



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo Facial e Periodontia

“Síndrome Metabólica e Periodontite: um estudo em roedores das conexões patofisiológicas envolvidas e dos efeitos de microrganismos probióticos administrados como estratégia terapêutica e/ou preventiva”.



ANDRÉ LUIS GOMES MOREIRA

RIBEIRÃO PRETO

2022

ANDRÉ LUIS GOMES MOREIRA

“Síndrome Metabólica e Periodontite: um estudo em roedores das conexões patofisiológicas envolvidas e dos efeitos de microrganismos probióticos administrados como estratégia terapêutica e/ou preventiva”.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Periodontia).
Área de concentração: Periodontia
Orientador: Prof. Dr. Michel Reis Messoria

RIBEIRÃO PRETO

2022

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.

André Luis Gomes Moreira

Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Moreira, André Luis Gomes
“Síndrome Metabólica e Periodontite: um estudo em roedores das conexões patofisiológicas envolvidas e dos efeitos de microrganismos probióticos administrados como estratégia terapêutica e/ou preventiva” / André Luis Gomes Moreira; Orientador Michel Reis Messoria. - Ribeirão Preto, 2022.
126f.: il. 30 cm
Tese (Doutorado) —Universidade de São Paulo, 2022.
1. Doença Periodontal. 2. Síndrome Metabólica. 3. Ratos.

Moreira, ALG. **“Síndrome Metabólica e Periodontite: um estudo em roedores das conexões patofisiológicas envolvidas e dos efeitos de microrganismos probióticos administrados como estratégia terapêutica e/ou preventiva”**: Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **José e Neuza,**

por materializarem o amor em minha vida. Por terem fornecido me ensinado sólidos preceitos morais e éticos, estas que foram ferramentas essenciais para que eu chegasse até aqui e por constituírem parte da minha motivação e vontade de seguir em frente. Estes que são o meu tesouro.

Aminha irmã **Bárbara,**

por ser meu porto seguro e fonte inesgotável de inspiração. Obrigado pela paciência, incentivo, força e principalmente pelo carinho.

Aminha filha **Maria Andréa,**

por me estimular a não desistir, por servir como meu combustível de vida, sonhos e esperança. Papai te ama!

Aminha avó Francisca (*in memoriam*),

pelo exemplo de fortaleza moral, fé e determinação. Com a senhora eu aprendi o valor da fé, aprendi a sempre olhar para frente e acreditar em mim mesmo.

Agradecimientos

Após tantos obstáculos superados ao longo desta jornada, com força de vontade, foco e perseverança. Eu consegui realizar este feito. No entanto, nada teria se concretizado se não fosse à existência de pessoas especiais que me ajudaram durante esta minha trajetória. Desta forma, agradeço à:

A Deus e **todos os espíritos de luz**, que me auxiliaram e me guiaram em cada uma das minhas escolhas.

A **minha família**, pais, irmã, primos e tios pelas vibrações positivas e apoio.

A **Patrícia Lucio**, por todo apoio prestado a mim durante esse período. Seu carinho e foi muito importante e, sem ele, nada dito teria sido possível.

A **Michelle Rodrigues**, pelos conelhos, pelos ensinamentos e amizade.

Ao **Prof. Michel Reis Messora**, pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

Aos professores do curso de Periodontia **Prof. Arthur Belém Novaes Júnior**, **Prof. Mário Taba Júnior**, **Prof. Sérgio Scombatti** e **Profa. Daniela Palioto**, pela oportunidade de ter aprendido um pouco mais de ciência.

À minha nova – velha amiga, **Giselle Silva** (*in memoriam*), minha primeira aluna de iniciação científica. Sua participação em todas as fases deste projeto foi essencial. Sua competência, dedicação e carinho foram essenciais nesta etapa da minha vida e serei grato, até o meu último suspiro, por isso. Muito obrigado por ter existido em minha vida e ter me ensinado que a viver é acelerar.

À **Pedro Felix** que foi mais do que um companheiro de pós-graduação, fiel e valioso amigo que guardarei para sempre no canto mais nobre do meu coração.

Aos amigos e amigas das turmas de mestrado e doutorado. Companhias em diversos os momentos. Obrigado pela troca de experiências, pelo convívio, pelas alegrias e incertezas, por todos esses momentos vividos e partilhados juntos.

A **Naiane Nascimento**, que de forma especial e carinhosa me deu força, garra e coragem, me apoiando nos momentos difíceis. Iluminou de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar corrigir meus defeitos. A pessoa que me presenteou com o meu maior presente, a nossa **Maria**.

A **Cecilia Gomes**, por ter reascendido a fogueira dos sonhos, fantasias, desejos e vontade de viver dentro de mim. Por ter me ensinado que o pouco também pode ser muito. E que sonhos existem para serem vividos.

A **Milla Tavares**, pela amizade, longas conversas, festas, risos, brigas e aprendizado laboratorial.

Ao **Prof Luiz Salvador** pela recepção e parceria nos procedimentos com os probóticos.

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

A **todos os professores** que contribuíram para minha formação.

A todos os funcionários da FORP, por todo carinho e disponibilidade, especialmente **Dulce, Daniela, Carla Daniela, Isabel e Regiane**.

ΕΠÍΓΡΑΦΕ

*"Neste mundo vocês terão aflições; contudo,
tenham ânimo! Eu venci o mundo."*

João 16:33

Resumo

MOREIRA, A. L. G. **Síndrome metabólica e Periodontite: um estudo em roedores das conexões patofisiológicas envolvidas e dos efeitos de microrganismos probióticos administrados como estratégia terapêutica e/ou preventiva. 2022.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O propósito deste estudo foi avaliar diferentes mecanismos imunológicos, microbiológicos, genéticos e metabólicos envolvidos na correlação entre a perda óssea alveolar decorrente da doença periodontal (DP) experimental e a síndrome metabólica (SM) induzida por dieta hipercalórica rica em gorduras (HFD) em ratos, bem como os possíveis efeitos do agente probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 como estratégia terapêutica e/ou preventiva para a associação DP-SM. Foram utilizados 96 ratos Wistar Hannover machos divididos em grupos com SM e sem SM. Esses dois grandes grupos foram aleatoriamente subdivididos em subgrupos com e sem DP induzida por ligaduras e de acordo com o protocolo alimentar recebido (grupos tratados com probiótico - P e grupos não tratados com probióticos), constituindo as seguintes situações: SM (com SM, n = 12) e C (sem SM, n = 12); SMP (com SM e tratado com P, n = 12) e CP (sem SM e tratado com P, n = 12); SMDP (Com SM e com DP, n = 12) e DP (sem SM e com DP, n = 12); SMDPP (com SM, com DP e tratado com P, n = 12) e DPP (sem SM, com DP e tratado com P, n = 12). Os animais dos grupos SM receberam HFD durante 16 semanas para indução da SM. Nos grupos CP, DPP, SMP e SMDPP, o probiótico *B. lactis* HN019 foi adicionado diariamente na água dos animais na proporção de 1×10^{10} UFC/mL. Todos os animais ingeriram a mesma quantidade de probiótico durante todo o período experimental. O consumo de probióticos não ultrapassou 8 semanas e foi iniciado na 8ª semana experimental. Na 14ª semana do estudo, a DP foi induzida por meio da colocação de ligaduras que permaneceram durante 14 dias nos primeiros molares inferiores dos animais dos grupos DP, DPP, SMDP e SMDPP. Todos os animais foram eutanasiados 16 semanas após o início do experimento. Foram avaliados: parâmetros metabólicos, antropométricos e pressão arterial invasiva; níveis de proteinúria; aspectos histopatológicos e histomorfométricos dos tecidos periodontais, hepáticos, intestinais e esplênico; perfil de adipocinas de tecido gorduroso branco (qRT-PCR) e perfil microbiológico das fezes (qRT-PCR). Os dados foram analisados estatisticamente ($p < 0,05$). A SM promoveu diversas alterações nos parâmetros imunológicos, microbiológicos, genéticos e metabólicos analisados. O grupo SM apresentou valores de

peso, índice de massa corporal, circunferência abdominal, colesterol total, triglicerídeos, ácidos graxos, glicemia em jejum, HOMA-IR, pressão arterial média, expressão gênica de receptor de leptina (LEPR), nicotinamida fosforibosil transferase (NAMPT) e proteína ligante de ácidos graxos tipo 4 (FABP4), percentual de hepatócitos gordurosos (esteatose hepática) e perda de inserção conjuntiva periodontal significativamente maiores que aqueles do grupo C ($p < 0,05$). No ambiente intestinal, observou-se menor altura de vilosidades - AV (íleo) e de profundidade de criptas - PC (duodeno e íleo) no grupo SM quando comparado ao grupo C. A colocação de ligaduras foi capaz de reproduzir os eventos de perda óssea e de inserção conjuntiva nos tecidos periodontais. Os grupos SMDP e DP apresentaram maior perda de osso alveolar e de inserção conjuntiva do que os grupos SM e C, respectivamente ($p < 0,05$). Considerando os dados de perda óssea alveolar, correlações fortes foram encontradas com os seguintes parâmetros: esteatose hepática, expressão gênica de NAMPT, ácidos graxos, PC e proteinúria; correlações moderadas foram encontradas com a expressão gênica de LEPR; e correlações fracas foram encontradas com os níveis de *Bacteroidetes* nas fezes. O grupo SMDP, o qual apresentava diversos parâmetros imunológicos, microbiológicos, genéticos e metabólicos alterados, apresentou maior perda de osso alveolar do que o grupo DP ($p < 0,05$). A terapia probiótica foi capaz de reduzir nos grupos SMP e SMDPP as alterações de diversos parâmetros que se correlacionaram com a perda óssea alveolar. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos SM e SMP em triglicerídeos, LDL, ácidos graxos, LEPR, NAMPT, AV (íleo), PC (íleo), razão AV/PC (íleo) e percentual de hepatócitos gordurosos. Quando se compara os grupos SMDP e SMDPP, diferenças significativas foram observadas em colesterol total, triglicerídeos, ácidos graxos, FABP4, LEPR, NAMPT, percentual de hepatócitos gordurosos, AV (duodeno, jejuno e íleo), razão AV/PC (duodeno, jejuno e íleo) e proporções de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* nas fezes. O grupo SMDPP apresentou menor perda de osso alveolar e de inserção conjuntiva quando comparado ao grupo SMDP ($p < 0,05$). Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que: i) alguns fatores microbiológicos, genéticos e metabólicos podem explicar a maior susceptibilidade ao desenvolvimento de DP com maior gravidade em animais com SM; ii) a terapia probiótica utilizando *B. lactis* HN019 em animais com SM e DP é capaz de modular diversos fatores microbiológicos, genéticos e metabólicos, promovendo impacto significativo na redução da gravidade dos danos ocasionados pela DP nos tecidos periodontais.

Palavras-chave: Ratos, síndrome metabólica, periodontite, probióticos

Abstract

MOREIRA, A. L. G. **Metabolic Syndrome and Periodontitis: a pathophysiological connections study and effects of probiotic microorganisms administered as a therapeutic and/or preventive strategy in rodents.** 2022. Tese (PhD) – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The purpose of this study was to evaluate different immunological, microbiological, genetic and metabolic mechanisms involved in the correlation between alveolar bone loss resulting from experimental periodontal disease (PE) and metabolic syndrome (MS) induced by a high-fat hypercaloric diet (HFD) in rats, as well as the possible effects of the probiotic agent *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 as a therapeutic and/or preventive strategy for the PE-MS association. Ninety-six male Wistar Hannover rats were divided into groups with and without MS. These two large groups were randomly subdivided into subgroups with and without ligature-induced PE and according to the food protocol received (groups treated with probiotic - P and groups not treated with probiotics), constituting the following situations: MS (with MS, n = 12) and C (without SM, n = 12); MSP (with SM and treated with P, n = 12) and P (without SM and treated with P, n = 12); MSPE (With SM and with PD, n = 12) and PE (without SM and with PD, n = 12); MSEPP (with MS, with PE and treated with P, n = 12) and EPP (without SM, with DP and treated with P, n = 12). The animals in the MS groups received HFD for 16 weeks to induce MS. In the P, EPP, MSP and MSEPP groups, the probiotic *B. lactis* HN019 was added daily to the animals' water at a rate of 1×10^{10} CFU/mL. All animals ingested the same amount of probiotic throughout the experimental period. The consumption of probiotics did not exceed 8 weeks and started in the 8th experimental week. In the 14th week of the study, PE was induced by placing ligatures that remained for 14 days on the lower first molars of the animals in the PE, EPP, MSEP and MSEPP groups. All animals were euthanized 16 weeks after the start of the experiment. The following were evaluated: metabolic, anthropometric and invasive blood pressure parameters; proteinuria levels; histopathological and histomorphometric aspects of periodontal, hepatic, intestinal and splenic tissues; white fat tissue adipokine profile (qRT-PCR) and stool microbiological profile (qRT-PCR). Data were statistically analyzed ($p < 0.05$). MS promoted several changes in the immunological, microbiological, genetic and metabolic parameters analyzed. The MS group presented values of weight, body mass index, waist circumference, total cholesterol, triglycerides, fatty acids, fasting glucose, HOMA-IR, mean arterial pressure, leptin receptor (LEPR)

gene expression, nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) and fatty acid binding protein type 4 (FABP4), percentage of fatty hepatocytes (hepatic steatosis) and loss of periodontal connective attachment were significantly higher than those in group C ($p < 0.05$). In the intestinal environment, lower villus height - AH (ileum) and crypt depth - CD (duodenum and ileum) were observed in the MS group when compared to the group. The placement of ligatures was able to reproduce the events of bone loss and connective attachment in periodontal tissues. The MSEP and PE groups showed greater loss of alveolar bone and conjunctival attachment than the MS and C groups, respectively ($p < 0.05$). Considering the alveolar bone loss data, strong correlations were found with the following parameters: hepatic steatosis, NAMPT gene expression, fatty acids, P and proteinuria; moderate correlations were found with LEPR gene expression; and weak correlations were found with levels of *Bacteroidetes* in feces. The MSEP group, which had several altered immunological, microbiological, genetic and metabolic parameters, showed greater alveolar bone loss than the PE group ($p < 0.05$). Probiotic therapy was able to reduce changes in several parameters that correlated with alveolar bone loss in the MSP and MSEPP groups. Significant differences were observed between the SM and SMP groups in triglycerides, LDL, fatty acids, LEPR, NAMPT, AH (ileum), CD (ileum), AH/CD ratio (ileum) and percentage of fatty hepatocytes. When comparing the SMDP and SMDPP groups, significant differences were observed in total cholesterol, triglycerides, fatty acids, FABP4, LEPR, NAMPT, percentage of fatty hepatocytes, AH (duodenum, jejunum and ileum), AH/CD ratio (duodenum, jejunum and ileum) and proportions of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in feces. The SMDPP group showed less loss of alveolar bone and conjunctival attachment when compared to the MSEP group ($p < 0.05$). Within the limits of this study, it can be concluded that: i) some microbiological, genetic and metabolic factors can explain the greater susceptibility to the development of more severe PE in animals with MS; ii) probiotic therapy using *B. lactis* HN019 in animals with MetS and PE is able to modulate several microbiological, genetic and metabolic factors, promoting a significant impact on reducing the severity of damage caused by PE in periodontal tissues.

Keywords: Rats, metabolic syndrome, periodontitis, probiotics

Lista de figuras

Figura 1: Delineamento do estudo experimental.

Figura 2: A) Fio de seda em posição para indução da doença periodontal no primeiro molar inferior.

Figura 3. Valores relativos (%) e desvios-padrão dos parâmetros antropométricos obtidos nos diferentes grupos experimentais em relação ao Grupo C. A) Peso; B) Circunferência abdominal; C) IMC. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 4. Valores relativos (%) e desvios-padrão dos parâmetros metabólicos obtidos nos diferentes grupos experimentais em relação ao Grupo C. A) Triglicérides; B) LDL; C) Colesterol total; D) HDL; E) Ácidos graxos. *diferença significativa entre os grupos; letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 5 - Médias da AUC para os diferentes grupos experimentais. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos. (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 6: Valores relativos (%) de parâmetros metabólicos obtidos nos diferentes grupos experimentais em relação ao Grupo C: A) HOMA-IR; B) Glicemia em jejum. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 7: Valores relativos (%) de pressão arterial obtidos nos diferentes grupos experimentais em relação ao Grupo C: A) Pressão média; B) Pressão sistólica. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 8 - Médias e desvios-padrão de proteinúria para os grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (Anova, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 9: Imagens histológicas da região interproximal entre 1º e 2º molares inferiores, com aumento de 40x dos grupos: C (A), CP (B), DP (C), DPP (D), SM (E), SMP (F), SMDP (G) e SMDPP (H).

Figura 10: Imagens histológicas da região de bifurcação do 1º molar inferior, com aumento de 20x (A1-H1) e 40x (A2-H2), dos grupos C (A1, A2), CP (B1, B2), DP (C1, C2), DPP (D1, D2), SM (E1, E2), SMP (F1, F2), SMDP (G1, G2) e SMDPP (H1, H2). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 20x (1); 40x (2). OA = osso alveolar; TF = teto da bifurcação; setas pretas = vasos sanguíneos; estrela = osteoblastos;

cabeça de seta preta preenchida = fibras colágenas desconexas com a presença de edema intersticial; triângulos = infiltrado inflamatório; cabeça de seta preenchida = fibras colágenas interpostas entre o osso alveolar e o cimento radicular.

Figura 11 - Análise histomorfométrica dos tecidos periodontais. Médias e desvios-padrão da área sem osso para os grupos DP, DPP, SMDP e SMDPP, com comparações entre os grupos. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 12 - Análise histomorfométrica dos tecidos periodontais. Médias e desvios-padrão da perda de inserção interproximal para os grupos C, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP, com comparações entre os grupos. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 13: Tecidos esplênicos dos grupos C (A), CP (B); DP (C); DPP (D); SM (E); SMP (F); SMDP, (G). SMDPP (H). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original 2,5x. Setas: cápsula.

Figura 14: Tecidos esplênicos dos grupos C (A-1), CP (B-1); DP (C-1); DPP (D-1); SM (E-1); SMP (F-1); SMDP, (G-1). SMDPP (H-1). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original 20x. PALPS = Bainha periarteriolar linfática ; PV = Polpa vermelha; ELIPSE = folículos linfáticos da polpa branca; Retângulos = Grânulos de hemossiderina.

Figura 15. Análise histomorfométrica dos tecidos hepáticos. Médias e desvios-padrão do percentual de células gordurosas para os grupos C, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP, com comparações entre os grupos. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 16- Imagens histológicas dos tecidos hepáticos dos grupos C (A), CP (B); DP (C); DPP (D); SM (E); SMP (F); SMDP, (G). SMDPP (H). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 20x. Estrela = hepatócitos em cordões; seta = área de fibrose; estrela = degeneração de hepatócitos; elipse = esteatose.

Figura 17 – Imagens histológicas dos tecidos intestinais dos grupos C (A), CP (B); DP (C); DPP (D); SM (E); SMP (F); SMDP, (G). SMDPP (H). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x e 40x (retângulo destacado).

Figura 18 - Análise histomorfométrica dos tecidos intestinais. Médias e desvios-padrão de altura de vilosidade (AV) e profundidade de cripta (PC) para os grupos C, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP, com comparações entre os grupos. Na coluna I estão

representadas a Altura de vilosidade; Na coluna **II** estão representadas a Profundidade de cripta; Na coluna **III** estão representadas a Razão AV/PC. Na linha **I** estão representados os tecidos do duodeno; na linha **II** estão representados os tecidos do jejuno; na linha **III** estão representados os tecidos do íleo.* diferenças significativas entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 19- Médias e desvios-padrão da expressão relativa FABP4/Actina para todos os grupos experimentais. *diferença significativa entre os grupos; Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM ($p < 0,05$).

Figura 20 - Médias e desvios-padrão da expressão relativa LEPR/Actina para todos os grupos experimentais. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM ($p < 0,05$).

Figura 21- Médias e desvios-padrão da expressão relativa NAMPT/Actina para os todos os grupos experimentais. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM ($p < 0,05$).

Figura 22. Médias e desvios-padrão das variações percentuais para as contagens de bactérias na 16ª semana em relação aos valores obtidos no *baseline* nas fezes dos grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. Valores positivos demonstram aumentos nas contagens de microrganismos e valores negativos indicam redução. A) *Bacteroidetes* (grupos sem SM); B) *Bacteroidetes* (grupos com SM); C) *Firmicutes* (grupos sem SM); D) *Firmicutes* (grupos com SM); E) *Lactobacilos* (grupos sem SM); F) *Lactobacilos* (grupos com SM); G) *Bifidobacterium* (grupos sem SM); H) *Bifidobacterium* (grupos com SM).

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição dos protocolos alimentares que foram utilizados no experimento

Tabela 2: Sequência iniciadora 5'-3' forward (F) e reverse (R) utilizadas para quantificação de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Lactobacilos* e *Bifidobacterium* por meio de qRT-PCR.

Tabela 3: Médias dos níveis glicêmicos dos diferentes grupos distribuídos ao longo do tempo. Letras diferentes, em cada tempo, representam diferenças estatísticas entre os grupos.

- a- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo C (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).
- b- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo CP (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).
- c- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo DP (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).
- d- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo DPP (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).

Tabela 4. Correlação entre perda óssea alveolar na região de bifurcação e diversos parâmetros microbiológicos, genéticos e metabólicos. PO = Perda óssea; AC Graxo = ácidos graxos; Bact = *Bacteroidetes*; ESTEAT = Esteatose; PROT = Proteinúria; Cripta = profundidade de cripta. ^a Valor significativo para a correlação de *Spearman* ($p < 0,05$); ^b Tendência de diferença estatística ($p < 0,1$ e $> 0,05$).

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGE - Produtos finais da glicação avançada

aP2 - Proteína de adipócito 2

BD-3 - beta defensina 3

CCI - Coeficiente de correlação intraclasse

cDNA - DNA complementar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animal

Cm - Centímetro

COA - Crista óssea alveolar

CD-4 - cluster of differentiation-4

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP- Doença Periodontal

DVCs – Doenças cardiovasculares

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Imunoensaio enzimático

EO - Estresse oxidativo

FABP4- Proteína de ligação de ácidos graxos 4

FCG - Fluido crevicular gengival

FORP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

g - Grama

g/Kg -Gramas/ Kilo

HbA1c - Hemoglobina glicada

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HE - Hematoxilina e Eosina

HOMA-IR - Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina

IMC – Índice de Massa corporal

IL - Interleucina

JCE - Junção cimento-esmalte

Kg – Kilo

Kcal/g – Kilocaloria/grama

LDL- Lipoproteínas de baixa densidade

LEPR – Receptor de leptina

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP-1 - Proteína quimioatrativa de monócito-1

mg - Miligrama

mg/dL - Miligrama/decilitro

mg/mL - Miligrama/mililitro

mL - Mililitro

mm – Milímetro

μ U/mL – Micro unidades/ mililitro

MMP - Metaloproteinases da matriz

MPO – Mieloperoxidase

NAMPT- Nicotinamida fosforibosil transferase

ng - Nanograma

NIC - Nível de inserção conjuntiva

nm - Nanômetros

NOA - Nível ósseo alveolar

ORs - odds ratio

OPG - Osteoprotegerina

PBS - Solução salina tamponada fosfatada

pg/mL - Picograma/mililitro

PGE2 - Prostaglandina E2

pH - Potencial hidrogeniônico

qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RANK-L - Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-beta

RAR - Raspagem e alisamento radicular

rDNA - DNA ribossomal

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SM - Síndrome metabólica

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

TLR-4 - receptor toll like-4

TTG - Teste de Tolerância à Glicose

TRIS - Tris(hidroximetil) aminometano

UNESCO - Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura

UFC - Unidades formadoras de colônia

USP - Universidade de São Paulo

μ g - Micrograma

μ L - Microlitro

μ m - Micrometro

Lista de anexos

Anexo 1: Certificado de aprovação da Comissão de Ética e Uso de Animais em Pesquisa.

