et al. Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–10.
119. 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;52(2):233–45.
120. Sato K, Yokoji M, Yamada M, Nakajima T, Yamazaki K. An orally administered oral pathobiont and commensal have comparable and innocuous systemic effects in germ-free mice. *J Periodontal Res.* 2018 Dec;53(6):950–60.
121. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology.* 2014;35(1):3-11.
122. Lübcke PM, Ebbers MNB, Volzke J, Bull J, Kneitz S, Engelmann R, et al. Periodontal treatment prevents arthritis in mice and methotrexate ameliorates periodontal bone loss. *Sci Rep.* 2019; 31;9(1):8128.
123. Blasco-Baque V, Kémoun P, Loubieres P, Roumieux M, Heymes C, Serino M, et al. Impact de la maladie parodontale sur la pression artérielle des souris diabétiques. *Ann Cardiol Angeiol.* 2012;61(3):173–7.
124. 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;79(1):67–74.
125. Hajishengallis. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30–44.
126. Maekawa T, Takahashi N, Tabeta K, Aoki Y, Miyashita H, Miyauchi S, et al. Chronic oral infection with *Porphyromonas gingivalis* accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. *PLoS One.* 2011;6(5):e20240.

127. 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;10(7):e0134234.
128. Zhou X, Zhang P, Wang Q, Ji N, Xia S, Ding Y, Wang O.. Metformin ameliorates experimental diabetic periodontitis independently of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition by reducing NIMA-related kinase 7(Nek7) expression. *J Periodontol*. 2019 ;90(9):1032-42.
129. Chukkapalli SS, Easwaran M, Rivera-Kweh MF, Velsko IM, Ambadapadi S, Dai J, et al. Sequential colonization of periodontal pathogens in induction of periodontal disease and atherosclerosis in LDLRnull mice. *Pathog Dis*. 2017;75(1):1–10.
130. Wang Y, Yu X, Lin J, Hu Y, Zhao Q, Kawai T, et al. B10 cells alleviate periodontal bone loss in experimental periodontitis. *Infect Immun*. 2017;85(9):2-10.
131. Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, et al. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. *J Periodontal Res*. 2016;51(5):639–46.
132. Ben Amara H, Song HY, Ryu E, Park JS, Schwarz F, Kim BM, et al. Effects of quorum-sensing inhibition on experimental periodontitis induced by mixed infection in mice. *Eur J Oral Sci*. 2018;126(6):449–57.
133. Zambetti LP, Mortellaro A. NLRPs, microbiota, and gut homeostasis: unravelling the connection. *J Pathol*. 2014 Aug;233(4):321–30.
134. Schieber AMP, Lee YM, Chang MW, Leblanc M, Collins B, Downes M, et al. Disease tolerance mediated by microbiome *E. coli* involves inflammasome and IGF-1 signaling. *Science*. 2015;30;350(6260):558–63.
135. Kailasan Vanaja S, Rathinam VAK, Atianand MK, Kalantari P, Skehan B, Fitzgerald KA, et al. Bacterial RNA:DNA hybrids are activators of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;27;111(21):7765–70.

136. Park E, Na HS, Song Y-R, Shin SY, Kim Y-M, Chung J. Activation of NLRP3 and AIM2 Inflammasomes by *Porphyromonas gingivalis* Infection. Bäumlér AJ, editor. *Infect Immun*. 2014;82(1):112–23.
137. Okano T, Ashida H, Suzuki S, Shoji M, Nakayama K, Suzuki T. *Porphyromonas gingivalis* triggers NLRP3-mediated inflammasome activation in macrophages in a bacterial gingipains-independent manner. *Eur J Immunol*. 2018;;48(12):1965–74.
138. Yamaguchi Y, Kurita-Ochiai T, Kobayashi R, Suzuki T, Ando T. Regulation of the NLRP3 inflammasome in *Porphyromonas gingivalis*-accelerated periodontal disease. *Inflamm Res*. Springer International. 2017;66(1):59–65.
139. Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MPA. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(4):224–9.
140. Calkins CC, Platt K, Potempa J, Travis J. Inactivation of tumor necrosis factor- α by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion. *J Biol Chem*. 1998.20;273(12):6611–4.
141. Banbula A, Bugno M, Kuster A, Heinrich PC, Travis J, Potempa J. Rapid and efficient inactivation of IL-6 gingipains, lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;11;261(3):598–602.
142. Mezyk-Kopec R, Bzowska M, Potempa J, Bzowska M, Jura N, Sroka A, et al. Inactivation of Membrane Tumor Necrosis Factor Alpha by Gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2005;1;73(3):1506–14.
143. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol*. 2015;1;109:14.12.1-10.
144. Hajishengallis G, Wang M, Liang S, Triantafilou M, Triantafilou K. Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;9;105(36):13532–7.