Lista de símbolos

% Porcentagem

β Beta

α Alfa

< Menor

\geq Maior ou igual

\leq Menor ou igual

® Marca registrada

= Igual

\pm Mais ou menos

°C Grau Celsius

+ Mais

Δ Delta

μ -micro

1.	<i>REVISÃO DE LITERATURA E INTRODUÇÃO</i>	36
1.1.	Doença periodontal	37
1.2.	Síndrome metabólica	38
1.3.	Plausibilidade biológica do elo Doença periodontal-Síndrome Metabólica	39
1.4.	Estratégias terapêuticas para a associação SM-DP - nova perspectivas?	45
2.	<i>PROPOSIÇÃO</i>	50
2.1.	Objetivo Geral	51
2.2.	Objetivos Específicos	51
3.	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	52
3.1.	Cálculo do tamanho da amostra	53
3.2.	Apreciação ética	53
3.3.	Modelo experimental	53
3.4.	Indução da síndrome metabólica com dieta hipercalórica rica em gordura	55
3.5.	Indução da doença periodontal experimental com ligadura	56
3.6.	Administração do agente probiótico	57
3.7.	Eutanásia e coleta de materiais para análise	57
3.8.	Parâmetros Antropométricos e Metabólicos	58
3.8.1.	Perfil lipídico	58
3.8.2.	Glicemia em jejum	59
3.8.3.	Teste de Tolerância à Glicose (TTG)	59
3.8.4.	Dosagem de Insulina	59
3.8.5.	Avaliação da Resistência à Insulina	59
3.8.6.	Aferição da Pressão Arterial Média	59
3.8.7.	Análise de proteinúria	60
3.8.8.	Análises histomorfométrica e histopatológica	60
3.9.	Análise da expressão gênica – qRT-PCR em tempo real	61
3.10.	Perfil microbiológico intestinal - Coleta de fezes e qRT-PCR	62
3.11.	Variáveis de resultado	64
3.12.	Análise estatística	64
4.	<i>RESULTADOS</i>	65
4.1.	Parâmetros antropométricos (Pesagem semanal, Circunferência abdominal, Índice de massa corporal (IMC))	66
4.2.	Perfil lipídico (LDL, HDL, Colesterol total, Ácidos Graxos)	66

4.3. Perfil glicêmico (HOMA-IR; Glicemia em jejum; Teste de Tolerância à Glicose).....	68
4.4. Aferição da Pressão Arterial Média.....	70
4.5. Análise de proteinúria.....	71
4.6. Análises histomorfométrica e histopatológica.....	72
4.6.1. Mandíbula.....	72
4.6.2. Baço.....	77
4.6.3. Fígado.....	79
4.6.4. Intestino delgado.....	82
4.7. Análise da expressão gênica – qRT-PCR em tempo real.....	85
4.7.1. Expressão relativa FABP4/Actina.....	85
4.7.2. Expressão relativa LEPR/Actina.....	86
4.7.3. Expressão relativa NAMPT/Actina.....	87
4.8. Perfil microbiológico intestinal – qRT-PCR.....	88
4.9. Correlação entre perda óssea alveolar e SM e parâmetros microbiológicos, genéticos e metabólicos.....	89
5. <i>DISCUSSÃO</i>	91
6. <i>CONCLUSÃO</i>	107
7. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	109
8. <i>ANEXO</i>	125

*1. REVISÃO DE LITERATURA E
INTRODUÇÃO*

1.1. Doença periodontal

A Doença Periodontal (DP) se apresenta como uma resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro frente a uma microbiota patogênica e tem alta complexidade quanto à sua etiologia, classificação, tratamento e manutenção^{1,2}. O complexo microbiano coloniza as regiões sulculares entre a superfície do dente e a margem gengival e leva, por meios diretos e indiretos, à perda de inserção, formação de bolsa periodontal e perda óssea alveolar³. Todavia, o biofilme, *per si*, é responsável por uma baixa proporção de variações na expressão da DP⁴.

A DP é a condição bucal mais comum da população humana, afetando cerca de 50% da população mundial^{5,6}. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde⁶, em comparação com os países desenvolvidos, as nações em desenvolvimento apresentam maior prevalência de cálculo e sangramento à sondagem entre adolescentes. A proporção de adolescentes com cálculo varia de 35% a 70% nos países em desenvolvimento, enquanto foi de 4% a 34% nos países desenvolvidos⁶. Da mesma forma, 14-47% das populações adultas nos países desenvolvidos tinham depósitos de cálculo em comparação com 36-63% dos adultos nos países em desenvolvimento. No entanto, os países desenvolvidos apresentam maior percentual de indivíduos com bolsas periodontais de 4 a 5 mm⁶. Um levantamento epidemiológico realizado nos Estados Unidos demonstrou que um em cada dois americanos com idade superior a 30 anos possui DP⁷. Neste estudo, 47% da amostra examinada, representando 64,7 milhões de adultos, apresentava periodontite nas formas leve (8,7%), moderada (30%) e severa (8,5%). Para adultos com 65 anos de idade ou mais, o percentual de ocorrência de periodontite moderada ou severa foi de 64%⁷. Embora muitas vezes seja negligenciada, a DP e a perda de elementos dentais podem afetar diretamente a qualidade de vida dos indivíduos, uma vez que a boca (em sua integridade) é crucial para reprodução de sons, aparência, alimentação, socialização e saúde geral⁸. Nesse cenário, a saúde pública, as Universidades e pesquisadores constituem papel fundamental no desenvolvimento de estratégias para promoção de saúde periodontal, diagnóstico precoce, tratamento efetivo e, principalmente, conscientização de pacientes e cirurgiões-dentistas sobre a importância da DP e seu impacto na saúde integral do indivíduo, na qual se inclui: qualidade de vida, saúde bucal e sistêmica.

Hajishengallis e Lamont⁹ propuseram um novo modelo de patogênese periodontal baseado nos conceitos de sinergismo e disbiose polimicrobiana. Foi proposto que a destruição periodontal é desencadeada após um desequilíbrio da comunidade microbiana

e, não somente, por periodontopatógenos específicos, como proposto previamente¹⁰. Já foi demonstrado que alterações na comunidade microbiana (disbiose) do biofilme dentário estão associadas a mudanças no estado clínico dos tecidos do hospedeiro¹¹. Fatores de risco adquiridos e ambientais (ex.: *diabetes mellitus*¹², tabagismo¹³, hipertensão¹⁴ e obesidade¹⁵), bem como algumas características geneticamente transmitidas podem acentuar a resposta inflamatória decorrente da agressão bacteriana e, eventualmente, a suscetibilidade à DP⁴. De fato, há um ciclo contínuo de interação hospedeiro-bactéria, no qual a inflamação pode ser gatilho para uma disbiose do microbioma e o inverso também é verdadeiro¹⁶. Desse modo, a estabilidade da composição microbiana do biofilme parece ser um bom preditor da saúde periodontal.

1.2. Síndrome metabólica

A magnitude da resposta imunoinflamatória, em nível celular e molecular, é ditada pelas características genéticas e epigenéticas do hospedeiro associadas às várias exposições sistêmicas/ambientais^{17, 18}. Nesse contexto, tem sido sugerido que o processo inflamatório poderia atuar como um elo entre a periodontite e doenças sistêmicas, tais como doenças cardiovasculares (DCVs) ateroscleróticas ou síndrome metabólica (SM)¹⁹. A SM é uma doença altamente prevalente e multifatorial, sendo caracterizada, principalmente, pela presença de, pelo menos, três das seguintes patologias: hiperglicemia, obesidade, alteração nos níveis de colesterol e triglicerídeos e hipertensão²⁰. Atualmente, esta síndrome tem despertado amplo interesse no campo da saúde, uma vez que é apontada como fator preponderante para a ocorrência de eventos cardiovasculares. Constata-se que cada componente da SM, individualmente, aumenta em até três vezes o risco para as DCVs²¹. Acredita-se que o estado contínuo pró-inflamatório do indivíduo pode contribuir para o seu desenvolvimento. A Proteína C-reativa, que é uma proteína plasmática reagente de fase aguda produzida pelo fígado, apresenta-se em uma concentração muito baixa em indivíduos saudáveis. Contudo, na presença de infecções ou de estímulos inflamatórios, sua concentração aumenta em até 1.000 vezes. É considerada um indicador sensível de inflamação, com conexão positiva com a resistência à insulina, hiperinsulinemia compensatória, algumas manifestações da SM e com o risco de DCVs^{22, 23}.

O grupo das doenças crônicas não transmissíveis, como as comorbidades da SM, são causas importantes de morte no Brasil. São inúmeros fatores de risco relacionados a

este tipo de doença, cuja atenuação pode colaborar para o declínio da mortalidade. Estudos têm demonstrado que a mortalidade coronariana cardiovascular é maior nos indivíduos com SM devido aos hábitos alimentares ocidentais, atingindo dezenas de milhões de indivíduos em todo o mundo²⁴⁻²⁶. A identificação precoce, tratamento e prevenção da SM é um grande desafio para ser superado, visto que o mundo, atualmente, enfrenta uma epidemia de excesso de peso e estilo de vida sedentário. Não obstante, as comorbidades da SM têm sido reportadas, amplamente, como fatores de risco para a DP, outro grande problema de saúde pública mundial^{12, 13,14, 15, 18, 20,27, 28 28,29}.

1.3. Plausibilidade biológica do elo Doença periodontal-Síndrome Metabólica

A periodontite pode predispor os indivíduos ao desenvolvimento de SM por meio de mecanismos desencadeados pela translocação de bactérias orais e / ou seus produtos para a circulação sanguínea. Essas bactérias podem provocar processos inflamatórios que iniciam ou exacerbam a SM¹⁸. Embora o mecanismo que explica essa conexão não seja bem definido, acredita-se que as doenças inflamatórias crônicas podem aumentar a inflamação sistêmica e aumentar o risco de DCVs e diabetes, com evidências de que o risco está associado à gravidade da inflamação³⁰, o que dá suporte a uma conexão direta entre o aumento da inflamação e a SM.

Já existe um lastro de evidências que permite inferir que há uma via de mão dupla entre DP e SM. Um estudo envolvendo uma população tailandesa³¹ concluiu que a SM pode ser considerada um forte fator de risco para a periodontite e ressaltou a importância dos cirurgiões-dentistas considerarem a relação SM-DP na determinação de condutas terapêuticas periodontais. Um estudo acompanhou 1.023 indivíduos que realizaram exames médicos e odontológicos entre 2002 e 2006 e nos quais todos os componentes da SM estavam dentro dos valores padrões em 2002. A associação entre a presença de bolsas periodontais e a conversão positiva dos componentes da SM foi investigada usando análise de regressão logística múltipla, odds ratio (ORs) e intervalos de confiança de 95% (ICs). A presença de bolsas periodontais foi associada a uma conversão positiva de um ou mais componentes metabólicos durante o período de observação de 4 anos, sugerindo que a prevenção da doença periodontal pode prevenir a síndrome metabólica³². Uma metanálise demonstrou que indivíduos com SM apresentam probabilidade duas vezes maior de desenvolver DP do que a população em geral³³. Essa via se torna mais evidente, na medida em que foi demonstrado que há benefícios do tratamento periodontal não

cirúrgico, por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR), em pacientes portadores de SM e DP. Após a RAR, foram observados nos indivíduos tratados a redução das concentrações de Interleucina 1 β (IL-1 β) e Interleucina 6 (IL-6) no fluido crevicular gengival (FCG), de Proteína C reativa, da contagem de leucócitos total e triglicerídeos, bem como um aumento de lipoproteína de alta densidade (HDL)³⁴⁻³⁸.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a associação entre SM e DP, tais como o deslocamento sistêmico de bactérias periodontais^{16, 39}, a liberação de citocinas inflamatórias pelo tecido periodontal ou adiposo⁴⁰, o estresse oxidativo^{35, 41, 42} (EO), a presença de lipoproteínas pró-aterogênicas⁴³, a obesidade abdominal^{35, 44}, a reatividade cruzada e o mimetismo molecular bacteriano⁴⁵. Entre esses mecanismos, o EO parece ser um elo plausível capaz de ligar a fisiopatologia de ambas as condições, permitindo hipotetizar um relacionamento bidirecional entre elas.

O EO é uma condição na qual o equilíbrio entre a produção e a inativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) torna-se interrompida⁴⁶. As ROS têm um papel essencial em uma variedade de sistemas fisiológicos, mas, em uma condição de EO, contribuem para a disfunção celular. As condições presentes na SM (dislipidemia, hipertensão e hiperglicemia) promovem aumento de EO. Além disso, um aumento da ingestão calórica eleva a atividade metabólica, o que resulta em produção aumentada de ROS e resistência à insulina. Os pacientes obesos necessitam, então, de maiores doses de insulina para manter a homeostase da glicose no sangue. Esta condição, conhecida como hiperinsulinemia, pode evoluir para o diabetes mellitus tipo 2^{42,47}. A consequente hiperglicemia e um estado de oxidação promovem a gênese de produtos finais de glicosilação avançada (AGE)⁴². Os AGEs podem atuar causando apoptose em osteoblastos e fibroblastos⁴⁸, o que pode influenciar na homeostase do osso alveolar e na progressão da periodontite. A alta expressão de receptores de AGEs nos tecidos periodontais⁴⁹ é um achado importante que pode explicar a sensibilidade desses tecidos aos produtos derivados do dano oxidativo. Da mesma forma que em indivíduos com SM, diversos estudos têm demonstrado um aumento nos produtos do dano oxidativo no sangue periférico de pessoas com periodontite quando comparadas a indivíduos sem periodontite⁵⁰⁻⁵². Portanto, este estado pró-oxidativo acentuado e a redução da capacidade antioxidante encontrada em indivíduos com periodontite pode levar a uma diminuição da sensibilidade à insulina, a qual pode ser agravada em indivíduos com uma dieta rica em gordura⁴².

O tecido adiposo branco é descrito como um órgão endócrino que secreta uma ampla variedade de fatores chamados adipocinas. As adipocinas são moléculas pleiotrópicas produzidas, majoritariamente, por adipócitos que contribuem para o chamado estado inflamatório de baixo grau de indivíduos obesos, criando um grupo de aberrações metabólicas, incluindo doenças autoimunes e inflamatórias que afetam as articulações e os ossos^{53,54}. A ideia de que a obesidade pode contribuir para a periodontite por meio de níveis alterados de adipocinas, como a adiponectina, é apoiada por um estudo por Zhang et al.⁵⁵. Os autores usaram um modelo experimental de periodontite em camundongos *knock-out* para adiponectina, além da obesidade induzida por dieta, para avaliar o potencial terapêutico da adiponectina. Curiosamente, a infusão de adiponectina sistêmica inibiu a infiltração de células inflamatórias, a atividade dos osteoclastos e a perda óssea alveolar nos camundongos. Este estudo demonstra que a adiponectina tem efeitos benéficos sobre o periodonto e sugere que níveis reduzidos de adiponectina, como observado na obesidade, podem representar um mecanismo patogênico pelo qual a obesidade contribui para a periodontite.

Alguns estudos revelaram que as adipocinas, como visfatina, leptina e adiponectina, são produzidas nas células periodontais e reguladas por bactérias periodontopatogênicas⁵⁶⁻⁶⁰. Desta forma, as adipocinas também podem representar um mecanismo pelo qual as infecções periodontais podem impactar em doenças sistêmicas. Na maioria dos pacientes obesos, um tecido adiposo disfuncional liga a obesidade a outras manifestações, como DCVs e SM⁶¹. Essa disfunção é causada por um desequilíbrio complexo entre fatores genéticos e ambientais, que se caracteriza por hipertrofia dos adipócitos, hipóxia e inflamação⁶¹. A consequência direta dessa disfunção é que a secreção de adipocina é desviada para um padrão de secreção aterogênica, diabetogênica e pró-inflamatória. De acordo com a literatura recente, todas as adipocinas conhecidas são marcadamente desreguladas quando há acúmulo anormal de gordura abdominal, promovendo distúrbios metabólicos e cardiovasculares^{59, 62, 63}. As adipocinas foram recentemente propostas como novos biomarcadores e reguladores da SM, dada a associação da concentração plasmática das adipocinas e da SM⁶⁴. Entre as diferentes adipocinas, a leptina, a nicotinamida fosforibosil transferase (NAMPT ou visfatina) e proteína ligante de ácidos graxos tipo 4 (FABP4) foram identificadas como fatores relevantes envolvidos nas interações entre o metabolismo e os distúrbios periodontais^{57, 65, 66}. Pesquisas recentes sugerem que a leptina pode ser um fator importante que liga a obesidade à síndrome metabólica e às DCVs⁶⁷. Além disso, várias observações clínicas

apoiam uma associação entre os níveis destas adipocinas e disfunção metabólica relacionada à obesidade^{65, 68-70}.

As adipocinas não apenas regulam a sensibilidade à insulina e o gasto de energia, mas também a cicatrização de feridas e a inflamação. Enquanto a visfatina, a leptina e a resistina possuem características pró-inflamatórias, a adiponectina exerce efeitos anti-inflamatórios. A obesidade leva a um aumento da síntese de adipocinas pró-inflamatórias e diminuição da produção de adipocinas anti-inflamatórias. O desequilíbrio entre as adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias resulta em um estado inflamatório de baixo grau, conforme observado na obesidade e no diabetes mellitus^{71, 72}. Pensa-se que as adipocinas não contribuem apenas para o estado de inflamação subclínico na obesidade, mas que tais moléculas também podem exercer um elo crítico entre obesidade e infecção periodontal. O aumento dos níveis plasmáticos de adipocinas pró-inflamatórias, conforme observado em uma série de doenças sistêmicas, pode tornar os indivíduos afetados mais suscetíveis à infecção e destruição periodontais⁵⁵.

A visfatina é produzida predominantemente por macrófagos e adipócitos no tecido adiposo e foi originalmente denominado como fator 1 de aumento de colônias de células pré-B⁷³. Esta molécula é capaz de estimular a produção de moléculas inflamatórias, de ativar o fator nuclear-KB (NF-KB), sendo responsável pela síntese do dinucleotídeo nicotinamida adenina, essencial para o metabolismo celular⁷³. A visfatina induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e também atua como fator quimiotático. Esta adipocina estimula uma variedade de células a sintetizar mediadores inflamatórios e proteases e pode inibir a apoptose em células inflamatórias. Níveis plasmáticos aumentados de visfatina foram encontrados em uma série de doenças e condições inflamatórias, como diabetes tipo 2, obesidade, SM, aterosclerose, câncer, artrite reumatoide e sepse⁷⁴. A redução do peso corporal por meio de exercícios físicos pode levar à diminuição dos níveis de visfatina. Uma vez que os níveis plasmáticos de visfatina encontram-se aumentados na obesidade, especula-se que esta adipocina pode aumentar a inflamação periodontal e, assim, aumentar o risco de periodontite ou cicatrização periodontal comprometida em indivíduos obesos. Curiosamente, a visfatina também foi detectada no FCG, sendo que esta adipocina pode estar aumentada na gengivite e periodontite, independentemente da presença de obesidade⁷⁵. Após a implementação da terapia periodontal não cirúrgica, suas concentrações foram reduzidas nos pacientes periodontais^{76, 77}. Estas observações sugerem que a visfatina também pode ser produzida

localmente no periodonto e regulada por infecção bacteriana e / ou inflamação, desempenhando assim um papel na patogênese da periodontite.

A leptina é outra adipocina derivada do tecido adiposo secretada proporcionalmente ao tamanho e número de adipócitos. Da mesma forma que a visfatina, os níveis plasmáticos de leptina são aumentados na obesidade e diminuídos após a perda de peso^{71, 78}. Embora a leptina seja produzida principalmente pelo tecido adiposo, essa adipocina também é sintetizada, em menores concentrações, em outros tecidos. As suas principais funções são a inibição do apetite, estímulo do gasto de energia e modulação do metabolismo lipídico e ósseo, além de efeitos na coagulação, hematopoiese, função das células B pancreáticas e sensibilidade à insulina⁶⁷. Além disso, a leptina regula os processos imunoinflamatórios, principalmente com ações pró-inflamatórias⁷⁹. Estudos têm reportado que a DP resulta em níveis plasmáticos aumentados de leptina e a terapia periodontal causa uma diminuição nesses níveis plasmáticos. Contudo, alguns estudos também demonstraram que os níveis de leptina encontram-se reduzidos no FCG e nos tecidos gengivais de pacientes com doença periodontal em comparação com indivíduos periodontalmente saudáveis^{57, 80-82}. Os efeitos da leptina são mediados pela ligação desta adipocina ao seu receptor (LEPR). Devido ao *splicing* alternativo do gene LEPR, existem seis isoformas de LEPR. Alguns estudos⁸²⁻⁸⁴ também se concentraram na síntese local de leptina e seu receptor de comprimento total em tecidos periodontais, demonstrando que a leptina e seu receptor de comprimento total são produzidos no ligamento periodontal, células ósseas gengivais e alveolares. Após a ligação ao receptor, uma série de vias intracelulares e fatores de transcrição são ativados.

As ações regulatórias da leptina e da visfatina sobre a síntese de mediadores inflamatórios e proteases foi outro foco de alguns estudos. Em fibroblastos do ligamento periodontal, a leptina provoca significativa supra regulação de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e *downregulation* de ciclooxigenase 2, enquanto a visfatina provoca um aumento da atividade do *Fusobacterium nucleatum*^{85, 86}. A visfatina aumenta significativamente a síntese de metaloproteinase da matriz 1 (MMP-1) e ligante de quimiocina 2 (CCL2), sendo que seus níveis são afetados pela IL-1 β e pela *Porphyromonas gingivalis*⁸⁶. Sendo assim, a visfatina pode contribuir para o desenvolvimento da periodontite por meio da regulação positiva de MMP-1 e CCL2 em células do ligamento periodontal. Níveis aumentados de visfatina, como encontrados em indivíduos obesos, são um mecanismo pelo qual a obesidade pode conferir um risco aumentado de periodontite. Além disso, os sinais microbianos e inflamatórios podem

aumentar a síntese de visfatina em células do ligamento periodontal e, assim, contribuir para o aumento dos níveis gengivais e séricos desta adipocina, como encontrado na periodontite⁸⁶.

A FABP4, também conhecida como proteína de adipócito 2 (aP2), é um fator crucial para a homeostase e a resistência, mas mal adaptada a condições de excesso de nutrientes ou estresse crônico. Resumidamente, FABP4 é uma das proteínas mais abundantes em adipócitos^{87 80}, com papéis na manutenção da homeostase dos adipócitos, regulando a lipólise e a adipogênese. Em condições de lipólise, como jejum, sugere-se que a FABP4 ligue-se a ácidos graxos livres no citoplasma, sendo capaz de modular a atividade de enzimas lipolíticas⁸⁸, promovendo a liberação de lipídios no interior da celular. Essa resposta é benéfica para a sobrevivência no contexto de inanição, quando tecidos podem utilizar lipídios como fonte de energia⁸⁹. No entanto, na obesidade, onde há tecido adiposo abundante, resistência à insulina e lipólise descontrolada, a FABP4 está constantemente sendo ativada. Isso leva a efeitos negativos a jusante em diversos tecidos, incluindo o fígado, o sistema cardiovascular e o pâncreas⁹⁰. Há relatos que indicam que o nível sérico de FABP4 sofre redução após o tratamento periodontal^{66, 91}. Ressalte-se que a FABP4 é uma proteína de transporte intracelular para ácidos graxos, e é intimamente associada a doenças sistêmicas por sua ligação a ácidos graxos de cadeia longa saturados e insaturados⁹². Considerando que a FABP4 é um fator de risco importante para várias doenças, o estudo de Li et al.⁹² promove uma indagação relevante, não apenas na correlação entre os níveis circulantes de FABP4 e periodontite, mas também na contribuição potencial da periodontite para a progressão de doenças sistêmicas. O desenvolvimento e a progressão dessas doenças dependem principalmente de alterações patológicas nas células do parênquima, mas também foi sugerido que ativação de macrófagos por vários estímulos microambientais desempenha um papel crítico nesta progressão, bem como nas defesas contra vários agentes prejudiciais⁹³. Portanto, os macrófagos podem fazer parte de uma rede de comunicação que liga a periodontite às doenças sistêmicas. Os patógenos periodontais agem diretamente nos macrófagos próximos em tecido periodontal e são capazes de migrar para vários tipos de tecidos e afetam macrófagos residentes⁶⁶. Consequentemente, pode ser muito importante analisar a ativação de macrófagos induzida por patógenos periodontais e as respostas celulares subsequentes para descobrir os mecanismos moleculares de doenças sistêmicas. A expressão de FABP4 em macrófagos, bem como em adipócitos, pode desempenhar um papel na progressão de doenças sistêmicas, modulando a absorção de ácidos graxos.

Recentemente, demonstrou-se que a infecção por *P. gingivalis* ou *F. nucleatum* induz significativamente a expressão de FABP4, uma das mais importantes adipocinas que desempenham um papel na progressão de doenças metabólicas. A expressão de FABP4 induzida por patógeno periodontal em macrófagos promove a captação de lipídios por essas células⁶⁶. A expressão de FABP4 induzida por patógeno periodontal foi dependente da via c-Jun N-terminal cinase (JNK). A inibição de JNK reduziu a captação de lipídios pela redução da expressão de FABP4. Desta forma, é possível acreditar que os patógenos periodontais podem estimular a captação de lipídios em macrófagos modulando a expressão de FABP4⁶⁶. Esses achados apoiam fortemente a hipótese de que a periodontite pode afetar a progressão de várias doenças sistêmicas, como a SM e vice-versa.

1.4. Estratégias terapêuticas para a associação SM-DP - nova perspectivas?

Considerando que o efetivo controle de uma das condições (SM ou DP) resultará numa melhora da outra, é importante ressaltar que a RAR, mesmo considerada padrão ouro no tratamento da periodontite, não produz os resultados clínicos satisfatórios em casos graves quando usada isoladamente em pacientes altamente suscetíveis à periodontite⁹⁴. Isso provavelmente ocorre porque a RAR sozinha é incapaz de produzir uma mudança suficientemente profunda na ecologia microbiana oral⁹⁵, a fim de produzir uma nova comunidade microbiana estável e compatível com a saúde periodontal. Desse modo, o uso de estratégias terapêuticas adjuvantes ao tratamento clínico periodontal convencional parece ser necessário em pacientes portadores de SM. Existem evidências de que a resposta inflamatória sistêmica influencia a composição do biofilme⁹⁶. Tem sido demonstrado que o uso associado de antimicrobianos sistêmicos e RAR pode ter um impacto maior sobre os marcadores de inflamação sistêmica em pacientes com DP^{97, 98} quando comparado ao uso isolado da RAR. Uma maior redução da inflamação sistêmica poderia ter um impacto direto na melhora das comorbidades da SM. Entretanto, nenhum efeito adicional da terapia antibiótica à RAR durante o tratamento periodontal básico foi observado na pressão arterial, nos níveis de triglicérides e no estado metabólico geral de pacientes portadores de SM e DP. A magnitude do efeito adicional da terapia antibiótica nos parâmetros clínicos periodontais também pareceu reduzida nesses pacientes⁹⁹. Portanto, novas abordagens preventivas e de tratamento mais eficazes para gengivite e periodontite, alicerçadas nos avanços da compreensão da modulação de resposta do

hospedeiro e resolução da inflamação, bem como no gerenciamento direto da microbiota são urgentemente necessários.

O uso de probióticos tem atraído o interesse da comunidade científica como uma nova alternativa para o tratamento da periodontite, uma vez que os mesmos podem ter ações antimicrobianas e, também, são capazes de modular a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro¹⁰⁰. Eles são definidos como microrganismos vivos, principalmente bactérias, seguros para o consumo e capazes de produzirem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades suficientes¹⁰¹. A introdução de probióticos visando promover a saúde periodontal considera três fatores etiológicos determinantes da periodontite: 1) a suscetibilidade do hospedeiro⁴, 2) a presença de bactérias patogênicas¹⁰ e 3) a redução ou ausência das então chamadas bactérias benéficas¹⁰²⁻¹⁰⁴. Neste contexto, requalificar positivamente o ambiente microbiano bucal por meio do uso de probióticos é uma estratégia que pode auxiliar na prevenção e no tratamento da DP.

Os estudos que avaliaram os efeitos dos probióticos na prevenção, controle e tratamento da DP demonstraram que os mesmos podem promover a redução de periodontopatógenos^{102, 104}, melhorar os parâmetros clínicos periodontais^{105, 106}, diminuir os níveis salivares de prostaglandina E2 e MMP, bem como os níveis de citocinas pró-inflamatórias no FCG¹⁰⁷, inibir o desenvolvimento de gengivite e potencializar os efeitos da RAR^{105, 108, 109}.

Enquanto a maioria dos estudos que avaliaram os efeitos de probióticos na DP investigaram a atuação de cepas do gênero *Lactobacillus*, poucos estudos avaliaram o efeito *in vivo* de bactérias do gênero *Bifidobacterium*^{102, 104, 106, 107, 109-111} no tratamento da DP. Alguns desses estudos observaram que a utilização do *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 promoveu um efeito protetor contra a perda óssea alveolar e de inserção conjuntiva em ratos com periodontite experimental, modificando parâmetros imunoinflamatórios e microbiológicos^{110, 111}. Em um estudo clínico¹⁰⁶, foi observado que o uso de um iogurte probiótico suplementado com *Bifidobacterium* pode ter um efeito positivo no controle de placa e nos parâmetros inflamatórios periodontais. Estes resultados estão em consonância com os achados obtidos, posteriormente, por Invernici et al^{102, 104}. Trinta pacientes foram recrutados e monitorados clinicamente no início do estudo (antes da RAR) e após 30 e 90 dias. Os pacientes foram aleatoriamente designados para o grupo Teste (RAR + Probiótico, n = 15) ou Controle (RAR + Placebo, n = 15). Pastilhas probióticas foram usadas por 30 dias. Tecidos gengivais e saliva foram

analisados imunologicamente. Os autores reportaram que o grupo Teste apresentou diminuição da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica significativamente maiores que aqueles do grupo Controle, após 90 dias. O grupo Teste também demonstrou significativamente menos patógenos periodontais dos complexos vermelho e laranja, bem como níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias quando comparado ao grupo Controle. Apenas o grupo Teste apresentou aumento no número de cópias de DNA de *B. lactis* HN019 no biofilme subgengival aos 30 e 90 dias. Além disso, o grupo Teste apresentou menor índice de placa (30 dias) e menor sangramento gengival (90 dias) quando comparado ao grupo controle. Maiores expressões de beta defensina 3 (BD-3), *receptor toll like-4* (TLR-4) e *cluster of differentiation-4* (CD-4) foram observadas nos tecidos gengivais no grupo Teste quando comparado ao grupo Controle. E, por fim, os autores demonstraram que *B. lactis* HN019 reduziu a adesão de *P. gingivalis* a células epiteliais bucais e mostrou potencial antimicrobiano contra periodontopatógenos.

A utilização de probióticos também é uma alternativa promissora no tratamento e prevenção da SM¹¹²⁻¹¹⁷, podendo atuar nas suas principais comorbidades. Os probióticos são capazes de incorporar o colesterol em sua membrana celular, causando uma absorção reduzida e, conseqüentemente, diminuindo os níveis séricos de colesterol total¹¹⁸. Além disso, os probióticos produzem hidrolases, que diminuem a absorção do colesterol através de uma maior excreção de sais biliares^{112, 119}. Probióticos podem atuar na pressão arterial influenciando no EO, no sistema de angiotensina, na inflamação sistêmica (atuando em TNF- α , Interleucina 1 α - IL-1 α e fator quimioatraente de monócitos 1 - MCP-1) e na produção de endotelina e peroxinitrito^{120, 121}. Corroborando a estes achados, foi demonstrado que a administração de *Lactobacillus fermentum* produtores de ácido ferúlico em ratos Zucker obesos reduziu os níveis de insulina em jejum, a resistência à insulina, os níveis séricos de triglicerídeos, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e os índices aterogênicos e ateroscleróticos. Além disso, a terapia probiótica aumentou significativamente os níveis de HDL, contribuindo para o controle dos marcadores envolvidos na patogênese da SM¹²².

Atualmente, tem sido proposto que a microbiota do intestino pode estar envolvida em doenças metabólicas associadas com a obesidade e a resistência à insulina¹²³. De fato, os seres humanos e a microbiota intestinal estão em uma relação simbiótica. A microbiota intestinal desempenha tarefas metabólicas e imunológicas importantes, sendo que alterações na sua composição podem prejudicar a homeostasia do organismo. Teoricamente, todas as condições sistêmicas associadas ao comprometimento da

microbiota intestinal, dramaticamente afetada pela ingestão de dieta altamente rica em gorduras, poderiam ser beneficiadas pela modulação terapêutica desta microbiota^{124, 125}.

A administração de probióticos contendo *Bifidobacterium* está associada a uma melhor atuação da barreira epitelial do intestino, promovida pelo aumento da expressão de proteínas nesta região com reflexos diretos na saúde sistêmica geral¹²⁶. De fato, a modulação dietética da microbiota do intestino com o aumento de *Bifidobacterium* foi capaz de reduzir o acúmulo de gordura visceral (esteatose hepática e gordura mesentérica), bem como melhorar a sensibilidade à insulina em ratos com dieta rica em gordura¹²⁷. Também já foi demonstrado que a administração de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* reduziu a esteatose hepática e o número de adipócitos e enterócitos em ratos obesos, melhorou a função dos macrófagos e células dendríticas, aumentou a produção de citocinas e induziu a proliferação de linfócitos T¹²⁸. Além disso, a administração de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* em ratos com dieta rica em gordura foi capaz de reduzir a infiltração de macrófagos para o interior do tecido adiposo, contribuindo para a melhoria da homeostase glicose-insulina e da esteatose hepática¹²⁹.

A possibilidade de tratar a DP e seus possíveis efeitos na SM com métodos não-invasivo, menos estressante e de maior *compliance* pelos pacientes é particularmente atraente. Novas abordagens terapêuticas também precisam ser melhor investigadas para o tratamento de pacientes portadores de SM e suas comorbidades, já que métodos atuais envolvendo modificações do estilo de vida e uso de agentes farmacológicos nem sempre são efetivos¹³⁰, além de gerar efeitos colaterais pelo uso constante de medicamentos. As evidências comentadas até aqui apontam que a utilização de probióticos pode ser uma promissora alternativa terapêutica/preventiva para a SM e para a periodontite. Em um estudo prévio realizado por nosso grupo¹³², foi demonstrado o potencial protetor da terapia probiótica com o *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 nos tecidos periodontais de ratos com SM e DP, seja por meio da menor perda óssea interproximal ou pela redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, restam muitas dúvidas sobre os mecanismos intrínsecos (metabólicos e gênicos) acerca da influência que o estado hiper inflamatório vivenciado por indivíduos com SM exerce na progressão e agravamento da DP, bem como de que formas o uso do probiótico pode mitigar os potenciais danos causados pela associação dessas duas doenças. Sabe-se, por exemplo, que as adipocinas podem afetar a progressão e tratamento da DP em indivíduos obesos^{58, 81-84, 86, 131} e que estas substâncias sofrem modulação quando agentes probióticos são utilizados¹³². Contudo, nenhum estudo ainda avaliou o comportamento de adipocinas na

associação SM-DP e tratamento com probióticos. O propósito deste estudo será avaliar diferentes mecanismos imunológicos, microbiológicos, genéticos e metabólicos envolvidos na correlação entre a perda óssea alveolar decorrente de DP experimental e a SM induzida por dieta hipercalórica rica em gorduras em ratos, bem como os possíveis efeitos do agente probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 como estratégia terapêutica e/ou preventiva para a associação DP-SM.

Os resultados desta tese poderão ser bastante úteis para o futuro desenvolvimento de novos produtos ou estratégias biotecnológicas destinados ao controle do biofilme bacteriano bucal por intermédio de parcerias com o setor privado (empresas de produtos de higiene bucal e/ou ingredientes alimentícios especializados), bem como para o estabelecimento de novos regimes/protocolos voltados para o tratamento e manutenção do paciente periodontal com SM. As pesquisas com probióticos no campo da Periodontia podem também criar bases sólidas para o estabelecimento de novos produtos capazes de substituir o uso sistêmico de antibióticos no tratamento de formas severas de periodontite, evitando o desenvolvimento crescente de cepas bacterianas resistentes e outros efeitos adversos

2. PROPOSIÇÃO

2.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar diferentes mecanismos imunológicos, microbiológicos, genéticos e metabólicos envolvidos na correlação entre a perda óssea alveolar decorrente de DP experimental e a SM induzida por dieta hipercalórica rica em gordura em ratos, bem como os possíveis efeitos do agente probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 como estratégia terapêutica e/ou preventiva para a associação DP-SM.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a perda óssea alveolar na região de bifurcação do 1o molar inferior por meio de análises histomorfométricas;
2. Avaliar o conteúdo do infiltrado inflamatório periodontal, extensão da inflamação, padrão do tecido conjuntivo e perfil do osso alveolar presente na região de bifurcação do 1o molar inferior por meio de análise histopatológica;
3. Avaliar, histomorfometricamente, os efeitos da DP, da SM e do uso do PROB, nos tecidos hepáticos, esplênicos e intestinais;
4. Avaliar os seguintes parâmetros metabólicos: níveis séricos de glicose, colesterol, HDL, LDL triglicérides, ácidos graxos livres e insulina de jejum;
5. Avaliar os seguintes parâmetros antropométricos: peso, índice de massa corporal - IMC e circunferência abdominal;
6. Avaliar a expressão gênica de adipocinas (LEPR, NAMPT e FABP4) no tecido adiposo por meio da Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em tempo real (qRT-PCR);
7. Avaliar os valores de proteinúria presentes na urina dos animais;
8. Avaliar o perfil microbiológico intestinal por meio de qRT-PCR a partir de amostras de fezes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cálculo do tamanho da amostra

Conforme descrito por da Silva et al¹³², o cálculo de tamanho amostral foi realizado pelo programa *Graphpad Statemate 2.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi calculado considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão entre os grupos EP e EP-PROB do estudo de Oliveira et al. (2022)¹³³, reconhecendo a diferença significativa de 0,18 mm² (δ) entre os grupos, intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), desvio padrão (σ) de 0,6 mm², as mudanças na média de área sem osso mensurada por meio de análise histomorfométrica na região de bifurcação como variável primária, um percentual de perda de animais em torno de 20% e $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$. O cálculo da amostra por grupo foi baseado na fórmula: n (tamanho amostral) $\geq \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$. Um total de 12 animais por grupo experimental foi utilizado.

3.2. Apreciação ética

Foram respeitados todos os princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivissecção dos mesmos (Lei 11.794/2008), a Declaração Universal dos Direitos dos Animais da UNESCO (Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e a legislação em vigor (Lei9605/1998). Somente após a apreciação e aprovação pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP), esta pesquisa foi realizada (Protocolo nº 2017.1.886.58.9).

3.3. Modelo experimental

Foram utilizados 96 ratos machos Wistar Hannover com 3 semanas de idade, recém desmamados. Os animais foram acomodados em duplas nas gaiolas e submetidos a um período de 7 dias de aclimação com o ambiente e com equipe de execução do projeto. A sala foi climatizada a uma temperatura de 22±2°C e com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Os animais foram divididos de acordo com o protocolo alimentar adotado: metade dos animais recebeu dieta hipercalórica rica em gordura para indução da SM e a outra metade recebeu ração padrão. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos

com doença periodontal induzida por ligaduras (DP) e grupos controle (C), nos quais a DP não foi induzida¹³⁴. Cada um desses 2 grupos foi ainda subdividido em 2 subgrupos, de acordo com a administração ou não de terapia probiótica, constituindo as seguintes situações:

- Grupo C – ratos alimentados com dieta padrão, sem DP induzida por ligadura e sem administração oral de probiótico (n = 12);
- Grupo CP – ratos alimentados com dieta padrão, sem DP induzida por ligadura e administração oral de probiótico (n = 12);
- Grupo DP – ratos alimentados com dieta padrão, com DP induzida por ligadura e sem administração oral de probiótico (n = 12);
- Grupo DPP – ratos alimentados com dieta padrão, com DP induzida por ligadura e administração oral de probiótico (n = 12);
- Grupo SM – ratos alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura, sem DP induzida por ligadura e sem administração oral de probiótico (n = 12);
- Grupo SMP – ratos alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura, sem DP induzida por ligadura e administração oral de probiótico (n = 12);
- Grupo SMDP – ratos alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura, com DP induzida por ligadura e sem administração oral de probiótico (n = 12);
- Grupo SMDPP – ratos alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura, com DP induzida por ligadura e administração oral de probiótico (n = 12).

O experimento foi realizado em quatro replicatas, abrangendo todos os grupos experimentais, para minimizar possíveis vies, e seguindo todas as etapas conforme delineamento experimental ilustrado na Figura 1.

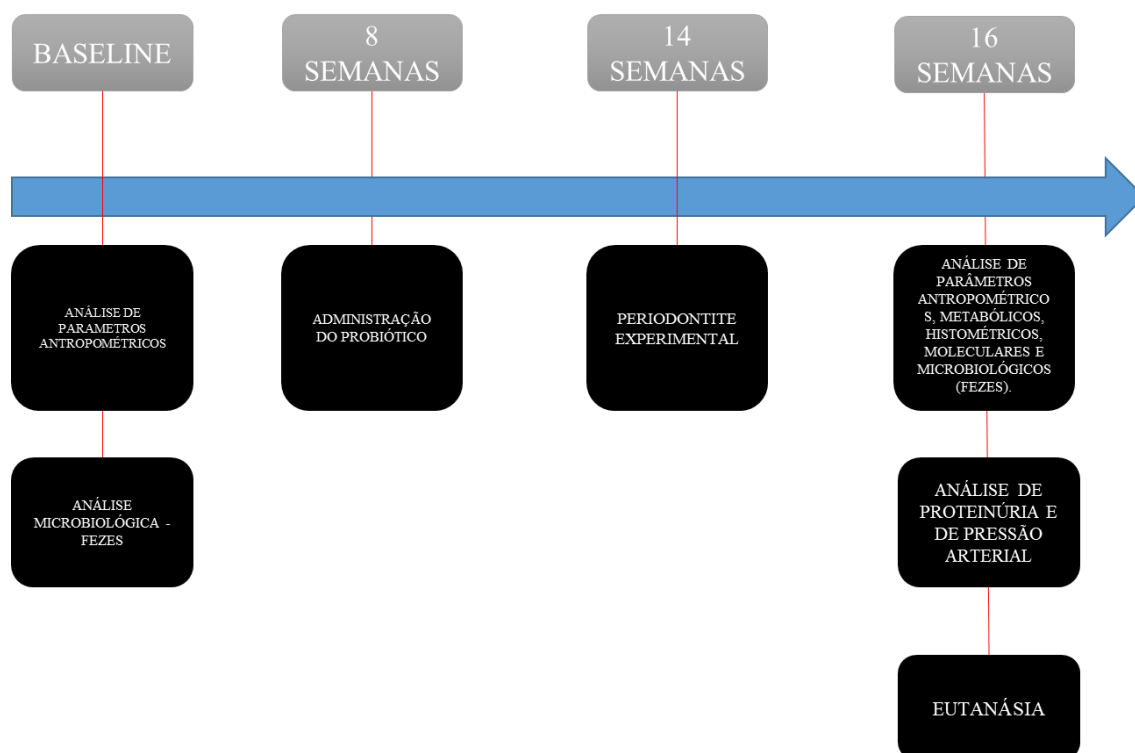


Figura 1: Delineamento do estudo experimental.

3.4. Indução da síndrome metabólica com dieta hipercalórica rica em gordura

Os animais receberam dieta hipercalórica rica em gordura (Tabela 1) durante 8 semanas para indução da SM^{135, 136}, preparada especialmente para pesquisa (Rhooster Indústria e Comércio - Araçoiaba da Serra, SP, Brasil). A dieta era renovada diariamente, fornecida *ad libitum*, e foi mantida até o final do experimento, totalizando 16 semanas de alimentação hipercalórica. Todos os animais foram acompanhados diariamente. Só foram incluídos no estudo os animais que, ao final do experimento, apresentaram alterações em pelo menos 3 parâmetros metabólicos e antropométricos: peso, perfil lipídico, IMC, pressão arterial, glicemia, insulina, *homeostasis model assessment for insulin resistance* (HOMA-IR) e/ou teste de tolerância à glicose, compatíveis com a SM conforme descrito em estudos anteriores^{136, 137}. Os animais não submetidos à indução da SM receberam ração considerada padrão para alimentação de ratos, também oferecida *ad libitum* durante 16 semanas (Tabela 1).

Macronutrientes	Dieta padrão	Dieta hipercalórica rica em gordura
Proteína (% kcal)	20	18,4

Carboidrato (%kcal)	70	21,3
Gordura (%kcal)	10	60,3
Conteúdo energético (kcal/g)	3,9	5,1

Tabela 1: Composição dos protocolos alimentares que foram utilizados no experimento (SILVA, 2021¹³⁴).

3.5 Indução da doença periodontal experimental com ligadura

Para a colocação da ligadura nos grupos SMDP, DP, SMDPP e DPP, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal, com solução de Cloridrato de Xilazina a 2% (2mg/mL) (Rompum - Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Ketamina a 10% (10mg/mL) (Dopalen® - Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil) nas respectivas doses de 10mg/Kg (Xilazina) e 80mg/Kg (Ketamina). Após a anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos mesmos, facilitando o acesso aos dentes posteriores da mandíbula. Com o auxílio de porta agulha tipo Castroviejo (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil) e sonda exploradora odontopediátrica (Golgran, São Paulo, SP, Brasil), foi colocado fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdo e direito de cada animal. Nos animais dos grupos DP, SMDP, DPP e SMDPP, a colocação de ligaduras ocorreu na 14^a semana do experimento. A presença das ligaduras nos animais foi verificada periodicamente e não houve necessidade de substituição para nenhum animal.



Figura 2: A) Fio de seda em posição para indução da doença periodontal no primeiro molar inferior.

3.6. Administração do agente probiótico

Conforme descrito previamente¹³⁴, *B. lactis* HN019 (HOWARU™ Bifido, E. I. Dupont®, Wilmington, DE, EUA) foi cultivado em meio MRS Agar (Man, Rogosa and Sharpe - D™ Lactobacilli MRS Broth, Sparks, MD, EUA) por 48 horas a 37°C sob condições de anaerobiose (GASPAK™ EZ Anaerobe Container System with indicator, Sparks, MD, EUA). A seguir, com auxílio de alça esterilizada, o inóculo bacteriano foi transferido para tubos de centrifugação tipo Falcon contendo pérolas de vidro e água destilada esterilizada. Após homogeneização em agitador de tubos (Phoenix AP 65, Araraquara, SP, Brasil), a suspensão foi submetida à diluição decimal seriada até 10¹⁰, em solução salina tamponada fosfatada (PBS), com pH 7,0. Aliquotas de 100 µL foram depositadas em placas de Petri contendo MRS Agar e semeadas com auxílio de bastão de vidro esterilizado. Após a semeadura, as placas foram incubadas em anaerobiose, durante 48 horas a 37°C. A padronização quantitativa dos inóculos foi obtida pela determinação da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Micronal - AJX -1000, São Paulo, SP, Brasil), bem como por contagem, em duplicata, do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

Nos grupos CP, DPP, SMP e SMDPP, o probiótico *B. lactis* HN019 foi adicionado diariamente na água dos animais na proporção de 1 x 10¹⁰ UFC/mL. Todos os animais ingeriram a mesma quantidade de probiótico durante todo o período experimental. O consumo de probióticos não ultrapassou 8 semanas e foi iniciado na 8ª. semana do experimento.

3.7. Eutanásia e coleta de materiais para análise

Conforme descrito previamente¹³², todos os animais foram submetidos à eutanásia 16 semanas após o início dos experimentos. Após avaliação de parâmetros antropométricos, aferição de pressão arterial sob sedação inalatória com Isoflurano e punção cardíaca sob anestesia geral com solução de Cloridrato de Xilazina a 2% (2mg/mL) (Rompum® - Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Ketamina a 10% (10mg/mL) (Dopalen® - Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil)

nas respectivas doses de 10mg/Kg (Xilazina) e 80mg/Kg (Ketamina), para coleta de amostras de sangue, a eutanásia dos animais foi realizada pela administração de uma dose letal (150 mg/kg) de tiopentato de sódio (Thiopentax[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Amostras do intestino delgado, baço e fígado foram coletadas para avaliação histopatológica das vilosidades intestinais, hepatócitos e polpa esplênica. Todos os órgãos na cavidade abdominal foram removidos para exposição do tecido adiposo branco (gordura visceral) na parede posterior. As amostras de tecido adiposo branco foram coletadas de cada animal e imediatamente pesadas. Posteriormente, foram fragmentadas em blocos de 5 x 5 mm, colocadas em microtubos esterilizados, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

3.8. Parâmetros Antropométricos e Metabólicos

Conforme descrito previamente¹³², todos os animais foram monitorados e pesados semanalmente para controle do ganho de massa corporal, parâmetro importante para comprovação da obesidade, uma das comorbidades da SM. No *baseline* e antes da eutanásia, foram realizadas medidas de circunferência abdominal com auxílio de fita métrica e cálculo do IMC por meio da fórmula: $IMC = \text{Peso(kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$. Os animais estavam sob efeito de anestesia no momento das aferições e a altura considerada teve como referência a distância entre o nariz e a região anal dos ratos. Para medida fiel da circunferência abdominal, foram realizadas 3 mensurações na região abdominal e a maior delas foi adotada. Todas as medidas foram realizadas por um mesmo operador calibrado com os animais em decúbito lateral.

3.8.1. Perfil lipídico

No momento da eutanásia, amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca para avaliação de níveis séricos de: colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos. As amostras de sangue coletadas foram analisadas pelo Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (SAC/ FCFRP-USP). Os níveis de ácidos graxos livres no soro foram obtidos por meio de kit ELISA específico para ratos (Rat Free Fatty Acid ELISA Kit – MyBiosource, Califórnia, EUA).

3.8.2. Glicemia em jejum

Conforme descrito previamente¹³², no momento da eutanásia, amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca para análise dos níveis séricos de glicemia de todos os animais e enviadas ao Laboratório de Patologia Clínica, Microbiologia e Hemocentro Veterinário (Hemolabvet – Ribeirão Preto, SP, Brasil) que realizou a análise utilizando o kit GLICOSE Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A. - Lagoa Santa, MG, Brasil). Todas as análises foram realizadas após os animais serem submetidos a 12 horas de jejum¹³⁸.

3.8.3. Teste de Tolerância à Glicose (TTG)

Conforme descrito previamente¹³², para comprovação da indução da SM, foi realizado também, na 16ª semana o teste de tolerância à glicose³⁵. Resumidamente, após 12 horas de jejum, os animais foram submetidos à ingestão de solução de glucose com concentração de 2g/kg via gavagem e os níveis glicêmicos foram medidos a cada 30 minutos durante 2 horas com auxílio de glicosímetro de precisão Accu-Check Active (Roche Diabetes Care – São Paulo, SP, Brasil).

3.8.4. Dosagem de Insulina

No momento da eutanásia, amostras de sangue foram coletadas via, punção cardíaca, para análise dos níveis séricos de insulina de todos os animais. A análise das amostras foi realizada com kit ELISA específico para ratos (Rat Insulin ELISA Kit – MyBiosource, Califórnia, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

3.8.5. Avaliação da Resistência à Insulina

A resistência à insulina foi estimada com a avaliação do modelo HOMA-IR, de acordo com a fórmula [glicose no plasma em jejum (mg/dL) × insulina no plasma em jejum (μU/mL)]/405.