145. Bainbridge BW, Darveau RP. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand.* 2001;59(3):131–8.
146. Lin M, Hu Y, Wang Y, Kawai T, Wang Z, Han X. Different engagement of TLR2 and TLR4 in Porphyromonas gingivalis vs. ligature-induced periodontal bone loss. *Braz Oral Res.* 2017;21;31:e63.
147. Cai J, Chen J, Guo H, Pan Y, Zhang Y, Zhao W, et al. Recombinant fimbriae protein of Porphyromonas gingivalis induces an inflammatory response via the TLR4/NF- κ B signaling pathway in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Mol Med.* 2019;43(3):1430–40.
148. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499–511.
149. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. *J Immunol.* 2000;15;165(10):5392–6.
150. Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci.* 2004;34(2):73–82.
151. Akira S, Takeda K. Functions of toll-like receptors: Lessons from KO mice. *Comptes Rendus - Biol.* 2004;327(6):581–9.
152. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;7;96(25):14459–63.
153. Li S-C, Hsu W-F, Chang J-S, Shih C-K. Combination of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis subsp. lactis Shows a Stronger Anti-Inflammatory Effect than Individual Strains in HT-29 Cells. *Nutrients.* 2019;27;11(5).
154. Rocha-Ramírez LM, Pérez-Solano RA, Castañón-Alonso SL, Moreno Guerrero SS, Ramírez Pacheco A, García Garibay M, et al. Probiotic Lactobacillus Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *J Immunol Res.* 2017;2017:4607491.

155. Li J-P, Chen Y, Ng CHC, Fung M-L, Xu a, Cheng B, et al. Differential expression of Toll-like receptor 4 in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontal Res.* 2014;96:845–54.
156. To TT, Gümüs P. Subgingival Plaque in Periodontal Health Antagonizes at Toll-Like Receptor 4 and Inhibits E-Selectin Expression on Endothelial Cells. 2016;84(1):120–6.
157. Kanmani P, Ansari A, Villena J, Kim H. Immunobiotics Beneficially Modulate TLR4 Signaling Triggered by Lipopolysaccharide and Reduce Hepatic Steatosis In Vitro. *J Immunol Res.* 2019;2019:3876896
158. Mendi A, Köse S, Uçkan D, Akca G, Yilmaz D, Aral L, et al. Lactobacillus rhamnosus could inhibit Porphyromonas gingivalis derived CXCL8 attenuation. *J Appl Oral Sci.* 24(1):67–75.
159. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* 2007;28(10):429–36.
160. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001;2;357(9270):1777–89.
161. Bunte K, Beikler T. Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;10;20(14).
162. Cafferata EA, Jerez A, Vernal R, Monasterio G, Pandis N, Faggion CM. The therapeutic potential of regulatory T lymphocytes in periodontitis: A systematic review. *J Periodontal Res.* 2019;54(3):207–17.
163. Kryczek I, Zhao E, Liu Y, Wang Y, Vatan L, Szeliga W, et al. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Sci Transl Med.* 2011.12;3(104):104ra100.
164. Wang M, Tian T, Yu S, He N, Ma D. Th17 and treg cells in bone related diseases. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013.

165. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1390–7.
166. Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, et al. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol.* 2010;37(7):591–600.
167. Linyuan W, Ning G, Xiaoping L. [Study on the immune status of T helper 17 cells in mice with periodontitis]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* [Internet]. 2015;33(2):125–9.
168. Mizraji G, Segev H, Wilensky A, Hovav AH. Isolation, processing and analysis of murine gingival cells. *J Vis Exp.* 2013;2;(77):e50388. doi: 10.3791/50388.

ANEXO A – Parecer 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 "Pavilhão de Esportes Olímpicos" Duzemil, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - CDB III - 05508-900
CEUA-ICBU/USP - Telefone (11) 3091-7755 - 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 (ICBUA- CB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de 4 ano(s) a partir da data de aprovação.

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

- Departamento: *Microbiologia*

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

Após o período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a 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), conforme modelo constante no endereço eletrônico www2.icb.usp.br/icb/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICBU/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 rule 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 (ICBUA-ICBU/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

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

- Team members: *Natali Shimabukuro (Graduate Student), Amália Cristina de Souza Cataruci (Graduate Student), Karin Hitomi Ishikawa (Postdoctoral Researcher), Emmanuel Albuquerque (Graduate Student), Danilo Balzarini (Undergraduate Student), Diana Kawamoto (Postdoctoral Researcher), Ellen Sayuri 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-ICBU/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.

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

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



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 de probióticos do gênero *Bifidobacterium* sobre a modulação da resposta imune e nível de perda óssea alveolar promovida por periodontite induzida em camundongos saudáveis e diabéticos”, registrada com o nº **19/2019**, sob a responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer e dos pesquisadores Natali Shimabukuro, Amália Cristina de Souza Cataruci, Karim 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 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião realizada em 10 de junho de 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	96
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