3.8.6. Aferição da Pressão Arterial Média

Conforme descrito previamente¹³², a aferição da pressão arterial média por método invasivo foi realizada no momento da eutanásia. Para tal avaliação, os animais foram mantidos sob anestesia inalatória com isoflurano (mantidos a uma taxa de 5% de anestésico e 2,5% de oxigênio) e a artéria femoral foi canulada (3 cm de tubo PE-10 conectado a 14 cm de tubo PE-50). Ainda com o animal anestesiado, a cânula foi conectada a um transdutor de pressão e a pressão arterial média e a pressão arterial

sistólica foram registradas por cerca de 5 minutos por um sistema de aquisição de dados (MP150CE; Biopac Systems Inc., CA, EUA) conectado a um computador (Acknowledge 3.2, para o Windows).

3.8.7. Análise de proteinúria

Para a quantificação de proteinúria, amostras de urina foram coletadas diretamente da bexiga, no momento da eutanásia. Foram utilizadas seringas de insulina para a coleta. O material foi armazenado em gelo e, em seguida, congelado a -80°C . As amostras foram analisadas com teste colorimétrico seguindo as instruções do fabricante (SENSIPROT® - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.8.8. Análises histomorfométrica e histopatológica

Amostras de tecidos foram coletadas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24h. Após esse período, os espécimes foram: descalcificados em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético 7% (EDTA) (apenas as hemi mandíbulas), desidratados com soluções crescentes de álcool etílico, diafanizados com solução de xilol e incluídos em parafina. As hemi mandíbulas receberam cortes seriados de 6 μm seguindo o plano mesio-distal. Os tecidos hepáticos e esplênicos receberam cortes seriados de 6 μm seguindo o longo eixo dos órgãos. Os tecidos intestinais (jejuno, duodeno e íleo) receberam cortes seriados de 6 μm seguindo a orientação da luz intestinal, de forma que as vilosidades ficassem posicionadas perpendicularmente à luz intestinal. Os cortes obtidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise com microscopia de luz. Para análise histométrica, as imagens dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz e mensurações foram realizadas com o auxílio de um sistema de análise de imagens digitalizadas e software específico (ImageLab 2000, Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

3.8.8.1. Mandíbula

Foram analisadas as condições histopatológicas dos tecidos periodontais na região de bifurcação do 1o molar inferior, considerando: conteúdo do infiltrado inflamatório periodontal, extensão da inflamação, padrão do tecido conjuntivo e perfil do osso alveolar presente.

Na análise histométrica, foram realizadas, na raiz distal do 1º molar inferior, medidas lineares para avaliar o nível de inserção conjuntiva (NIC), o qual foi calculado mensurando-se em μm a distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a inserção conjuntiva. Na região de bifurcação do 1º molar mandibular foi também calculada a área sem osso alveolar em mm^2 , como descrito previamente¹³⁹. Para cada animal, foi obtida uma média dos valores de dois cortes analisados.

3.8.8.2. Intestino delgado

Para a análise histométrica, três cortes foram selecionados de cada uma das amostras de duodeno, jejuno e íleo. As seguintes medidas foram realizadas: i) Altura de Vilosidades (AV) – mensuração da distância vertical do topo da vilosidade até a junção vilosidade-cripta em 10 vilosidades por corte histológico; ii) Profundidade de Cripta (PC) – mensuração da distância vertical da junção cripta-vilosidade até o limite mais inferior da cripta em 10 criptas por corte histológico. Os valores de AV e PC de cada animal foram representados pela média dos valores obtidos com a análise dos três cortes histológicos.

3.8.8.3. Baço

Os cortes obtidos foram submetidos à análise histopatológica para avaliação da espessura da cápsula, integridade das estruturas presentes nas polpas vermelha e branca e eventuais alterações patológicas presentes.

3.8.8.4. Fígado

Os cortes obtidos foram submetidos à análise histométrica para avaliação dos níveis de esteatose. A esteatose foi avaliada de forma semi-quantitativa, considerando-se a porcentagem de células com esteatose seguindo uma escala de 5 graus: 0, ausente ou presente em <5% de hepatócitos; +1, $\geq 5\%$ e <25%; +2, $\geq 25\%$ e <50%; +3, $\geq 50\%$ e <75%; e +4, $\geq 75\%$ ¹⁴⁰.

3.9. Análise da expressão gênica – qRT-PCR em tempo real

O ácido ribonucleico (RNA) foi isolado pelo kit de extração SV Total RNA Isolation System (Promega, Inc., Madison, WI, EUA) conforme protocolo do fabricante, incluindo tratamento com a enzima DNase para eliminar qualquer resíduo de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico. Um micrograma do RNA total isolado foi transcrito reversamente para DNA complementar (cDNA) com o High-Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Inc., Forster City, CA, EUA), o qual possui random hexamers, conforme protocolo do fabricante. A análise da expressão gênica de LEPR, NAMPT e FABP4 foi realizada por qRT-PCR utilizando TaqMan GenEx Assay (Applied Biosystems, Inc., Forster City, CA, EUA). Para isto, cada cDNA foi amplificado utilizando o gene constitutivo β -actina como controle endógeno para a normalização. A amplificação foi realizada no CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA) por 40 ciclos, conforme protocolo do fabricante. A fluorescência foi coletada para cada ciclo de amplificação e os dados analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para quantificação da expressão relativa.

3.10. Perfil microbiológico intestinal - Coleta de fezes e qRT-PCR

A coleta de fezes foi realizada para todos os animais no *baseline* e 16 semanas após o início do experimento. Para que as fezes fossem coletadas frescas, os animais foram colocados em caixas individualmente por poucos minutos, sob supervisão, até que fosse possível realizar a coleta das fezes defecadas naquele instante. Todas as amostras foram coletadas com auxílio de pinça estéril, colocadas em tubo estéril e imediatamente armazenadas em freezer -80°C .

O DNA genômico foi extraído e purificado a partir de amostras de fezes usando kit específico para esse fim (DNeasy Power Soil® Kit – Qiagen, Hiden, Alemanha) conforme as instruções do fabricante. A pureza e a quantificação do DNA foram avaliadas com um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e por meio de quantificação fluorimétrica (Qubit Fluorometric Quantification - Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), considerando as razões de A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} dadas pelo espectro de absorbância máxima em 260 nm. Foram admitidas apenas amostras com A_{260}/A_{280} entre 1,8 a 2,0 (DNA). A partir dos dados obtidos na quantificação, as amostras foram diluídas com água nuclease-free (Invitrogen UltraPure

DNase/RNase-Free Distilled Water - Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) até serem padronizadas na concentração de 10ng/μL.

Em seguida, a análise por qRT-PCR foi realizada em microplacas de 96 poços (MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate - Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e com o termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Misturas de reações de qRT-PCR “master mix” (total de 10 μL) foram utilizadas contendo a proporção de 5 μL de Faststart SYBR Green (Roche Diagnostics Ltd), 0,25 μl de cada primer específico - Forward (F) e Reverse (R) (Exxtend Solução em Oligos, Paulínia, São Paulo, Brasil) - para 4 μL de água nuclease-free e 0,5 μL de DNA. As sequências iniciadoras para *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Lactobacilos* e *Bifidobacterium*, assim como o protocolo de termociclagem e padronização da curva foram executados conforme as referências citadas na Tabela 2^{210,211}.

Filo ou Gênero Bacteriano	Sequência Utilizada
<i>Firmicutes</i>	F: GGAGYATGTGGTTTAATTCTGAAGCA R: AGCTGACGACAACCATGCAC
<i>Bacteroidetes</i>	F: GGARCATGTGGTTTAATTCTGATGAT R: AGCTGACGACAACCATGCAG
<i>Lactobacilos</i>	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG
<i>Bifidobacterium</i>	F: TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG R: CCACATCCAGC(A/G)TCCAC

Tabela 2: Sequência iniciadora 5'-3' forward (F) e reverse (R) utilizadas para quantificação de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Lactobacilos* e *Bifidobacterium* por meio de qRT-PCR.

3.11. Variáveis de resultado

Foi definida como variável primária deste estudo as diferenças entre os grupos na área sem osso na região de bifurcação analisada por meio de histomorfometria. Os demais parâmetros (peso, circunferência abdominal, IMC, glicemia em jejum, HOMA-IR, pressão arterial, perfil lipídico - colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos e ácidos graxos, expressão gênica relativa de adipocinas - NAMPT, LEPR e FABP4, histométricos - NIC, percentual de hepatócitos gordurosos, AV, PC e relação AV/PC, proteinúria e microbiológico de fezes) foram definidos como variáveis secundárias.

3.12. Análise estatística

As análises foram realizadas com o software *Bioestat Graphpad Statmate 2.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O animal foi considerado como a unidade estatística. Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram apresentados como médias e desvios-padrão. Os dados antropométricos e metabólicos para caracterização da SM foram apresentados como valores proporcionais àqueles obtidos no Grupo C. A distribuição dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos para análises das diferenças intergrupos. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados com distribuição não normal.

Todas as avaliações histométricas foram realizadas por um examinador calibrado. Para calibração dos examinadores, um terço da amostra foi avaliada em dois períodos de tempo com um intervalo de 48 horas. Na calibração de mensuração de variáveis contínuas, foi calculado o erro padrão das médias obtidas em cada tempo e o percentual médio de mudança do erro padrão entre os dois tempos. Um examinador era considerado calibrado quando o percentual médio de mudança do erro padrão das medidas realizadas nos dois intervalos de tempo era inferior a 10%. Na calibração de mensuração de variáveis ordinais, o coeficiente de correlação intraclassa (CCI) foi utilizado. Valores de CCI maiores que 90% foram considerados para assegurar a calibração dos examinadores.

A significância das diferenças entre os grupos para as variáveis antropométricas, metabólicas, histométricas e de expressão gênica relativa foi determinada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey. As diferenças estatísticas para o perfil microbiológico foram avaliadas pelo Teste t. A correlação de *Spearman* foi utilizada para avaliar as relações entre a perda óssea alveolar (área sem osso na região de

bifurcação) e todos os demais parâmetros metabólicos, microbiológicos, histométricos e gênicos investigados.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros antropométricos (Peso, Circunferência abdominal, Índice de massa corporal (IMC))

Ao longo do estudo, foi observado um aumento de peso em todos os animais de todos os grupos experimentais (Figura 3). Conforme pode ser visto na Figura 3, as comparações intergrupos para os valores relativos de delta obtidos (Valores 16 semanas - Valores *baseline*) demonstram aumento de peso, de circunferência abdominal e de IMC significativamente maiores para os grupos com SM quando comparados aos grupos sem SM ($p < 0,05$).

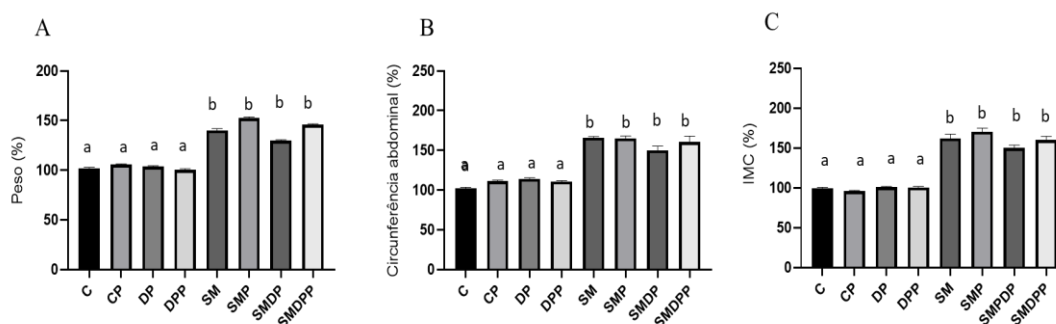


Figura 3. Valores relativos (%) e desvios-padrão dos parâmetros antropométricos obtidos nos diferentes grupos experimentais em relação ao Grupo C. A) Peso; B) Circunferência abdominal; C) IMC. Valores apresentados como delta (16 semanas - Baseline) entre os grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.2. Perfil lipídico (LDL, HDL, Colesterol total, Ácidos Graxos)

Em relação aos níveis séricos de colesterol total, os grupos SM e DP apresentaram maiores concentrações quando comparados ao grupo C ($p < 0,05$). O uso do probiótico promoveu uma redução dos níveis de colesterol total no grupo SMDPP em relação ao grupo SMDP ($p < 0,05$) (Figura 4C).

O grupo SM apresentou uma taxa mais elevada de LDL em relação ao grupo C ($p < 0,05$). Os animais dos grupos SMP e SMDPP mostraram uma redução de LDL em

relação aos animais do grupo SM ($p < 0,05$) (Figura 4-B). Para as taxas de HDL, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (figura 4-D).

Os animais dos grupos SM, SMDP e SMDPP mostraram maiores taxas de triglicerídeos em relação aos grupos C, DP e DPP, respectivamente ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os animais do grupo SMP em relação ao grupo CP. Além disso, os animais com SM, com ou sem DP, tratados com terapia probiótica (SMP e SMDPP) apresentaram menores concentrações de triglicerídeos quando comparados aos grupos com as mesmas condições que não receberam probiótico (SM e SMDP) ($p < 0,05$) (Figura 4-A).

Observou-se que os grupos SM e SMDPP apresentaram maiores níveis séricos de ácidos graxos quando comparados aos grupos C e DPP ($p < 0,05$). O grupo SMDP apresentou valores de ácidos graxos maiores em relação ao grupo SM ($p < 0,05$) (Figura 4-E).

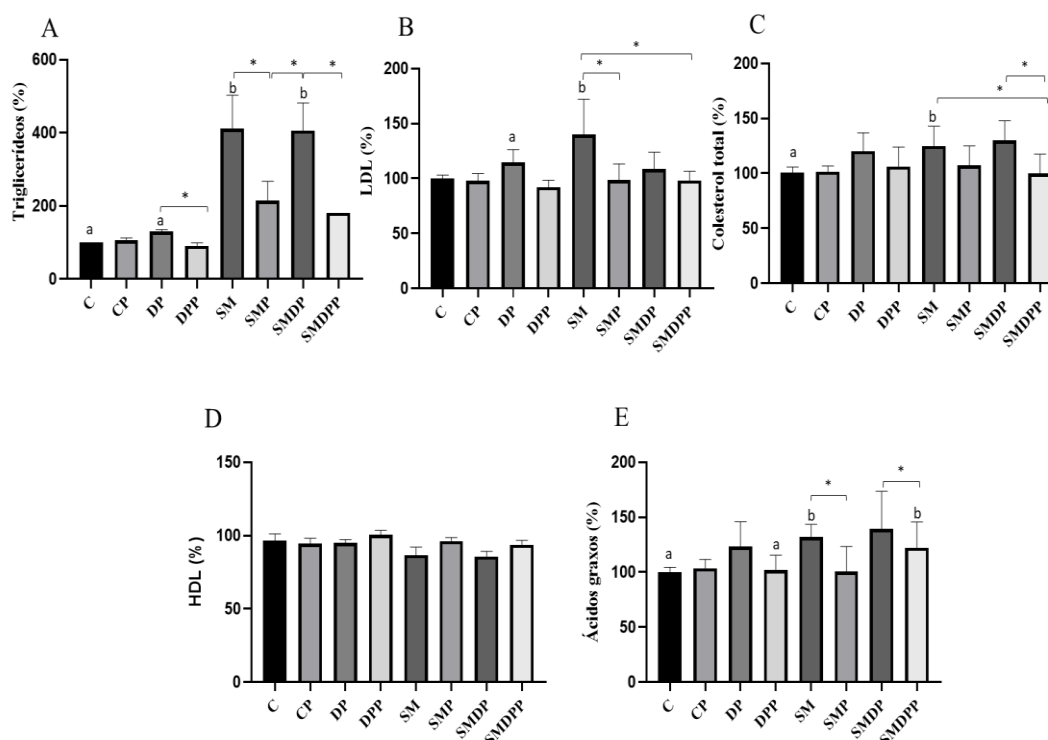


Figura 4. Valores relativos (%) e desvios-padrão dos parâmetros metabólicos obtidos nos diferentes grupos experimentais em relação ao Grupo C. A) Triglicerídeos; B) LDL; C) Colesterol total; D) HDL; E) Ácidos graxos. *diferença significativa entre os

grupos; letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.3. Perfil glicêmico (HOMA-IR, Glicemia em jejum, Teste de Tolerância à Glicose)

Observou-se que os grupos C, CP, DP e DPP apresentaram menores valores nas análises de HOMA-IR, glicemia em jejum e Teste de Tolerância à Glicose (TTG) em relação aos grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP, respectivamente.

Os valores de glicemia obtidos, distribuídos ao longo do tempo, no TTG estão representados na Tabela 3 para todos os grupos. A área sob a curva (AUC) do gráfico obtida para cada grupo está representada na Figura 5. Os animais dos grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP apresentaram maiores valores de AUC quando comparados aos seus respectivos controles (C, CP, DP e DPP), com diferenças significativas entre eles ($p < 0,05$).

Observou-se que os grupos C, CP, DP e DPP apresentaram menores valores para HOMA-IR, em relação aos grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP, respectivamente (Figura 6-A).

Notou-se uma diferença significativa entre os grupos C e SM ($p < 0,05$) (Figura 6-B).

Grupos Experimentais - Valores de Glicemia (mg/dL)

TEMPO (minutos)	C	CP	DP	DPP	SM	SMP	SMDP	SMDPP
0	78,3	82	90,5	91,6	97,3 a,b	95,1 a,b	86,5 a,b	102,6 a,b
30	159,3	128,5	124,8	133,6	155,5 a,b	161,8 a,b	130 a,b	145,5 a,b,d
60	128,8	123,5	125,8	124,3	158,5 a,b	148,8	143,8	163 a,b,d
90	107,1	103,8	114,1	106,5	138 a,b	141,1 a,b	141,16 a,b,d	151,5 a,b,c,d
120	91,6	93,5	97,3	101,3	126,6 a,b	134,3 a,b	129,8 a,b,c	131,1 a,b,d

Tabela 3 - Teste de Tolerância à Glicose. Médias dos níveis glicêmicos dos diferentes grupos distribuídos ao longo do tempo. Letras diferentes, em cada tempo, representam diferenças estatísticas entre os grupos.

- a- Diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo C (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).
- b- Diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo CP (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).
- c- Diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo DP (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).
- d- Diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo DPP (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).

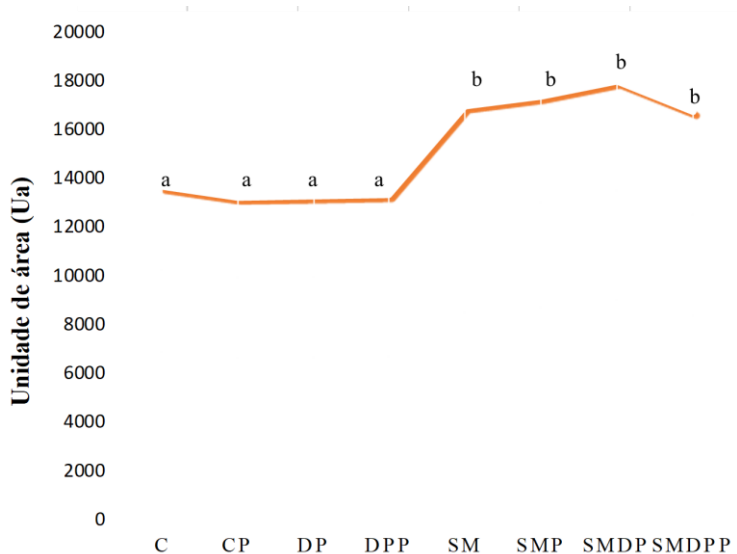


Figura 5 - Médias da AUC para os diferentes grupos experimentais. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos com SM e seus respectivos controles sem SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

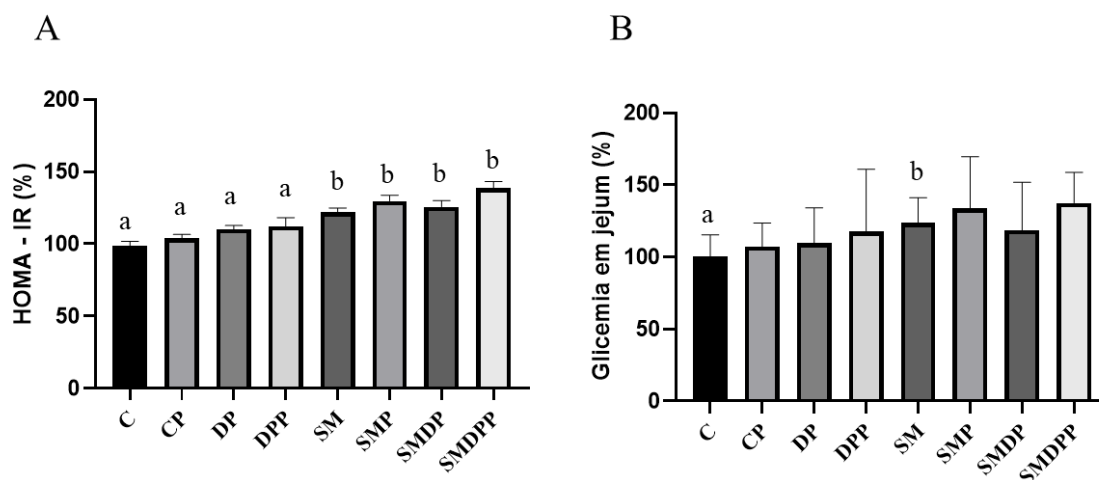


Figura 6: Valores relativos (%) e desvios-padrão de parâmetros glicêmicos obtidos nos diferentes grupos experimentais em relação ao Grupo C. A) HOMA-IR; B) Glicemia em jejum. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.4. Aferição da Pressão Arterial Média

Os animais dos grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP apresentaram valores de pressão sistólica significativamente ($p < 0,05$) maiores que aqueles dos grupos C, CP, DP e DPP, respectivamente (Figura 7). O Grupo DP também apresentou maiores valores de pressão sistólica quando comparado aos grupos C e CP ($p < 0,05$). Para pressão média, os grupos SM, SMP e SMDP apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) maiores que aqueles dos grupos C, CP e DP, respectivamente (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

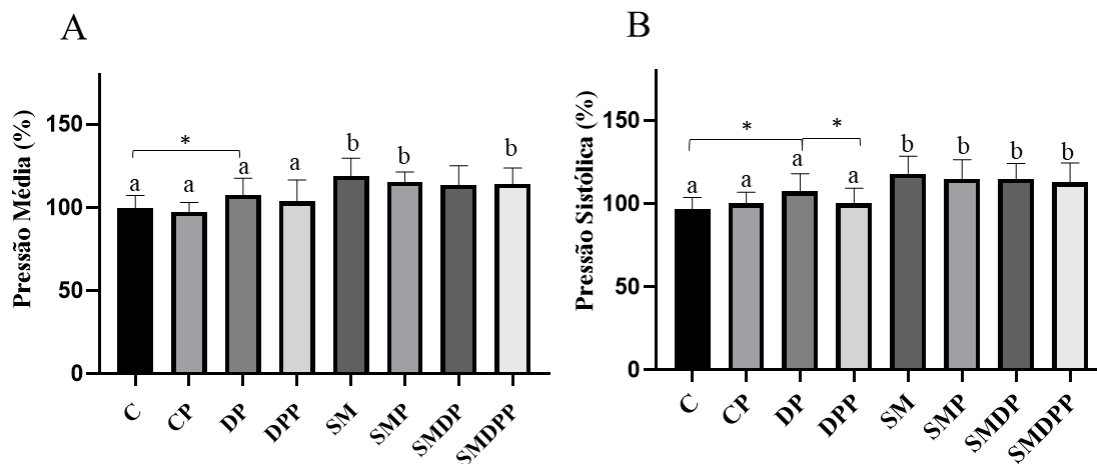


Figura 7: Valores relativos (%) de pressão arterial obtidos nos diferentes grupos experimentais em relação ao Grupo C. A) Pressão média; B) Pressão sistólica. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.5. Análise de proteinúria

As médias e desvios-padrão de proteinúria podem ser observados na Figura 8. O grupo SMDP apresentou valores médios significativamente maiores que o grupo SMDPP. Destaca-se a maior concentração de proteínas encontradas no grupo DP quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$) (Figura 8). Observou-se uma diferença significativa entre os grupos SM e C ($p < 0,05$) (Figura 8).

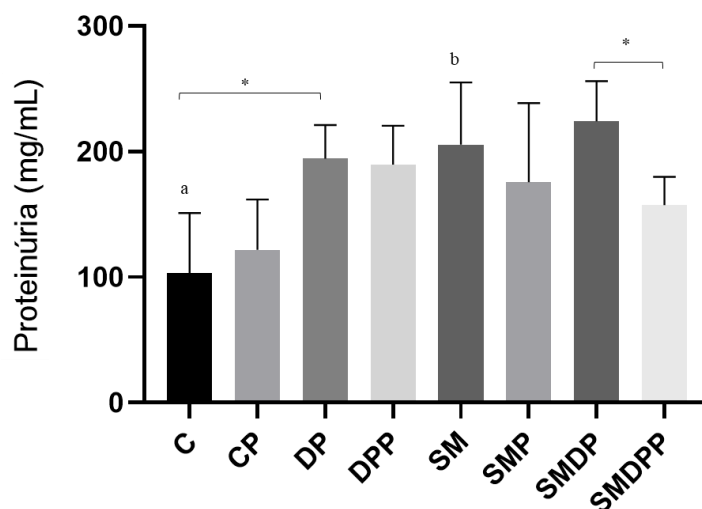


Figura 8 - Médias e desvios-padrão de proteinúria para os grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (Anova, Tukey, $p < 0,05$).

4.6. Análises histomorfométrica e histopatológica

4.6.1. Mandíbula

Os grupos C e CP apresentaram ligamento periodontal com características normais, grande quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias. As fibras colágenas estavam dispostas de modo organizado e perfeitamente inseridas no cimento adjacente e osso alveolar (Figuras 10A-2 e 10B-2). Na região interproximal, entre o 1º e 2º molares inferiores, notou-se a preservação do epitélio juncional e do epitélio do sulco (Figuras 9A e 9B). Foi possível observar que, nos grupos SM e SMP, algumas trabéculas ósseas se apresentavam com espessura mais reduzida e os espaços medulares estavam menores e uma disposição menos organizada das fibras colágenas (Figuras 10E-2 e 10F-2).

As características histológicas apresentadas pelos grupos DP e SMDP foram semelhantes. Ambos os grupos apresentaram tecido conjuntivo altamente desorganizado, com fibras irregularmente dispostas e edema intersticial moderado a intenso, presença de células inflamatórias (Figuras 10D2- e 10G2) e poucos fibroblastos. No grupo SMDP, um intenso infiltrado foi identificado em todo o tecido conjuntivo da área de bifurcação. Além disso, as amostras deste grupo apresentavam características de necrose óssea nesta região (Figura 10G-2). O tecido ósseo e cimento radicular na região de bifurcação apresentaram intensa destruição e contorno irregular (Figura 10G-2). Na região interproximal, em ambos os grupos, entre o 1º e 2º molares, foram observados danos estruturais no epitélio sulcular e migração apical do epitélio juncional (Figuras 9C e 9G).

Os grupos DPP e SMDPP, quando comparados aos grupos DP e SMDP, respectivamente, apresentaram tecido conjuntivo mais celularizado, menor edema intersticial, menor infiltrado inflamatório e fibras colágenas melhor dispostas e organizadas entre o osso alveolar e o cimento (Figuras 10C-2, 10H-2, 10D-2 e 10G-2, respectivamente). O tecido ósseo na região de bifurcação dos Grupos DPP e SMDPP

apresentava contorno irregular e arquitetura plana resultante do processo de reabsorção óssea. O cimento radicular apresentava contorno regular e menores áreas de reabsorção. Na região interproximal, entre o 1º e 2º molares inferiores, observou-se danos estruturais de menor intensidade no epitélio sulcular (Figuras 9D e 9H) e menor deslocamento apical do epitélio juncional.

As médias e desvios-padrão da área sem osso na região de bifurcação e do NIC, bem como o resultado das comparações entre os grupos podem ser observados nas figuras 11 e 12.

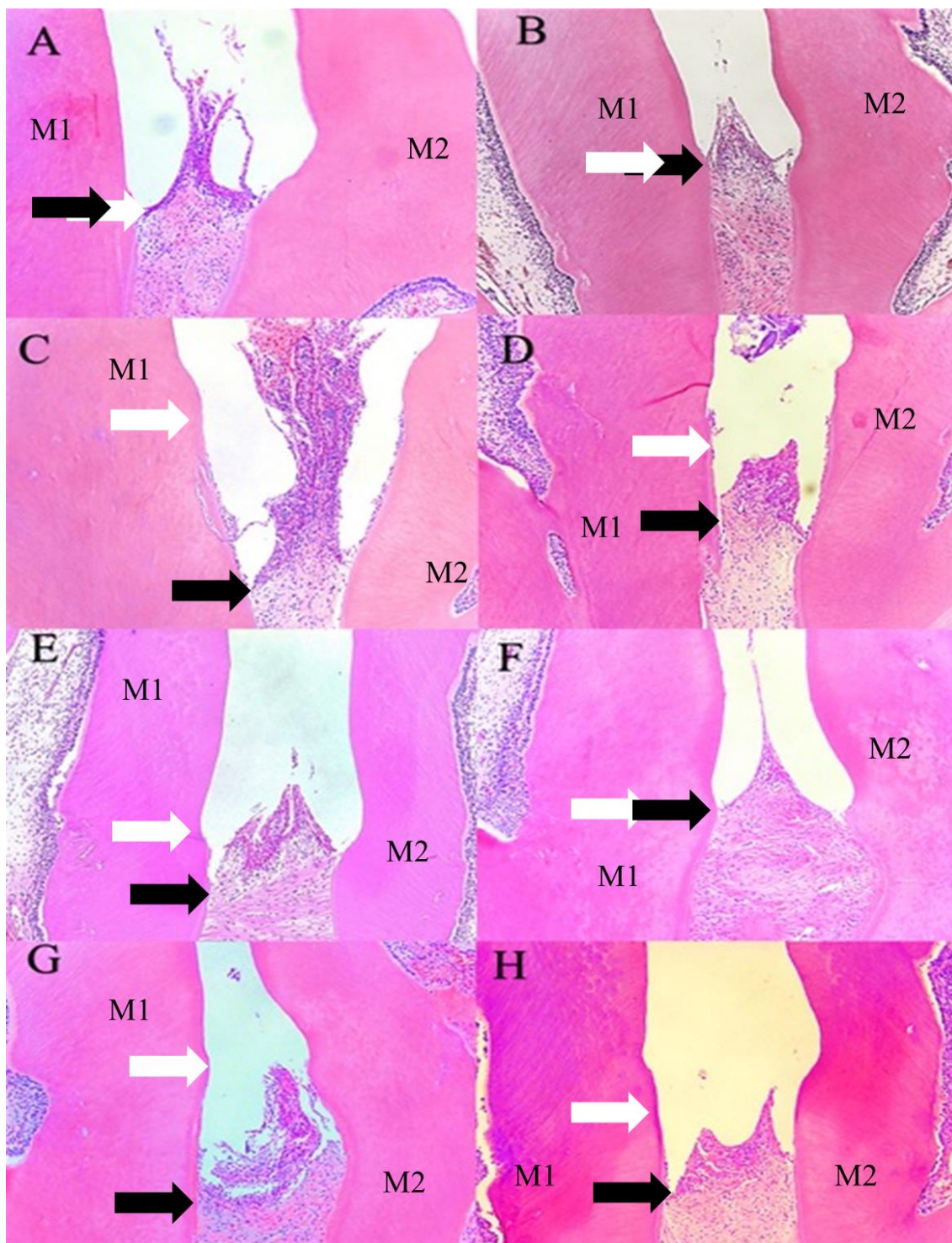


Figura 9: Imagens histológicas da região interproximal entre 1° e 2° molares inferiores, com aumento de 40x dos grupos: C (A), CP (B), DP (C), DPP (D), SM (E), SMP (F), SMDP (G) e SMDPP (H). Setas pretas = junção cimento-esmalte; Setas brancas = adesão epitelial; M1 = primeiro molar inferior; M2 = segundo molar inferior.

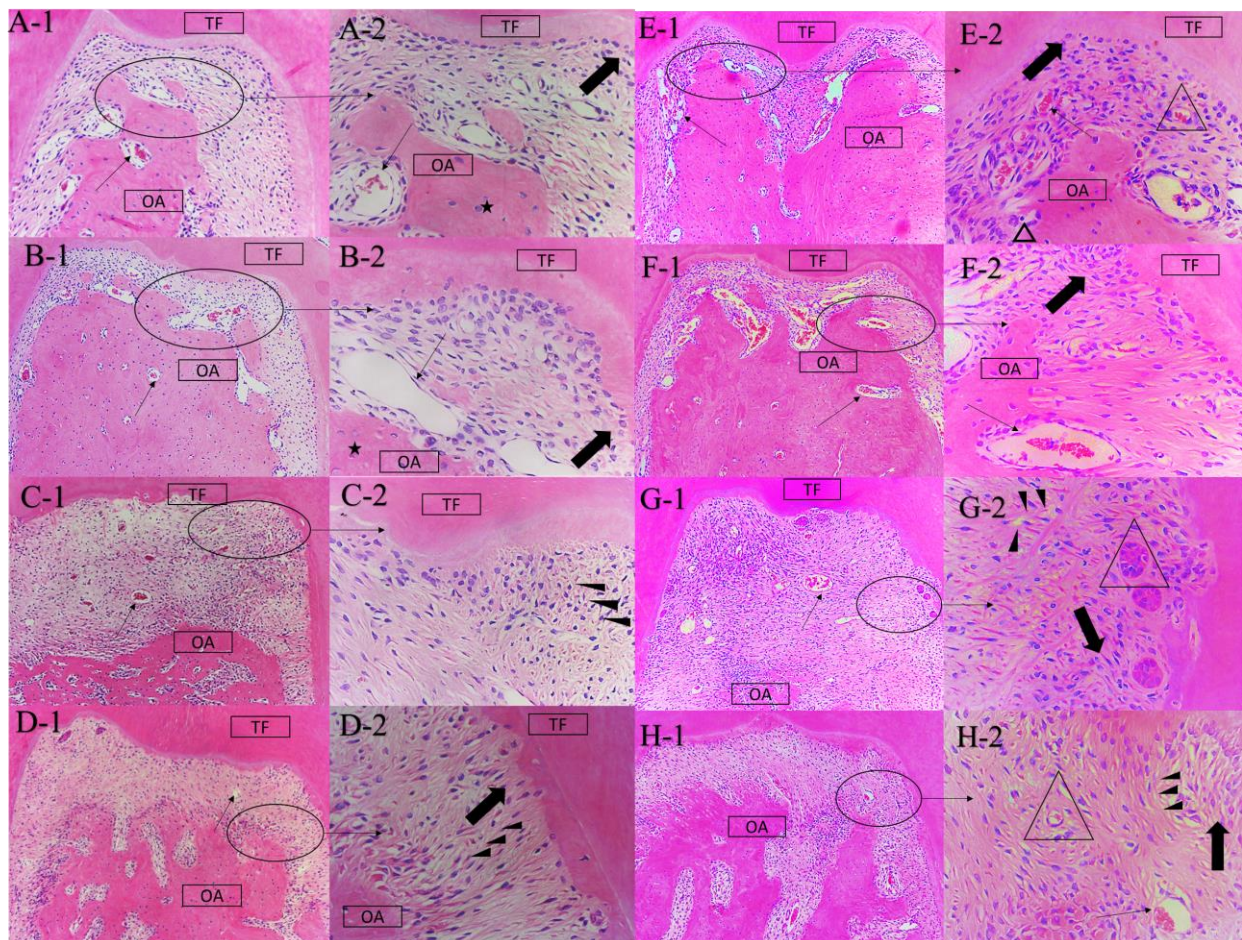


Figura 10: Imagens histológicas da região de bifurcação do 1º molar inferior, com aumento de 20x (A1-H1) e 40x (A2-H2), dos grupos C (A1, A2), CP (B1, B2), DP (C1, C2), DPP (D1, D2), SM (E1, E2), SMP (F1, F2), SMDP (G1, G2) e SMDPP (H1, H2) . Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 20x (1); 40x (2). OA = osso

alveolar; TF = teto da bifurcação; setas pretas = vasos sanguíneos; estrela = osteoblastos; cabeça de seta preta preenchida = fibras colágenas desconexas com a presença de edema intersticial; triângulos = infiltrado inflamatório; seta preenchida = fibras colágenas interpostas entre o osso alveolar e o cimento radicular.

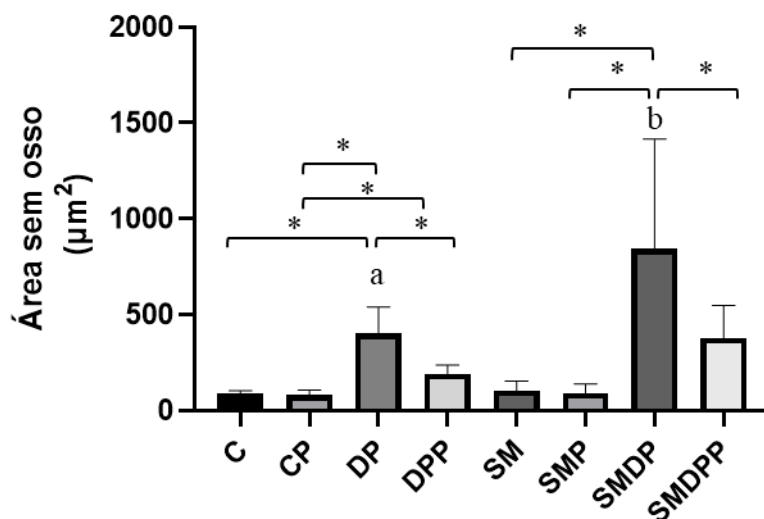


Figura 11: Análise histomorfométrica dos tecidos periodontais. Médias e desvios-padrão da área sem osso em bifurcação para os grupos DP, DPP, SMDP e SMDPP, com comparações entre os grupos. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

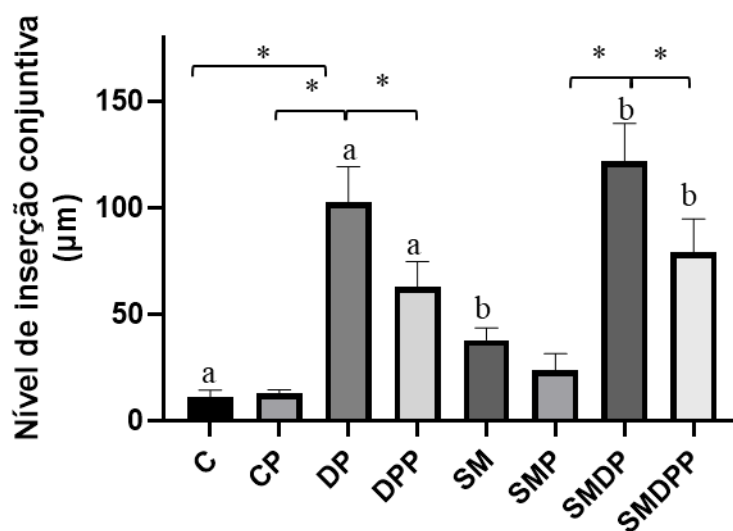


Figura 12: Análise histomorfométrica dos tecidos periodontais. Médias e desvios-padrão da perda de inserção interproximal para os grupos C, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP, com comparações entre os grupos. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.6.2. Baço

No grupos C e CP, o baço estava recoberto por uma cápsula delgada, com parênquima formado por polpa vermelha (PV) e polpa branca (PB) (Figuras 14A e B; 14 A-1 e B-1). Uma zona abaixo da cápsula apresentou-se formada, principalmente, por sinusóides sanguíneos da PV (Figuras 14 A-1 e B-1). Na porção mais interior, a PV apresentava sinusóides sanguíneos e cordões esplênicos (Figuras 14 A-1 e B-2). A PB apresentava agregações de linfócitos circundando as arteríolas centrais (Figura 14). A bainha periarteriolar linfática (PALPS) foi observada no interior da PB (Figuras 14 A-1 e B-1).

Nos grupos DP (DP e DPP), o baço apresentou PB aparentemente expandida (Figuras 13 C e D). Cápsula espessada foi observada com congestão acentuada dos sinusóides sanguíneos subcapsulares da PV. Grânulos de hemossiderina dispersos foram notados na PV. Foi observado um infiltrado inflamatório mononuclear em várias regiões da PV (Figuras 14 C-1 e D-1). Os folículos linfáticos da PB apresentavam-se maiores em comparação com aqueles dos grupos controles. Os folículos linfáticos do grupo DPP apresentaram-se com menor tamanho em relação àqueles do grupo DP.

Os grupos SM e SMP (Figuras 13 E e F) mostraram ampla expansão da PV em relação à PB. Foi observada a presença de sinusóides sanguíneos subcapsulares em diversas áreas e cápsula conjuntiva espessada nos animais do grupo SM quando comparados àqueles do grupo SMP. Aparentemente, as trabéculas de tecido conjuntivo estavam com maior espessura nos animais do grupo SM. Algumas regiões, no grupo SM, apresentavam depósitos de hemossiderina marrom. Os folículos linfáticos da PB eram aparentemente maiores em comparação com aqueles do grupo SMP (Figuras 13 G e H).

O tratamento com o probiótico no grupo SMDPP resultou em uma melhor aparência esplênica, quando comparado ao grupo SMDP. Os cortes histológicos desse

grupo mostraram uma estrutura esplênica mais organizada (Figuras 14G e H). O baço dos animais do grupo SMDPP apresentava uma cápsula mais fina e com menor congestão dos sinusóides sanguíneos subcapsulares da PV (Figuras 14 G-1 e H-1). A estrutura da PV, nos animais do grupo SMDPP era semelhante àquela dos grupos sem DP (Figuras 14G-1 e H-1). Além disso, menos agregações de grânulos de hemossiderina foram notadas na PV no grupo SMDPP quando comparado ao grupo SMDP. Os folículos da PB encontravam-se diminuídos em comparação àqueles do grupo SMDPP (Figuras 14 G1 e H-1).

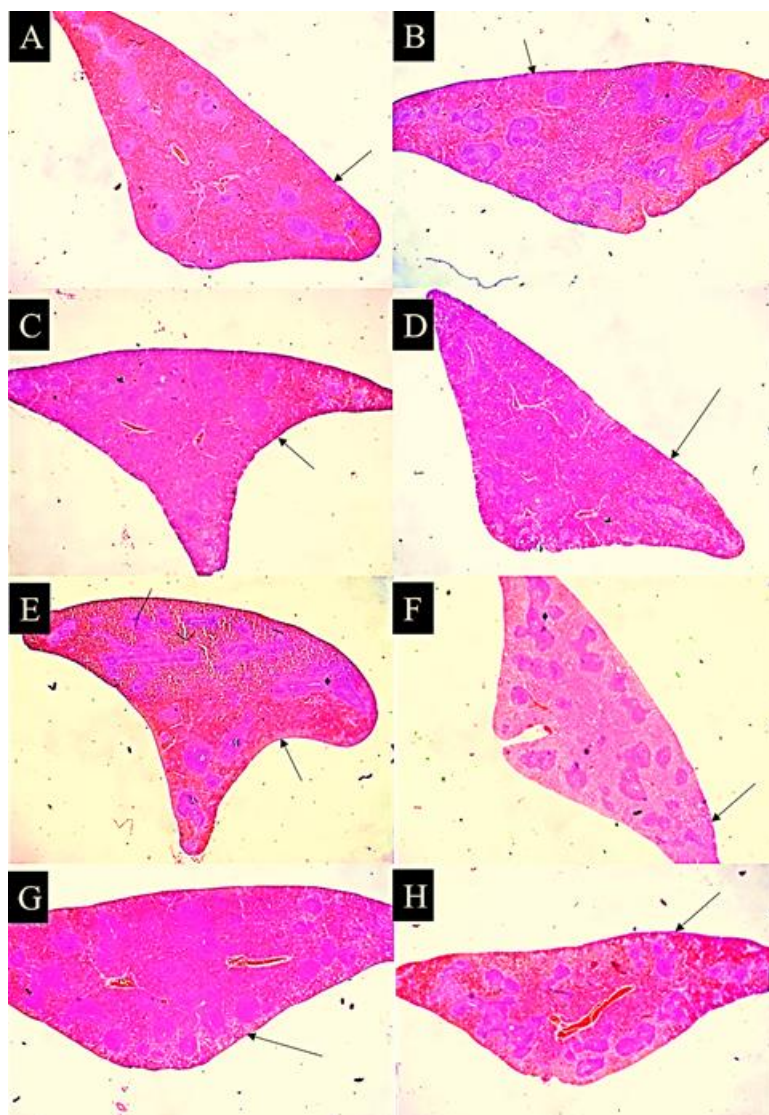


Figura 13: Tecidos esplênicos dos grupos C (A), CP (B); DP (C); DPP (D); SM (E); SMP (F); SMDP, (G). SMDPP (H). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original 2,5x. Setas: cápsula.

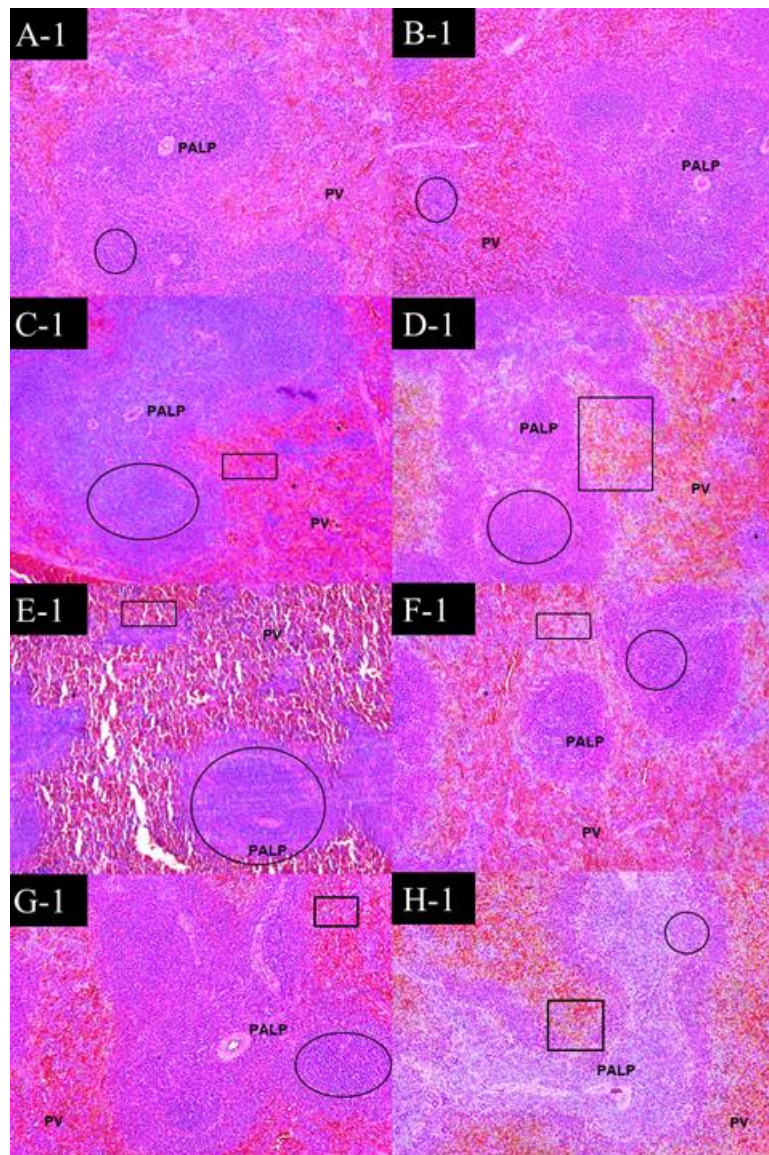


Figura 14: Tecidos esplênicos dos grupos C (A-1), CP (B-1); DP (C-1); DPP (D-1); SM (E-1); SMP (F-1); SMDP, (G-1). SMDPP (H-1). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original 20x. PALPS = Bainha periarteriolar linfática; PV = Polpa vermelha; ELIPSE = folículos linfáticos da polpa branca; Retângulos = Grânulos de hemossiderina.

4.6.3. Fígado

As médias e desvios-padrão do percentual de células gordurosas para os grupos C, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP, bem como o resultado das comparações entre

os grupos podem ser observados na Figura 15. Os grupos SM e SMDP apresentaram maior percentual de esteatose quando comparados aos grupos C e CP, respectivamente ($p < 0,05$). O grupo DP apresentou maior percentual de células gordurosas quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$). Os grupos DPP e SMDPP apresentaram menor percentual de esteatose quando comparados aos seus respectivos controles ($p < 0,05$). Nos grupos C e CP (Figuras 16A e B), os hepatócitos encontravam-se enfileirados e com contornos preservados. O tecido conjuntivo frouxo do espaço-porta tinha aspecto normal. Esta região apresentava vasos sanguíneos não congestionados e vasos linfáticos de aspecto normal. Notou-se a existência de poucas células de Kupfer. Observou-se que os ductos biliares e os vasos do espaço-porta apresentavam características compatíveis com normalidade. Os tecidos hepáticos no grupo DP (Figura 16C) mostraram uma ligeira constrição da veia central com congestão, perda parcial da organização dos hepatócitos em cordões de degeneração e perda de contorno típico. Notou-se aumento do número de células de Kupfer, bem como presença de discreta fibrose próximo à área portal. Além disso, notou-se a presença de esteatose microgoticular ao redor da veia central. No grupo DPP (Figura 16D), foi possível observar uma reversão moderada do quadro degenerativo observado no grupo DP. Observou-se melhor arquitetura, contorno e disposição celular, menor quantitativo de células com microgotículas de gordura, menor presença de células de Kupfer.

No grupo SM (Figura 16E), os hepatócitos exibiram conformação medular alterada, organização em cordões, degeneração e perda de contorno. Além disso notou-se a presença de esteatose intensa e extensa, bem como fibrose na área portal. Os ductos biliares e os vasos do espaço-porta apresentavam características normais. A proporção de hepatócitos com esteatose no grupo SMDP (Figura 16F) foi maior do que aquela observada nos grupos SM, SMP e DP (Figuras 16E, F e D).

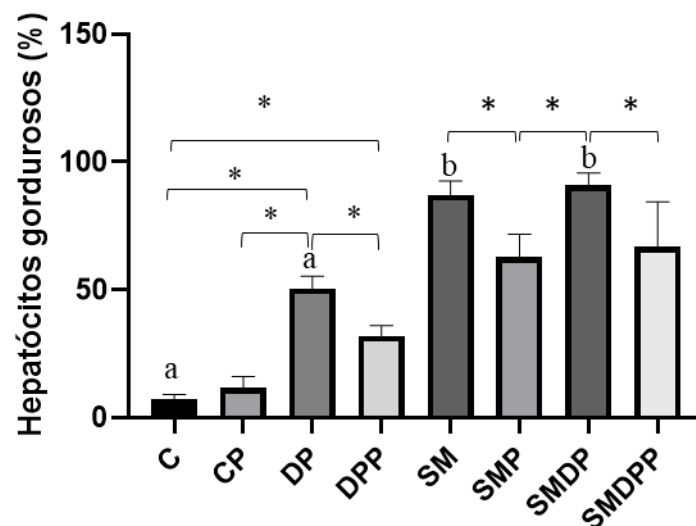


Figura 15. Análise histomorfométrica dos tecidos hepáticos. Médias e desvios-padrão do percentual de células gordurosas para os grupos C, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP, com comparações entre os grupos. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

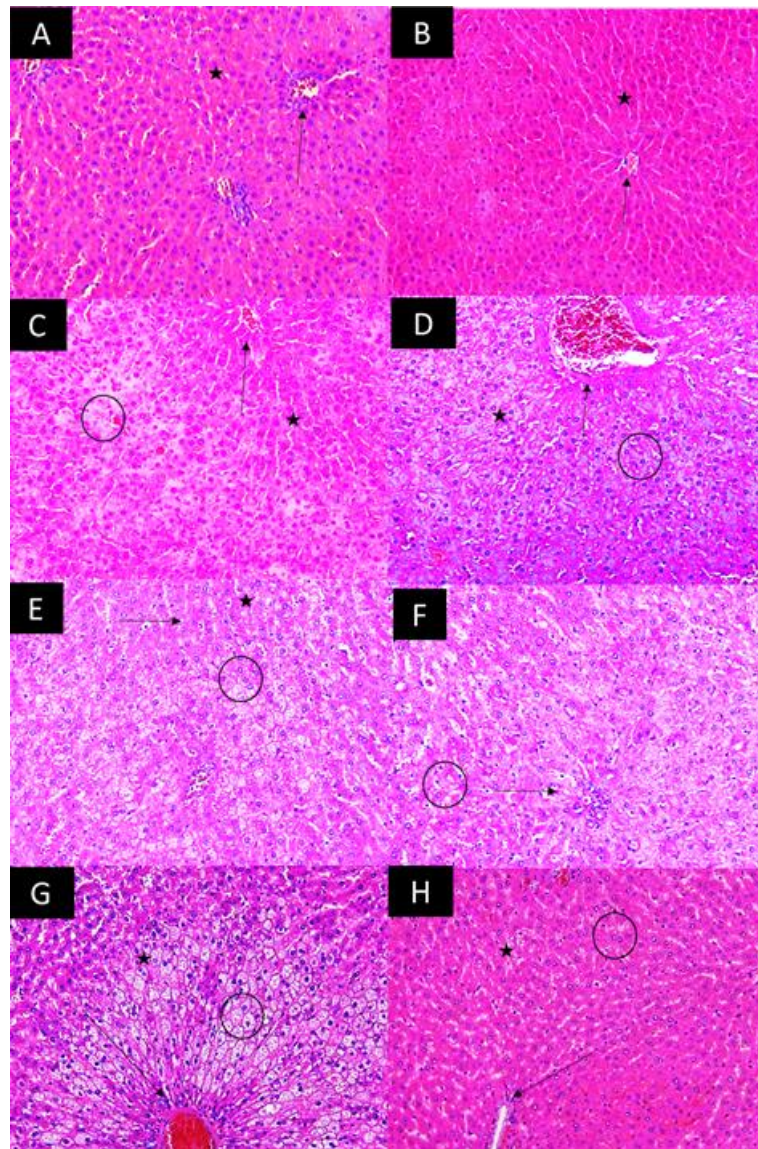


Figura 16: Imagens histológicas dos tecidos hepáticos dos grupos C (A), CP (B); DP (C); DPP (D); SM (E); SMP (F); SMDP, (G). SMDPP (H). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 20x. Estrela = hepatócitos em cordões; seta = área de fibrose; elipse = esteatose.

4.6.4. Intestino delgado

Os animais com periodontite (grupos DP e SMDP) apresentavam defeitos nas vilosidades, estratificação epitelial, degeneração da lâmina basal e presença de células inflamatórias, predominantemente células polimorfonucleadas, no intestino delgado (Figura 17C). A periodontite, isoladamente, provocou o encurtamento acentuado das vilosidades e redução da PC no jejuno dos animais sem SM (Figura 17C). Por sua vez,

observou-se a proliferação de células epiteliais e aumento das vilosidades no intestino dos animais com SM (Figura 17E). Tais alterações estavam ausentes ou apresentadas em menor magnitude em animais do grupo DPP (figura 17D).

Os resultados histométricos observados (Figura 18) podem ser agrupados em 4 pontos principais:

i) Impacto da DP na redução de AV e PC

A DP reduziu AV e PC de forma significativa apenas nos grupos sem SM. No duodeno, jejuno e íleo observou-se menor AV no grupo DP quando comparado ao grupo C. No jejuno e íleo observou-se menor PC no grupo DP quando comparado ao grupo C.

ii) Impacto da SM na redução de AV e PC

No íleo observou-se menor AV no grupo SM quando comparado ao grupo C. No duodeno e íleo observou-se menor PC no grupo SM quando comparado ao grupo C.

iii) Impacto da terapia probiótica nos grupos sem SM

O grupo DPP apresentou maior AV quando comparado ao grupo DP no duodeno, jejuno e íleo. No íleo, uma maior razão AV/PC foi observada no grupo DPP quando comparado ao grupo DP.

iv) Impacto da terapia probiótica nos grupos com SM

O grupo SMDPP apresentou maior AV, bem como maior razão AV/PC quando comparado ao grupo SMDP no duodeno, jejuno e íleo.

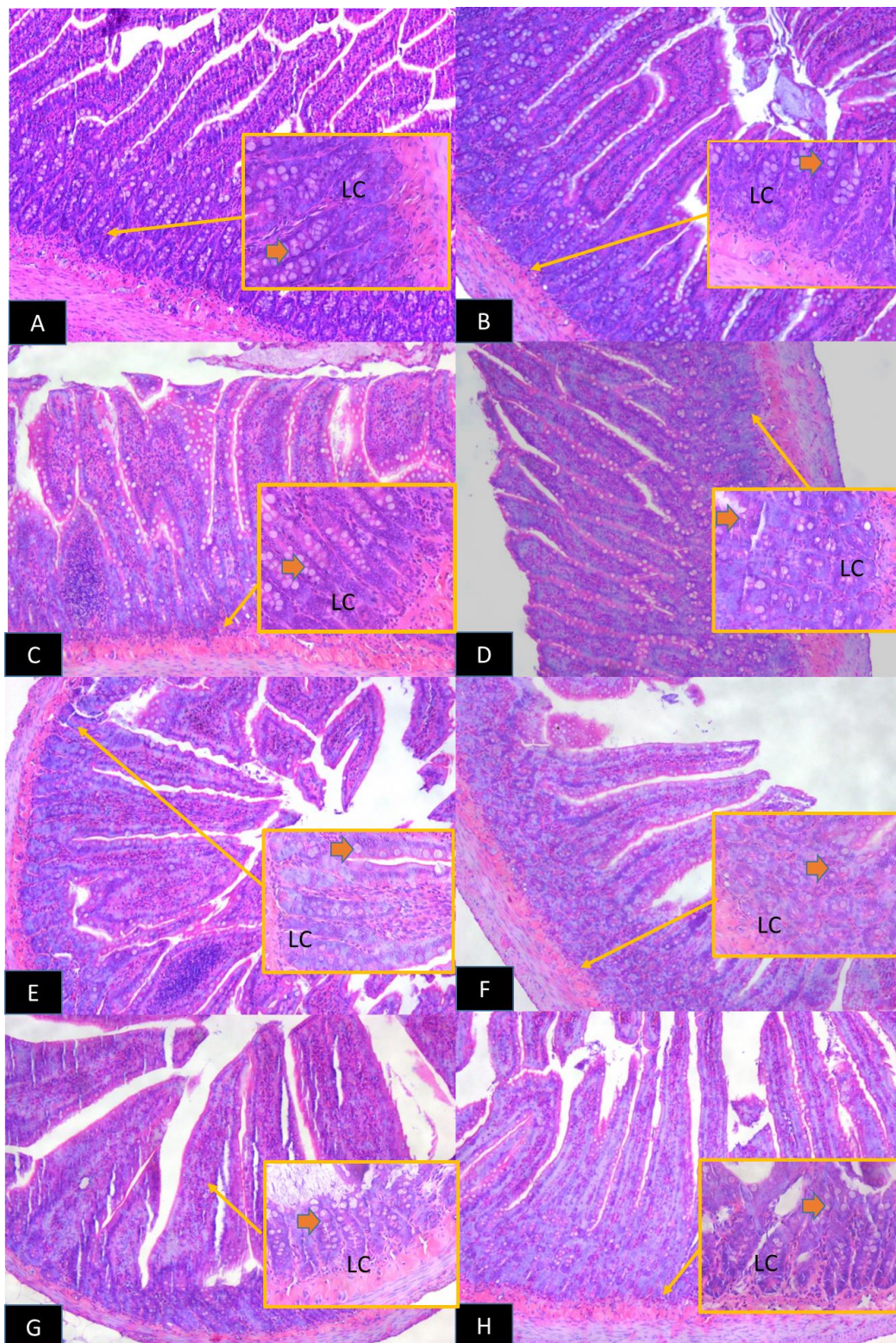


Figura 17: Imagens histológicas dos tecidos intestinais dos grupos C (A), CP (B); DP (C); DPP (D); SM (E); SMP (F); SMDP, (G). SMDPP (H). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x e 40x (retângulo destacado). LC= Criptas de Lieberkühn; Setas laranjas=células calciformes.

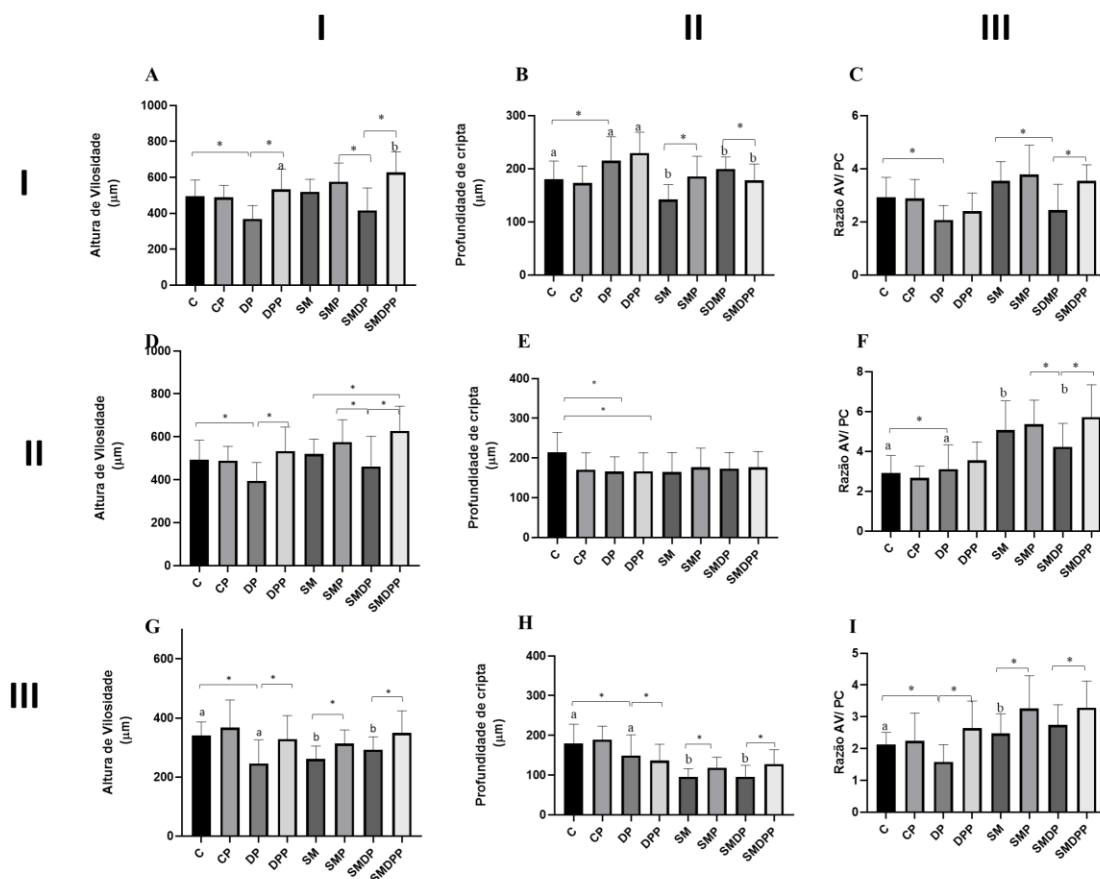


Figura 18: Análise histomorfométrica dos tecidos intestinais. Médias e desvios-padrão de altura de vilosidade (AV) e profundidade de cripta (PC) para os grupos C, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP, com comparações entre os grupos. Na coluna **I** estão representadas a AV; Na coluna **II** estão representadas a PC; Na coluna **III** estão representadas a Razão AV/PC. Na linha **I** estão representados os tecidos do duodeno; na linha **II** estão representados os tecidos do jejuno; na linha **III** estão representados os tecidos do íleo.* diferenças significativas entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.7. Análise da expressão gênica – qRT-PCR em tempo real

4.7.1. Expressão relativa FABP4/Actina

As médias e desvios-padrão da expressão relativa FABP4/Actina podem ser observados na Figura 19. O Grupo DP apresentou maior valor nesta expressão, quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$). O grupo SMDP apresentou maior expressão de

FABP4/Actina quando comparado aos grupos SMP e SMDPP ($p < 0,05$). Maiores expressões de FABP4/Actina foram observadas nos grupos SM e SMDP quando comparados aos seus respectivos controles sem SM ($p < 0,05$).

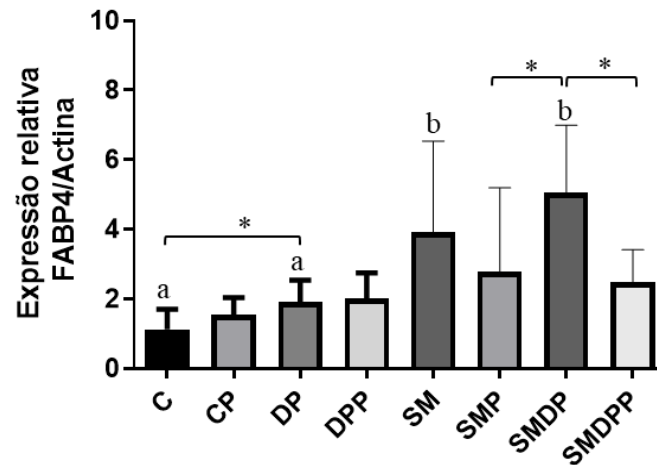


Figura 19: Médias e desvios-padrão da expressão relativa FABP4/Actina para todos os grupos experimentais. *diferença significativa entre os grupos; Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.7.2. Expressão relativa LEPR/Actina

As médias e desvios-padrão da expressão relativa LEPR/Actina podem ser observados na Figura 20. Os grupos DP e SMDP apresentaram maiores expressões de LEPR/Actina quando comparados aos grupos C e SM, respectivamente ($p < 0,05$). Foi observada maior expressão de LEPR/Actina nos grupos SM e SMDP quando comparados aos grupos C e DP.

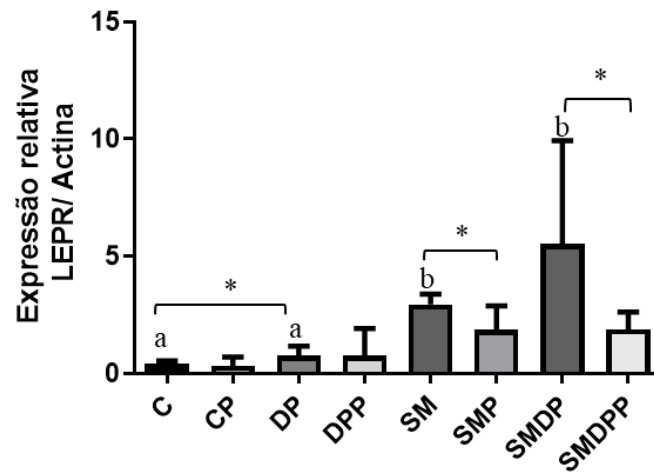


Figura 20: Médias e desvios-padrão da expressão relativa LEPR/Actina para todos os grupos experimentais. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM ($p < 0,05$).

4.7.3. Expressão relativa NAMPT/Actina

As médias e desvios-padrão da expressão relativa NAMPT/Actina podem ser observados na Figura 21. O Grupo DP apresentou maiores valores de expressão relativa de NAMPT/Actina, quando comparado aos grupos C e DPP ($p < 0,05$). O grupo SM apresentou maior expressão de NAMPT/Actina em relação aos grupos C e SMP ($p < 0,05$). Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos SMDP e SMDPP ($p < 0,05$).

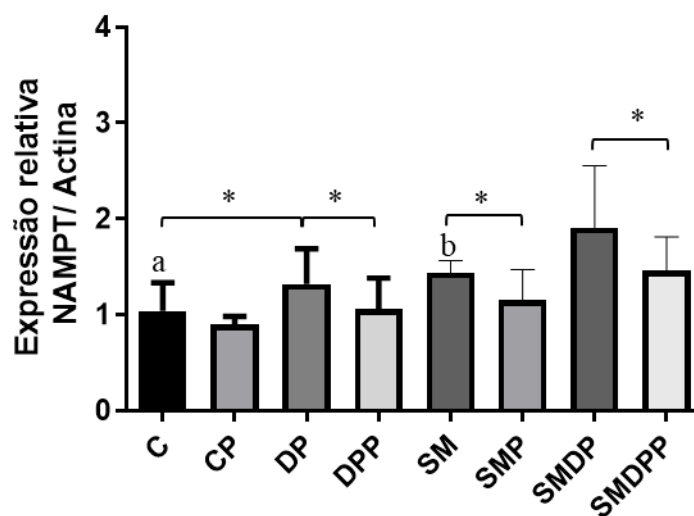


Figura 21: Médias e desvios-padrão da expressão relativa NAMPT/Actina para os todos os grupos experimentais.. *diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças entre grupos sem SM e seus respectivos controles com SM (Teste t, $p < 0,05$).

4.8.Perfil microbiológico intestinal – qRT-PCR

O grupo SMDPP apresentou menor proporção de *Bacteroidetes*, em comparação ao grupo SMDP (figura 22 B). O grupo DP apresentou redução de *Bacteroidetes* (Figura 22A) e elevação de *Firmicutes* quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$). O grupo SMDPP, quando comparado ao grupo SMDP, apresentou menores variações percentuais de *Firmicutes* e maiores reduções de *Bacteroidetes* (Figuras 22 B e 22 D) ($p < 0,05$). O Grupo SMP apresentou menor variação percentual nas contagens de *Firmicutes* (Figura 22D), em relação ao grupo SMDP ($p < 0,05$). Todos os grupos apresentaram reduções percentuais nas contagens de *Lactobacilos* em relação ao *baseline* (Figuras 22E e 22F). Foi observada maior redução nas contagens de *Lactobacilos* (Figura 22F) no grupo SM quando comparado aos grupos SMDP e SMDPP ($p < 0,05$). O grupo SMP apresentou maiores reduções percentuais de *Lactobacilos* quando comparado ao grupo SMDP ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas nas comparações para as variações percentuais de *Bifidobacterium* entre os grupos com e sem SM (Figuras 22G e 22H)

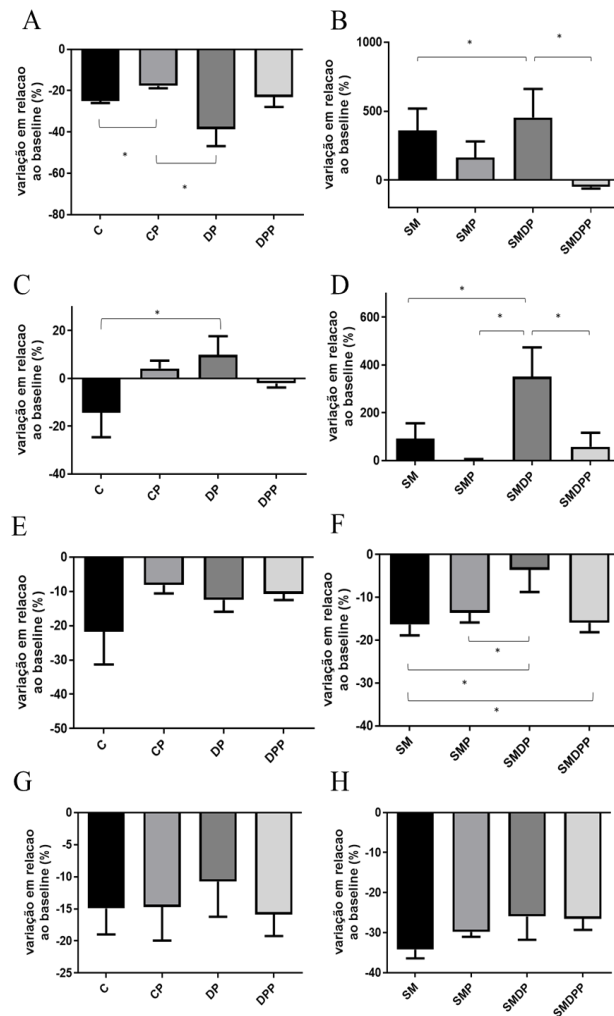


Figura 22: Médias e desvios-padrão das variações percentuais para as contagens de bactérias na 16ª semana em relação aos valores obtidos no *baseline* nas fezes dos grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. Valores positivos demonstram aumentos nas contagens de microrganismos e valores negativos indicam redução. A) *Bacteroidetes* (grupos sem SM); B) *Bacteroidetes* (grupos com SM); C) *Firmicutes* (grupos sem SM); D) *Firmicutes* (grupos com SM); E) *Lactobacilos* (grupos sem SM); F) *Lactobacilos* (grupos com SM); G) *Bifidobacterium* (grupos sem SM); H) *Bifidobacterium* (grupos com SM).

4.9. Correlação entre perda óssea alveolar e SM e parâmetros microbiológicos, genéticos e metabólicos.

A tabela 4 apresenta diferentes parâmetros microbiológicos, genéticos e metabólicos envolvidos em significativa correlação com a perda óssea alveolar.

Considerando os dados de perda óssea alveolar, correlações fortes foram encontradas com esteatose hepática, expressão relativa de NAMPT, ácidos graxos, profundidade de cripta e proteinúria; correlações moderadas foram encontradas com LEPR; e correlações fracas foram encontradas com *Bacteroidetes*.

		PO	AC GRAXO	BACT	LEPR	NAMPT	ESTEAT	GLICEMIA	PROT	CRIPTA
PO	r	1								
	p	*								
AC GRAXO	r	0,8095	1							
	p	0,0218 ^a	*							
BACT	r	0,1142	-0,00726	1						
	p	0,0153 ^a	0,9864	*						
LEPR	r	0,6667	0,9214	0,1937	1					
	p	0,0831 ^b	0,0011 ^a	0,6458	*					
NAMPT	r	0,8144	0,9469	-0,1761	0,865	1				
	p	0,0186 ^a	0,0004 ^a	0,6765	0,0055 ^a	*				
ESTEAT	r	0,7619	0,8479	-0,0401	0,8474	0,4031	1			
	p	0,0368 ^a	0,0078 ^a	0,9248	0,0079 ^a	0,006 ^a	*			
GLICEMIA	r	0,6667	0,9323	0,0589 ^b	0,9598	0,949	0,9593	1		
	p	0,0831 ^b	0,0007 ^a	0,8904	0,0002 ^a	0,003 ^a	0,0002 ^a	*		
PROT	r	0,8095	0,8234	-0,0117	0,7725	0,9182	0,9187	0,8895	1	
	p	0,0218 ^a	0,0120 ^a	0,9781	0,0246 ^a	0,0013 ^a	0,0013 ^a	0,0031 ^a	*	
CRIPTA	r	-0,7619	-0,9319	0,01156	-0,9605	-0,9406	-0,9268	-0,9808	-0,8626	1
	p	0,0368 ^a	0,0008 ^a	0,9783	0,0001 ^a	0,0005 ^a	0,0009 ^a	<0,0001 ^a	0,0058 ^a	*

Tabela 4: Correlação entre perda óssea alveolar na região de bifurcação e diversos parâmetros microbiológicos, genéticos e metabólicos. PO = Perda óssea; AC Graxo = ácidos graxos; Bact = *Bacteroidetes*; ESTEAT = Esteatose; PROT = Proteinúria; Cripta = profundidade de cripta. ^a Valor significativo para a correlação de *Spearman* ($p < 0,05$); ^b Tendência de diferença estatística ($p < 0,1$ e $> 0,05$)

5. *DISCUSSÃO*

A SM e a DP são um problema de saúde pública mundial sendo responsáveis por dezenas de milhões de mortes anualmente^{24, 141}. Globalmente, a periodontite afeta entre 45% e 50% dos adultos em sua forma mais branda e a doença mais grave afeta de 9 a 11% da população adulta mundial¹⁴²⁻¹⁴⁴. Em condições de saúde periodontal, existe uma harmoniosa relação entre um biofilme associado à saúde e uma resposta imunoinflamatória proporcional do hospedeiro. A periodontite surge após o estabelecimento de uma disbiose em pessoas suscetíveis, a qual tem ligação com a quebra do equilíbrio da resposta imunoinflamatória, o que proporciona danos ao tecido conjuntivo mediados pelo hospedeiro e perda óssea alveolar^{145, 146}. O resultado final da DP, quando não tratada, é a perda do dente, redução da função mastigatória, pior estado nutricional, baixa autoestima e qualidade de vida e uma associação com maior mortalidade devido às comorbidades da SM^{147, 148}. Indivíduos com SM são quase duas vezes mais predispostos a desenvolver periodontite do que o restante da população³³, Em contrapartida, a periodontite aumenta o risco de deteriorização dos parâmetros metabólicos e inflamatórios sistêmicos desses indivíduos. Dessa forma, investigações de novas estratégias de prevenção ou tratamento para ambas as condições são urgentemente necessárias e podem proporcionar um impacto significativo nos programas de saúde pública mundiais.

O conceito de modular a microbiota intestinal por meio do uso de bactérias específicas para melhorar o metabolismo do hospedeiro ganhou considerável interesse nos últimos anos. Nessa perspectiva, estudos pré-clínicos^{110, 111, 132, 149} e clínicos^{102, 104-106, 109, 150} demonstraram que a utilização de probióticos pode ser uma promissora alternativa terapêutica/preventiva para a SM e para a periodontite. Todavia, as evidências disponíveis não são robustas o suficiente e, por isso, requerem um corpo de comprovações melhor alicerçado. O mecanismo exato de como os probióticos exercem seus efeitos ainda não são completamente conhecidos e dependem de uma variedade de fatores: a condição a ser tratada, a cepa e a concentração dos probióticos usados e o estágio em que são introduzidos, a presença de prebióticos ou bactérias entéricas. Os efeitos dos probióticos podem originar-se de três principais modos de ação locais ou sistêmicos^{100, 120, 151-153}:

1. Indiretamente, os probióticos competem com os patógenos por nutrientes essenciais; eles também podem restringir as capacidades de adesão dos patógenos, alterando o pH ambiental¹⁵².

2. Diretamente, os probióticos estão envolvidos na produção de substâncias antimicrobianas (ácido láctico, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas) que podem matar ou inibir o crescimento de patógenos periodontais¹⁵⁴.

3. Os probióticos podem atuar modulando a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β , TNF- α e aumentando a produção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10) e melhorando a integridade da barreira intestinal¹⁵⁵.

No presente estudo, foi investigada a progressão da DP em animais com ou sem SM, tratados ou não com a cepa probiótica *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019. A escolha desse gênero bacteriano levou em consideração seus efeitos nos tecidos periodontais^{110, 111, 139, 156} também, efeitos capazes de atenuarem as comorbidades da SM¹⁵⁷⁻¹⁶⁰.

Ao analisar os resultados do presente estudo, o método de indução experimental da SM merece algumas considerações. Selecionou-se um modelo de SM induzida por dieta. Tal modelo tem como principal vantagem a mimetização natural do desenvolvimento da SM, conforme visto em humanos. Portanto, optou-se por um modelo experimental utilizando dieta com alto teor de gordura¹³⁶. Tal modelo tem considerável capacidade de mimetizar os eventos vistos em humanos³³ incluindo o lento e progressivo ganho de peso e alterações do metabolismo lipídico. Portanto, este modelo experimental pode ser amplamente utilizado para estudar a interação da dieta nas manifestações de dislipidemia e resistência à insulina. A adoção de dieta com alto teor de gordura em roedores resultou em alterações antropométricas no presente estudo. Os animais dos grupos com SM apresentaram maior ganho de peso, circunferência abdominal e IMC quando comparados aos animais sem SM, corroborando os resultados obtidos em estudos prévios^{128, 136}.

No que se refere ao método de indução da DP, é importante ressaltar que existem diversos modelos experimentais em roedores. No presente estudo, optou-se pelo modelo de indução por ligadura. A instalação de ligaduras provoca reabsorção óssea alveolar progressiva, sugerindo duas fases distintas: fase aguda (0 e 14 dias) e fase crônica (15 e 21 dias)^{128, 161}. Neste estudo, a ligadura foi mantida por 14 dias e verificou-se, periodicamente, a sua presença e posicionamento correto durante todo o experimento.

No presente estudo, os efeitos sistêmicos da terapia probiótica foram avaliados na análise de diversos parâmetros em animais com ou sem SM e com ou sem DP. Para entender melhor os meios pelos quais a terapia probiótica reduziu a gravidade da DP em

animais com SM, é fundamental tentar compreender, primeiramente, os mecanismos pelos quais SM e DP podem estar relacionadas. Animais do grupo SMDP apresentaram maior perda de osso alveolar quando comparados aos animais do grupo DP. Maior perda de inserção conjuntiva foi observada no grupo SM quando comparado ao grupo C. Ainda, neste estudo, os animais do grupo SM foram bastante diferentes dos animais do grupo C ao se analisar parâmetros antropométricos, metabólicos, genéticos e histométricos. Alguns desses parâmetros foram fortemente correlacionados com a perda óssea alveolar e direcionarão esta primeira linha de discussão.

No presente estudo, animais sem DP e com SM, apresentaram maior expressão de LEPR, NAMPT e FABP4 quando comparados aos animais sem DP e sem SM. De fato, os níveis plasmáticos de LEPR são aumentados na obesidade e diminuídos após a perda de peso^{24, 67}. Luo et al.⁵⁸ demonstraram o impacto da periodontite na expressão gênica de LEPR, NAMPT e FABP4. Sabe-se que há aumento da circulação de LEPR durante os períodos de inflamação mediada por LPS e citocinas como TNF e IL-1b^{66, 162}, indicando que a LEPR pode exercer um efeito inflamatório através de um mecanismo dependente de citocinas pró-inflamatórias. A mudança nos níveis séricos de LEPR pode modular a função dos imunócitos, bem como das células periodontais. Nas células do ligamento periodontal, a LEPR induz a regulação negativa do Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (TGF- β 1), reduzindo a capacidade regenerativa tecidual⁸⁴. Então, a maior expressão de LEPR na presença de SM pode ser um fator capaz de explicar a maior susceptibilidade dos tecidos periodontais ao desenvolvimento de DP. Além da LEPR, níveis aumentados de NAMPT e FABP4, como encontrados em indivíduos obesos, podem, também, representar um mecanismo pelo qual a obesidade pode conferir um risco aumentado de periodontite^{56, 57, 59, 65, 141, 142}. Células inflamatórias, como monócitos e macrófagos, induzem e regulam diversas funções imunológicas ao estabelecer contato intercelular íntimo com inúmeros receptores celulares. Existem indícios de uma relação direta entre o aumento da expressão do NAMPT e a piora de um quadro inflamatório sistêmico, agravamento de disfunção endotelial, instabilidade da placa em síndromes coronarianas e aterosclerose na doença arterial coronariana¹⁶³. Células inflamatórias, como monócitos e macrófagos, induzem e regulam diversas funções imunológicas ao estabelecer contato intercelular íntimo com inúmeros receptores celulares. O NAMPT é capaz de elevar significativamente a expressão de receptores quimiotáticos de células T e B¹⁶⁴.

A FABP4 é expressa, principalmente, em adipócitos e macrófagos e desempenha papéis importantes no desenvolvimento de resistência à insulina e aterosclerose⁹². Os níveis circulantes de FABP4 estão associados a vários aspectos da SM e doenças cardiovasculares^{92, 142}. Recentemente, foi demonstrado⁶⁶ que patógenos periodontais são capazes de estimular a captação de lipídios por macrófagos modulando a expressão de FABP4 nos tecidos periodontais. Estes achados apoiam fortemente a hipótese de que a periodontite pode afetar a progressão de várias doenças sistêmicas por meio da relação entre o metabolismo lipídico e inflamação a partir do *looping* de ativação de macrófagos e secreção de FABP4. Sabe-se também que os fibroblastos gengivais produzem constitutivamente NAMPT, e esta síntese é significativamente aumentada pela IL-1 β e pelas bactérias orais *P. gingivalis* e *F. nucleatum*⁵⁶. A expressão e os níveis de NAMPT estão significativamente aumentados em tecidos gengivais de pacientes com periodontite^{56, 65}. Desta forma, considerando os achados de NAMPT e FABP4 é possível inferir que indivíduos com SM apresentam maior suscetibilidade e propensão a desenvolver quadros mais graves de DP, quando comparados a indivíduos normossistêmicos.

No presente estudo, é possível afirmar que o grupo SM apresentou alterações aberrantes no metabolismo lipídico, em comparação ao grupo C, o que pode ter contribuído para uma maior susceptibilidade dos animais com SM no desenvolvimento da periodontite experimental. É importante ressaltar que animais sem indução da periodontite experimental, como aqueles do grupo SM, apresentaram maior perda de inserção conjuntiva quando comparados aos animais do grupo C, o que demonstra um reflexo direto das condições sistêmicas alteradas nos tecidos periodontais independentemente da colocação de ligaduras. Os resultados deste estudo apontam que há uma significativa e forte correlação positiva entre a perda óssea alveolar e a elevação das concentrações séricas de ácidos graxos. De fato, a dislipidemia é uma importante característica que está presente na SM e é representada por altos níveis de triglicérides e ácidos graxos, bem como baixos níveis de HDL^{165, 166}. Estudos recentes demonstraram que a periodontite está associada à dislipidemia (redução de HDL e elevação de LDL e triglicérides) e que há uma associação entre o perfil bacteriano bucal e alterações no perfil lipídico^{167, 168}. Embora o mecanismo exato não seja totalmente compreendido, uma relação de mão dupla entre periodontite e dislipidemia parece existir. A dislipidemia pode contribuir para um risco aumentado de periodontite em virtude da capacidade de ácidos graxos e lipídios induzirem a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, em um cenário de dislipidemia, a capacidade do HDL em estimular o excesso de fluxo de

colesterol dos tecidos periféricos e transportá-lo para o fígado para excreção se tornam prejudicadas. É importante considerar que HDL tem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Portanto, níveis reduzidos de HDL e níveis aumentados de triglicerídeos e LDL causam um estado pró-inflamatório grave. A dislipidemia pode também causar alterações nas respostas inflamatórias mediante o desafio imposto por patógenos periodontais¹³².

No presente estudo, foi detectado que os grupos com SM apresentaram alterações no metabolismo glicêmico em comparação com o grupo C. Os níveis de glicemia apresentaram também uma correlação positiva ($r = 0,66$; $p = 0,08$) com a perda óssea alveolar. Os defeitos na ação da insulina no metabolismo da glicose incluem deficiências na capacidade do hormônio de suprimir a produção de glicose pelo fígado e rim e mediar a captação e o metabolismo da glicose em tecidos sensíveis à insulina. Diversos estudos demonstraram que alterações no metabolismo dos açúcares estão presentes na SM^{30, 61, 113, 132, 172}. A suscetibilidade e gravidade das DP são afetadas pela hiperglicemia. Estudos em animais e humanos concordam que o diabetes mellitus aumenta os eventos inflamatórios no tecido periodontal, prejudica a formação de novo osso e aumenta a expressão do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL) em resposta ao desafio bacteriano^{50, 52, 173, 174}. Altos níveis de glicose, espécies reativas de oxigênio e produtos finais de glicação avançada são encontrados no periodonto de indivíduos diabéticos e levam ao aumento da ativação de NF- κ B e expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1^{50, 51}, fato este que gera um prejuízo às funções de vários tipos de células nos tecidos periodontais¹⁷³. A resposta inflamatória também modifica a microbiota oral tornando-a mais patogênica¹⁷⁴. Neste estudo, os animais com SM e DP, apresentaram maior perda óssea interproximal e em região de bifurcação quando comparados aos animais sem SM e com DP.

No presente estudo foi observada uma correlação negativa entre a perda óssea alveolar e a profundidade de cripta intestinal. Os animais com SM apresentaram menor PC no ambiente intestinal (duodeno e íleo) do que os animais do grupo C. Durante os fenômenos inflamatórios, tais como aqueles provocados pela SM, a mucosa intestinal apresenta perda das células epiteliais das vilosidades em uma taxa que supera a produção de novas células oriundas das criptas¹⁷⁵. Em consequência, tal condição implica no aumento de permeabilidade intestinal, desenvolvimento de doenças como a colite ulcerativa, doença inflamatória intestinal, Doença de Crohn¹⁷⁶. Alterações intestinais também podem ser observadas na presença da DP. Em ratos com periodontite induzida,

observou-se encurtamento das vilosidades, além da estratificação epitelial, degeneração da lâmina basal e infiltração com neutrófilos no intestino delgado, quando comparados aos animais do grupo controle (sem DP)¹⁷⁷. Estes resultados corroboram aqueles encontrados no presente estudo quando se observa os parâmetros intestinais dos animais do grupo DP em comparação ao grupo C. Dessa forma, considerando que SM pode afetar o ambiente intestinal e que pode existir uma associação entre DP e doenças inflamatórias intestinais¹⁷⁸, pode-se inferir que a maior susceptibilidade de animais com SM para o desenvolvimento de DP tenha como uma de suas explicações o ambiente intestinal.

A diabetes mellitus, uma comorbidade da SM, e/ ou DP podem provocar inflamação crônica nos tecidos intestinais^{136, 177, 179}, resultando em aumento da permeabilidade intestinal e menor diversidade microbiana na mucosa intestinal. Indivíduos portadores de diabetes mellitus têm aumento nas proporções de *Firmicutes* e diminuição dos *Bacteroidetes* em relação aos indivíduos saudáveis¹⁷⁹. No presente estudo, quando se compara os grupos C x DP e SM x SMDP, pode-se constatar que a DP aumentou a proporção de *Firmicutes* no ambiente intestinal dos animais. Da mesma forma, enquanto animais sem SM apresentaram uma variação negativa nas proporções de *Firmicutes* ao longo do estudo, uma variação positiva foi observada nos grupos com SM. Essas alterações microbiológicas no ambiente intestinal provocadas pela SM e pela DP podem ser um fator-chave importante capaz de explicar a associação de ambas as condições, bem como suscita a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para as mesmas focadas na promoção do equilíbrio da microbiota intestinal.

Neste estudo, o percentual de células hepáticas gordurosas demonstrou-se estatisticamente superior nos animais dos grupos SM e SM-DP quando comparados àqueles dos grupos C e DP. Isso está em consonância com achados referentes ao perfil lipídico e gênico de adipocinas desses animais, parâmetros esses que estavam bastante alterados. O fígado é essencial na homeostase lipídica^{92, 180, 181} e a esteatose esteve frequentemente relacionada aos seus níveis mais elevados de LDL sérico^{165, 166}. É importante ressaltar que os valores de LDL podem sofrer variações em função de dislipidemia e presença de DP, conforme demonstrado por Kim, Shin et al. 2018¹⁸². O EO associado à esteatose causa alterações nos níveis de enzimas e no tecido hepático como um todo, especialmente em indivíduos obesos³⁸. Recentemente, um estudo reportou que foram encontrados valores de malondialdeído, um biomarcador do EO, mais elevados em amostras de fígado de animais com DP quando comparados aos animais controle. Esses valores também foram elevados em animais alimentados com uma dieta rica em

gorduras quando comparados aos animais alimentados com dieta controle¹⁸³. De fato, o EO observado na obesidade promove uma deterioração do quadro hepático^{184, 185}, o que pode explicar a maior susceptibilidade dos animais com SM para o desenvolvimento de periodontite no presente estudo.

A doença renal crônica é um problema de saúde pública mundial por ser um importante fator de risco para DCVs e morte prematura. Uma estreita associação foi encontrada entre a SM e o risco de desenvolver insuficiência renal, clinicamente expressa na forma de proteinúria ou doença renal crônica¹⁸⁴⁻¹⁸⁹. Vários mecanismos potenciais, incluindo resistência à insulina, aterosclerose renal e inflamação, induzem a deterioração da função renal^{185, 186, 188}. A DP pode provocar um estado inflamatório aumentado que pode ampliar, ou até mesmo iniciar disfunções endoteliais vasculares, bem como alterações oxidativas e metabólicas¹⁹⁰. Indivíduos com DP tem mais chances de sofrer diminuição da função renal¹⁹⁰, nefropatia diabética e morte cardiovascular¹⁸⁹ e aumento da mortalidade com doença renal crônica¹⁸⁵. Desta forma, pode-se sugerir uma associação bidirecional entre doença renal crônica e DP. No presente estudo, foi possível notar uma maior proteinúria em animais com DP quando comparados aos animais do grupo C. Outrossim, observou-se que os animais com SM, quando comparados aos animais sem SM, apresentaram maiores valores para proteinúria, bem como notou-se uma correlação significativamente positiva entre a perda óssea alveolar e proteinúria. É importante destacar aqui que os animais com SM apresentaram algum grau de disbiose intestinal neste estudo. Sabe-se que a microbiota intestinal tem uma relação íntima com a função renal. Logo, uma deterioração dessa relação pode resultar no surgimento de doenças renais¹⁹¹. Curiosamente, doenças renais e doenças inflamatórias intestinais compartilham algumas semelhanças no que tange à composição do microbioma intestinal. Em uma situação de disbiose intestinal, espécies dos gêneros *Bacteroidetes* e *Enterobacteriaceae/Proteobacteria* apresentam taxas aumentadas, enquanto outros gêneros como *Prevotella* e *Lactobacillus* apresentam taxas reduzidas^{187, 192, 193}. Estas espécies que estão aumentadas são capazes de induzir inflamação local e sistêmica, por exemplo, por meio do comprometimento da barreira intestinal¹⁹⁴, aumentando a proporção intestinal de linfócitos T helper 17 (TH-17)¹⁹⁵, e permitindo a translocação de lipopolissacarídeos (LPS) e componentes bacterianos intestinais para a circulação sistêmica¹⁹⁶. À medida que a função renal se deteriora, ocorrem várias mudanças na filtração renal de água, minerais, resíduos metabólicos e toxinas, bem como na função endócrina renal. A insuficiência renal resulta em sobrecarga de fluidos, acúmulo de

toxinas urêmicas e produtos residuais, hiperfosfatemia e distúrbios eletrolíticos que funcionam em conjunto para promover mudanças na microbiota intestinal por vários mecanismos¹⁸⁷. Deste modo, é plausível imaginar que a disfunção da barreira epitelial intestinal está associada às doenças renais¹⁹⁶, e que há uma relação bidirecional entre microbiota intestinal e o sistema renal.

A segunda linha de discussão será agora norteadada pelo impacto da terapia probiótica nos diversos parâmetros correlacionados com a perda óssea alveolar, o que pode explicar os mecanismos sistêmicos pelos quais a terapia pode auxiliar no controle da DP na presença de SM. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos SM e SMP em triglicerídeos, LDL, ácidos graxos, LEPR, NAMPT, AV (íleo), PC (íleo), razão AV/PC (íleo) e percentual de hepatócitos gordurosos. Quando se compara os Grupos SMDP e SMDPP, diferenças significativas foram observadas em colesterol total, triglicerídeos, ácidos graxos, FABP4, LEPR, NAMPT, percentual de hepatócitos gordurosos, AV (duodeno, jejuno e íleo) relação AV/PC (duodeno, jejuno e íleo) e proporções de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* nas fezes.

No presente estudo, a SM foi induzida por dieta hipercalórica com alta concentração de gordura, com composição semelhante àquela utilizadas em estudos prévios^{111, 139, 156, 157}. De fato, todos os animais dos grupos SM apresentaram alterações, quando comparados aos animais sem SM para colesterol total, HDL, LDL e ácidos graxos. As alterações desses parâmetros foram atenuadas pela terapia probiótica. O grupo SMP apresentou redução significativa de LDL, triglicerídeos e ácidos graxos quando comparado ao grupo SM. O grupo SMDPP apresentou redução de 23% nos níveis séricos de colesterol total quando comparado ao grupo SMDP. Esses dados são bem suportados pela literatura prévia^{158-160, 197} e podem ser explicados, entre outros fatores, pela habilidade de microrganismos probióticos em incorporar colesterol à sua membrana celular, reduzindo o total de colesterol intestinal disponível^{128, 158, 161, 197}. Diversos outros mecanismos de ação da terapia probiótica, como a modulação da microbiota intestinal, e do sistema imune, bem como a alteração da permeabilidade da barreira intestinal e produção de ácidos graxos de cadeia curta podem também estar ligados a esse fenômeno^{128, 160, 198, 199}.

No presente estudo, a proporção de hepatócitos com esteatose nos grupos SMDP e SM foi maior do que aquela observada nos grupos SMDPP e SMP, respectivamente. Nossos achados sugerem que a associação entre a SM e a DP pode ter um efeito colaborativo, levando a danos hepáticos mais graves. Estudos demonstraram que

patógenos periodontais podem se mover para o fígado, coração, tecido aórtico e pulmão, entre outros tecidos²⁰⁰⁻²⁰². Além disso, sabe-se que nos obesos com DP existe uma produção maior de citocinas inflamatórias no tecido adiposo e no fígado do que em não obesos sem periodontite^{203, 204}, o que sugere que a inflamação do tecido adiposo é significativamente agravada pela periodontite^{205, 206}. O uso de terapia probiótica tem sido proposta por diversos estudos devido aos efeitos sobre enzimas hepáticas, triglicerídeos séricos, glicemia de jejum e fibrose hepática²⁰⁷⁻²¹¹. Modelos animais e ensaios clínicos têm mostrado um efeito promissor com o uso da bacterioterapia no tratamento da esteatose^{102, 112-116} e da redução de perda óssea vista na DP²¹²⁻²¹⁴. Os probióticos agem alterando a composição dos micróbios intestinais, substituindo-os por um *pool* bacteriano saudável, o que resulta na redução da atividade de c-Jun N-terminal cinase (JNKs) e NF- κ B, que em última análise induzem a uma diminuição de TNF- α e uma subsequente diminuição da inflamação do fígado^{116, 117}.

No presente estudo, é possível constatar também o efeito da terapia probiótica na redução da expressão gênica de NAMPT, FABP4 e LEPR. As adipocinas, que regulam os processos inflamatórios e cicatriciais, quando exageradamente aumentadas, podem auxiliar na manutenção de elevados níveis séricos e locais de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, na presença da DP, em resposta à agressão de periodontopatógenos, as vias de inflamação são ativadas e o tecido adiposo passa a produzir mais citocinas pró-inflamatórias⁴⁵, o que pode aumentar a expressão de NAMPT, FABP4 e LEPR. A redução da inflamação local (no ambiente periodontal) e sistêmica decorrente da terapia probiótica pode ser um dos mecanismos capazes de explicar a menor expressão desses marcadores gênicos nos grupos SMP e SMDPP quando comparados aos grupos SM e SMDP. Em um estudo prévio de nosso grupo⁴, foi demonstrado que animais com SM e/ou DP tratados com probiótico apresentaram maior concentração de TGF- β nos tecidos periodontais quando comparado àqueles não tratados com probióticos, bem como menor proporção RANKL/Osteoprotegerina (OPG) e concentrações significativamente menores de IL-1 β , TNF- α e IL-6. De fato, algumas revisões sistemáticas^{215, 216}, ensaios clínicos^{102, 104} e estudos pré-clínicos^{110, 133, 217, 218} oferecem suporte ao uso do probiótico com o objetivo de controlar ou reduzir marcadores inflamatórios locais na DP. Essa redução local da inflamação pode repercutir nos níveis de NAMPT, FABP4 e LEPR. Li et al.^{91, 13} relataram que o nível sérico de FABP4 pode ser reduzido em resposta ao tratamento da periodontite. Sabe-se que a FABP4, uma proteína de transporte intracelular de ácidos graxos, tem íntima associação com doenças sistêmicas devido sua ligação de alta

afinidade a ácidos graxos de cadeia longa, podendo regular a captação, liberação e armazenamento de ácidos graxos^{92, 219, 220}. Kim et al⁶⁶ demonstraram que os níveis séricos de anticorpos contra *P. gingivalis* correlacionaram-se com os níveis séricos de FABP4 em humanos. Considerando que FABP4 é um importante fator de risco para diversas doenças sistêmicas, estes estudos mostram não apenas a correlação entre os níveis circulantes de FABP4 e periodontite, mas também a contribuição potencial da periodontite para a progressão de doenças sistêmicas e vice-versa. De modo bastante semelhante, outros estudos^{65, 221, 222} demonstraram uma associação de NAMPT e LEPR com as condições periodontais, evidenciando redução da expressão dessas adipocinas seguida da melhora do quadro periodontal. Portanto, a redução da inflamação local pela terapia probiótica pode explicar as menores expressões dessas adipocinas no grupo SMDPP quando comparado ao grupo SMDP. É importante ressaltar ainda que os efeitos de probióticos na inflamação sistêmica também podem ter contribuído para esses resultados. Existe um corpo robusto de evidências que demonstram que o uso do probiótico pode promover redução de marcadores inflamatórios sistêmicos, como IL-1 β , TNF- α e IL-6²²³⁻²²⁷.

Continuando o raciocínio anterior sobre os efeitos da terapia probiótica na expressão de NAMPT, LEPR e FABP4, merece destaque aqui os possíveis efeitos diretos de probióticos nessas adipocinas e não apenas seus efeitos indiretos em função da redução do quadro inflamatório local ou sistêmico. Sabe-se que a expressão exacerbada de adipocinas pode resultar em acentuada obesidade e acúmulo anormal de ácidos graxos no fígado, resultando em fígado gorduroso ou esteatose hepática^{42, 71, 166}. A resistência à insulina é a principal causa de distúrbios metabólicos que levam ao acúmulo de gordura¹¹³. Os ácidos graxos livres liberados no sangue aumentam o influxo de ácidos graxos no fígado, aumentando o acúmulo de gordura hepática. O mecanismo exato do desenvolvimento da esteatose não alcoólica não é totalmente compreendido, mas o acúmulo de gordura hepática é considerado uma característica da resistência à insulina na obesidade abdominal e tem íntima relação com a SM. Deste modo, o consumo a longo prazo de dietas ricas em gordura resultará em: ganho de peso corporal, acúmulo de gordura hepática e a proliferação de adipócitos hepáticos, levando à obesidade. Na última década, formou-se um lastro bem fundamentado de evidências que apontam para o potencial de cepas probióticas na modulação da resposta imune^{223, 228-231} e exercem efeitos anti-obesidade^{207, 208, 232, 233}. Em particular, as espécies produtoras de ácido láctico, como o *Lactobacillus*, exibem um efeito anti-obesidade ao regular a expressão de genes

relacionados à adipogênese^{232, 234}. Assim, os genes lipogênicos são os principais reguladores da síntese²³⁵ e acúmulo²³⁶ de ácidos graxos e diferenciação dos adipócitos²³⁷.

No presente estudo, a administração de *B. lactis* HN019 reduziu o percentual de células gordurosas do fígado nos grupos SMP e SMDPP em comparação com os animais dos grupos SM e SMDP, respectivamente, bem como de triglicerídeos séricos concomitantemente com a regulação negativa de LEPR, FABP4 e NAMPT em células adiposas brancas. Portanto, pode-se aventar a hipótese de que a administração de *B. lactis* HN019 promove regulação negativa de LEPR, FABP4 e NAMPT, resultando em redução da gordura corporal e melhora da esteatose hepática em ratos com SM. É possível que os ácidos graxos de cadeia curta, produzidos pelo probiótico administrado, exercem um efeito anti-obesidade por meio da modulação do metabolismo de lipídios e glicose^{212, 238, 239}, resultando na redução do tamanho e quantidade dos adipócitos^{240, 241}. Em outras palavras, os ácidos graxos de cadeia curta podem mudar o estado metabólico de lipogênese para oxidação de gordura, regulando a expressão de adipocinas.

No presente estudo, os animais do grupo SMDPP apresentaram menor proteinúria em relação ao grupo SMDP. O efeito protetor para a função renal proporcionado pela terapia probiótica pode ser explicado, entre outros mecanismos, pela ação dos microrganismos probióticos na redução e controle da disbiose intestinal. Sabe-se que existe uma relação direta entre microbiota intestinal/inflamação e o sistema renal^{186, 242-244}, o que pode ser explicado pela sobrecarga de fluidos resultantes da insuficiência renal, acúmulo de toxinas urêmicas e produtos residuais e distúrbios eletrolíticos que funcionam em conjunto para promover mudanças na microbiota intestinal por vários mecanismos¹⁹⁶. O uso frequente de iogurte e/ou probióticos está associado à diminuição das chances de doença renal proteinúrica²⁴⁵ e pode retardar a progressão da lesão da função renal, melhorar o metabolismo da glicose e lipídios e reduzir a inflamação e EO em pacientes com doenças renais crônicas²¹⁶. Acredita-se que a disfunção da barreira epitelial intestinal associada as doenças renais¹⁸⁷ e que o acúmulo de toxinas urêmicas derivadas do intestino^{239, 246}, podem ser, em parte, mediada pela disbiose da microbiota intestinal²⁴⁷. No presente estudo, o grupo SMDP apresentou maior proporção de *Firmicutes* no ambiente intestinal, um quadro sugestivo de disbiose, quando comparado ao grupo SMDPP. A melhora na função renal do grupo SMDPP quando comparado ao grupo SMDP pode também ser explicada pelo controle exercido pela terapia probiótica na DP. De fato, pode existir uma associação bidirecional entre doença renal crônica e DP

Neste estudo, a terapia probiótica mudou a morfologia do ambiente intestinal de alguns grupos de animais. Uma maior relação AV/PC foi observada no grupo SMDPP quando comparado ao grupo SMDP. A altura das vilosidades intestinais, profundidade de criptas e razão AV/PC são parâmetros importantes que correlacionam-se com a integridade da morfologia e função intestinais²⁴⁸. Alguns estudos já demonstraram²⁴⁹⁻²⁵¹ que o consumo de probióticos exerce influência positiva estimulando o aumento das vilosidades intestinais, da profundidade das criptas e da razão AV/PC. Além disso, o grupo SMDPP apresentou menor proporção de *Firmicutes* quando comparado ao grupo SMDP. Terapias destinadas às mudanças diretas ou indiretas dessa microbiota intestinal podem ser estratégias importantes para controle das comorbidades da SM e controle da DP nesses pacientes. O transplante de microbiota intestinal de doadores não portadores de diabetes mellitus, por exemplo, para pacientes com SM foi capaz de promover melhora na sensibilidade à insulina²⁵². Além dos efeitos diretos de probióticos no ambiente intestinal, pode-se também considerar seus efeitos indiretos em função do controle da DP. No presente estudo, o grupo SMDPP apresentou DP menos grave e melhores parâmetros microbiológicos e morfométricos intestinais quando comparado ao grupo SMDP. A resposta inflamatória que ocorre na DP pode repercutir no microambiente intestinal, bem como no arcabouço celular de criptas e vilosidades que formam o intestino humano de tal modo que é possível estabelecer um elo entre a DP e outras doenças inflamatórias intestinais, especialmente aquelas alterações que atingem o intestino delgado¹⁷⁹. Essa parte do intestino compreende o duodeno, o jejuno e o íleo, e é responsável pela absorção dos nutrientes. No intestino delgado, a presença de bactérias benéficas, quando em equilíbrio, desempenha papel essencial nos processos imunológicos, nutricionais e patológicos²⁵³. Agentes prejudiciais, como, por exemplo, toxinas bacterianas e metabólitos, podem danificar a parede epitelial do intestino, uma vez que ocorre a disbiose da microbiota e as bactérias nocivas tornam-se predominantes¹¹³. Tem sido relatado ainda que a microbiota oral disbiótica, presente na DP pode impactar a microbiota intestinal, favorecendo o desenvolvimento ou agravamento de doença sistêmicas^{9, 179, 218}. Um dos mecanismos propostos é que ulceração do epitélio do sulco, presente na bolsa periodontal, permite a entrada bacteriana na corrente sanguínea, bem como de mediadores da resposta inflamatória local, os quais, então, disseminam-se para diferentes órgãos do corpo humano²⁵⁴. A microbiota intestinal disbiótica pode também promover uma resposta inflamatória sistêmica, o que contribuirá para o desequilíbrio da microbiota oral^{9, 179}. Essas evidências e hipóteses mostram a complexa relação entre os

ecossistemas do eixo boca-intestino e podem explicar a maior severidade da DP nos animais do grupo SMDP quando comparados àqueles do grupo SMDPP, uma vez que estes últimos receberam uma terapia capaz de mitigar os efeitos locais e sistêmicos da DP e da SM. Lourenço et al¹⁷⁹ caracterizam o microbioma intestinal de indivíduos com diferentes condições periodontais e descobriram que um subconjunto de espécies, de fato, se correlaciona significativamente com sangramento e destruição do tecido periodontal, ou seja, há ambientes intestinais diferentes a depender das condições de saúde ou doença no ambiente bucal.

No presente estudo, a terapia probiótica não alterou de forma significativa as proporções de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* nas fezes dos animais. Sabe-se que *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* estão presentes em maiores proporções em mamíferos durante o período de amamentação e nos primeiros anos de vida, sendo considerados fundamentais no desenvolvimento do sistema imune e metabolismo do hospedeiro⁶⁹. Embora já tenha sido demonstrado que a terapia probiótica pode causar alterações na composição da microbiota intestinal, associadas ou não a alterações metabólicas^{126, 152, 153, 192, 255, 256}, não existe unanimidade sobre seus efeitos. O consumo de queijo probiótico contendo duas cepas de *Lactobacillus* não foi capaz de modificar significativamente os níveis dos principais grupos microbianos, como *Bifidobacterium* e *Bacteroidetes* em idosos²⁵⁷. De forma semelhante, em um estudo conduzido em gêmeas monozigótica²⁵⁸, não foram observadas alterações na composição das espécies microbianas intestinais após o consumo de leite fermentado contendo *B. lactis* CNCM I-2494. Todavia, os autores reportaram alterações significativas no metatranscriptoma das amostras fecais durante o período no qual houve consumo de probiótico²⁵⁸, o que demonstra que alterações funcionais podem ser mais importantes que alterações meramente composicionais.

Dessa forma, é possível imaginar no presente estudo que, mesmo sem promover alterações significativas nas proporções de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* entre os grupos experimentais, o probiótico foi capaz de proporcionar mudanças qualitativas no intestino dos animais, fato que impactou positivamente na mitigação do dano periodontal nos grupos com DP. A ingestão de probiótico pode não provocar alterações quantitativas da microbiota intestinal, mas alterações qualitativas são possíveis²⁵⁹. Alguns mecanismos foram propostos para explicar a atuação de PROB na modulação da microbiota intestinal, o que não implica necessariamente na mudança de composição ou da quantidade de espécies bacterianas: i) o aumento da função da barreira epitelial intestinal^{194, 215, 248, 249}; ii) produção de antimicrobianos^{152, 260, 261}; iii) competição por sítios de ligação com

potenciais patógenos^{1, 100, 152, 262}; iv) interferência na eficiência da colonização e formação do biofilme¹⁰⁹; v) modulação imune através da inibição de citocinas pró-inflamatórias¹¹⁰; iv) alteração do metabolismo da microbiota por meio da presença e produção de substâncias que influenciam o comportamento metabólico e consequente produção de demais substâncias por bactérias comensais (relação conhecida como “cross-feeding”)²⁶³.

Em suma, este é o primeiro estudo que investigou o potencial da terapia probiótica na associação SM-DP, avaliando a expressão de genes lipogênicos, esteatose hepática, níveis de proteinúria e perfil microbiológico intestinal. Os resultados obtidos demonstraram que diversos fatores metabólicos, genéticos e microbiológicos correlacionaram-se com a perda óssea alveolar e podem explicar a susceptibilidade aumentada ao desenvolvimento de DP na presença de SM. Dessa forma, a utilização de medidas para o controle da DP na presença de SM deve ultrapassar o âmbito local e atingir o âmbito sistêmico, tendo neste último fatores metabólicos, genéticos e microbiológicos como alvo. Embora a terapia probiótica adotada no presente estudo tenha demonstrado ser uma estratégia terapêutica potencial para a associação SM-DP, é importante ressaltar que os resultados não podem ser generalizados. Em se tratando de probióticos, alguns fatores são determinantes para os resultados obtidos. Os efeitos dos probióticos são cepa-específicos e também podem variar de acordo com a dose e via de administração¹⁰⁰

A literatura relata efeitos distintos de microrganismos probióticos na redução da esteatose hepática, por exemplo, sendo que bactérias do gênero *Bifidobacterium* proporcionaram melhores resultados do que aquelas do gênero *Lactobacillus*²⁶⁴. Para controlar os níveis de glicemia em jejum, a ingestão de suplementos contendo leveduras foi uma estratégia com melhores resultados em comparação com a ingestão de bactéria²⁶⁴, o que pode ajudar a explicar a não detecção da influência da terapia probiótica nos valores de glicemia no presente estudo. Não apenas a cepa do microrganismo pode impactar os resultados na terapia probiótica, mas também se sua utilização ocorre de forma isolada ou em combinação com outras espécies de microrganismos. No tratamento da obesidade, o uso de uma única cepa probiótica parece ter sido mais promissor do que uma combinação de cepas probióticas^{265-269, 266}. Já no tratamento de diabetes mellitus e de hipertensão arterial²⁶⁶⁻²⁶⁹, maior eficácia terapêutica parece ter sido proporcionada pelo uso de múltiplas espécies de probióticos, provavelmente devido às interações sinérgicas entre as diferentes espécies/cepas²⁶⁶. Outro ponto a ser abordado e que pode influenciar na eficácia da terapia probiótica é a forma de administração (leite ou derivados versus pó/cápsulas)^{133, 262}, bem como o veículo utilizada para transportar os microrganismos no

trato gastrointestinal²¹⁷. Em relação à duração da intervenção, maiores benefícios são proporcionados para intervenções de longo prazo (mais de 4 ou 6 semanas)^{281, 286-289}. Além disso, outro ponto relevante diz respeito à dosagem. No presente estudo, utilizou-se uma dosagem superior a 10 bilhões de UFC. De fato, a literatura relata, apesar de algumas inconsistências, que uma dose mais alta (> 10 bilhões de UFCs) pode resultar em um número maior de bactérias sobreviventes no trato gastrointestinal, favorecendo a colonização do intestino por estes microrganismos^{280, 284}.

Novos estudos envolvendo modelos animais de maior escala filogenética, bem como diferentes dosagens de *B. lactis* HN019, combinações de cepas, vias de administração alternativas e uso de microrganismos inativados são importantes para melhor compreensão dos benefícios da terapia probiótica na associação SM-DP. O presente estudo não promoveu nenhuma análise do microbioma bucal dos animais. Futuros estudos correlacionando dados microbiológicos do biofilme bucal e da microbiota intestinal com diversos fatores locais e sistêmicos são fundamentais para melhor elucidar os mecanismos envolvidos no uso de probióticos para o tratamento ou prevenção de DP quando associada a condições sistêmicas alteradas do hospedeiro, como a SM. Além disso, o foco das investigações deve ser a análise do perfil funcional da microbiota²⁷⁰. Devido a melhores técnicas de sequenciamento, como o *shotgun*, mais informações sobre diferenças entre espécies/linhagens e funcionalidade podem ser obtidas e auxiliar na melhor compreensão do papel da microbiota na patofisiologia da associação SM-DP.

6. CONCLUSÃO

Dentro das limitações do presente estudo, é possível concluir que:

- i) Diferentes fatores microbiológicos, genéticos e metabólicos estão alterados na SM e apresentam significativa correlação com a perda óssea alveolar (tais como: esteatose hepática, expressão relativa de NAMPT e LEPR, valores de ácidos graxos, profundidade de cripta intestinal, perfil de proteinúria e proporções de *bacteroidetes* nas fezes), podendo explicar a susceptibilidade aumentada de animais com SM ao desenvolvimento de DP com maior gravidade;
- ii) A terapia probiótica utilizando *B. lactis* HN019 em animais com SM e DP é capaz de modular diversos fatores microbiológicos, genéticos e metabólicos (colesterol total, triglicerídeos, ácidos graxos, expressão gênica de FABP4, LEPR e NAMPT, níveis de esteatose hepática, altura de vilosidade e profundidade de criptas intestinais e proporções de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* nas fezes), promovendo impacto significativo na redução da gravidade dos danos ocasionados pela DP nos tecidos periodontais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontology 2000* 2009;51:141-151.
2. Alvear FS, VÃ©copyrightlez MaE, Botero L. Factores de riesgo para las enfermedades periodontales. *Revista Facultad de OdontologÃa Universidad de Antioquia* 2010;22:109-116.
3. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000* 1997;14:9-11.
4. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology* 2005;32 Suppl 6:108-129.
5. Sanz M, Marco del Castillo A, Jepsen S, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *Journal of clinical periodontology* 2020;47:268-288.
6. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)* 2017;11:72-80.
7. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of dental research* 2012;91:914-920.
8. Carvajal P, Vernal R, Reinero D, et al. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section II: Introduction part II. *Brazilian oral research* 2020;34.
9. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology* 2012;27:409-419.
10. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:134-144.
11. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *Journal of clinical microbiology* 2006;44:3665-3673.
12. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 2012;55:21-31.
13. Jiang Y, Zhou X, Cheng L, Li M. The Impact of Smoking on Subgingival Microflora: From Periodontal Health to Disease. *Frontiers in Microbiology* 2020;11.
14. Czesnikiewicz-Guzik M, Osmenda G, Siedlinski M, et al. Causal association between periodontitis and hypertension: evidence from Mendelian randomization and a randomized controlled trial of non-surgical periodontal therapy. *European Heart Journal* 2019;40:3459-3470.
15. Martinez-Herrera M, Silvestre-Rangil J, Silvestre FJ. Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2017;22:e708-e715.
16. Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez MJ, Gil Á, Gómez-Llorente C. Effects of Probiotics on Metabolic Syndrome: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Nutrients* 2020;12:124.
17. Barros SP, Offenbacher S. Modifiable risk factors in periodontal disease: epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response. *Periodontol 2000* 2014;64:95-110.
18. Gomes-Filho IS, das Mercês MC, de Santana Passos-Soares J, et al. Severity of Periodontitis and Metabolic Syndrome: Is There an Association? *J Periodontol* 2016;87:357-366.
19. Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, et al. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of periodontology* 2009;80:1021-1032.

20. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet (London, England)* 2005;365:1415-1428.
21. Borges PK, Gimeno SG, Tomita NE, Ferreira SR. [Prevalence and characteristics associated with metabolic syndrome in Japanese-Brazilians with and without periodontal disease]. *Cadernos de saude publica* 2007;23:657-668.
22. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *Jama* 2004;292:1440-1446.
23. Mattavelli E, Catapano AL. Molecular Immune-Inflammatory Connections between Dietary Fats and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Which Translation into Clinics? 2021;13.
24. Xu H, Li X, Adams H, Kubena K, Guo S. Etiology of Metabolic Syndrome and Dietary Intervention. *International journal of molecular sciences* 2018;20.
25. Ismaiel A, Dumitraşcu DL. Cardiovascular Risk in Fatty Liver Disease: The Liver-Heart Axis-Literature Review. *Frontiers in medicine* 2019;6:202.
26. Guembe MJ, Fernandez-Lazaro CI. Risk for cardiovascular disease associated with metabolic syndrome and its components: a 13-year prospective study in the RIVANA cohort. 2020;19:195.
27. Nibali L, Tatarakis N, Needleman I, et al. Clinical review: Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013;98:913-920.
28. Lee K-S, Lee SG, Kim E-K, et al. Metabolic syndrome parameters in adolescents may be determinants for the future periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology* 2015;42:105-112.
29. Grundy SM. Metabolic syndrome: therapeutic considerations. *Handbook of experimental pharmacology* 2005:107-133.
30. Dregan A, Charlton J, Chowienczyk P, Gulliford MC. Chronic inflammatory disorders and risk of type 2 diabetes mellitus, coronary heart disease, and stroke: a population-based cohort study. *Circulation* 2014;130:837-844.
31. Thanakun S, Watanabe H, Thaweboon S, Izumi Y. Association of untreated metabolic syndrome with moderate to severe periodontitis in Thai population. *Journal of periodontology* 2014;85:1502-1514.
32. Morita T, Yamazaki Y, Mita A, et al. A cohort study on the association between periodontal disease and the development of metabolic syndrome. *Journal of periodontology* 2010;81:512-519.
33. Nibali L, Tatarakis N, Needleman I, et al. Association Between Metabolic Syndrome and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013;98:913-920.
34. Acharya A, Bhavsar N, Jadav B, Parikh H. Cardioprotective effect of periodontal therapy in metabolic syndrome: a pilot study in Indian subjects. *Metabolic syndrome and related disorders* 2010;8:335-341.
35. Lamster IB, Pagan M. Periodontal disease and the metabolic syndrome. *International Dental Journal* 2017;67:67-77.
36. Jenzsch A, Eick S, Rassoul F, Purschwitz R, Jentsch H. Nutritional intervention in patients with periodontal disease: clinical, immunological and microbiological variables during 12 months. *The British journal of nutrition* 2009;101:879-885.
37. Campos JR, Costa FO. Association between periodontitis and metabolic syndrome: A case-control study. 2020;91:784-791.
38. Gomes-Filho IS, Balinha I, da Cruz SS, et al. Moderate and severe periodontitis are positively associated with metabolic syndrome. *Clinical oral investigations* 2021;25:3719-3727.

39. Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *Journal of clinical periodontology* 2006;33:401-407.
40. Han W, Ji T, Wang L, et al. Abnormalities in periodontal and salivary tissues in conditional presenilin 1 and presenilin 2 double knockout mice. *Molecular and cellular biochemistry* 2011;347:13-20.
41. Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Machigashira M, Matsuyama T, Matsuguchi T. Oxidative stress causes alveolar bone loss in metabolic syndrome model mice with type 2 diabetes. *Journal of periodontal research* 2009;44:43-51.
42. Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology 2000* 2014;64:139-153.
43. Rizzo M, Cappello F, Marfil R, et al. Heat-shock protein 60 kDa and atherogenic dyslipidemia in patients with untreated mild periodontitis: a pilot study. *Cell stress & chaperones* 2012;17:399-407.
44. Andriankaja OM, Sreenivasa S, Dunford R, DeNardin E. Association between metabolic syndrome and periodontal disease. *Australian dental journal* 2010;55:252-259.
45. Wang D, Nagasawa T, Chen Y, et al. Molecular mimicry of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* with beta2 glycoprotein I. *Oral microbiology and immunology* 2008;23:401-405.
46. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004;24:816-823.
47. Tóthová Lu, Celec P. Oxidative Stress and Antioxidants in the Diagnosis and Therapy of Periodontitis. *Frontiers in physiology* 2017;8.
48. Detzen L, Cheng B, Chen C-Y, Papapanou PN, Lalla E. Soluble Forms of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) in Periodontitis. *Scientific reports* 2019;9:8170.
49. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *Journal of clinical periodontology* 2005;32:40-44.
50. Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of clinical periodontology* 2013;40 Suppl 14:S113-134.
51. Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A Role for Advanced Glycation End Products in Diminished Bone Healing in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2003;52:1502-1510.
52. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, et al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996;67:1085-1093.
53. Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature clinical practice Rheumatology* 2007;3:716-724.
54. Gomez R, Lago F, Gomez-Reino J, Dieguez C, Gualillo O. Adipokines in the skeleton: influence on cartilage function and joint degenerative diseases. *Journal of molecular endocrinology* 2009;43:11-18.
55. Zhang L, Meng S, Tu Q, et al. Adiponectin ameliorates experimental periodontitis in diet-induced obesity mice. *PloS one* 2014;9:e97824.
56. Damanaki A, Nokhbehshaim M, Eick S. Regulation of NAMPT in human gingival fibroblasts and biopsies. 2014;2014:912821.

57. Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H, Sugita N, Yoshie H. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *Journal of periodontology* 2010;81:1118-1123.
58. Luo S, Yang X, Wang D, et al. Periodontitis contributes to aberrant metabolism in type 2 diabetes mellitus rats by stimulating the expression of adipokines. *Journal of periodontal research* 2016;51:453-461.
59. Zimmermann GS, Bastos MF, Dias Gonçalves TE, Chambrone L, Duarte PM. Local and circulating levels of adipocytokines in obese and normal weight individuals with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2013;84:624-633.
60. Le Sage F, Meilhac O, Gonthier M-P. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces pro-inflammatory adipokine secretion and oxidative stress by regulating Toll-like receptor-mediated signaling pathways and redox enzymes in adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2017;446:102-110.
61. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 2014;105:141-150.
62. Esteve Rafols M. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinologia y nutricion : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion* 2014;61:100-112.
63. Stofkova A. Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocrine regulations* 2009;43:157-168.
64. Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1212:E1.
65. Park KH, Kim DK, Huh YH, et al. NAMPT enzyme activity regulates catabolic gene expression in gingival fibroblasts during periodontitis. *Experimental & molecular medicine* 2017;49:e368.
66. Kim DJ, Rho JH, Woo BH, Joo JY. Periodontal Pathogens Modulate Lipid Flux via Fatty Acid Binding Protein 4. 2019;98:1511-1520.
67. Patel SB, Reams GP, Spear RM, Freeman RH, Villarreal D. Leptin: linking obesity, the metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Current hypertension reports* 2008;10:131-137.
68. Zhang C, Zhu R, Wang H, et al. Nicotinamide Phosphate Transferase (NAMPT) Increases in Plasma in Patients with Acute Coronary Syndromes, and Promotes Macrophages to M2 Polarization. *International heart journal* 2018;59:1116-1122.
69. Halvorsen B, Espeland MZ, Andersen G, et al. Increased expression of NAMPT in PBMC from patients with acute coronary syndrome and in inflammatory M1 macrophages. *Atherosclerosis* 2015;243:204-210.
70. Fellmann L, Nascimento AR, Tibirica E, Bousquet P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology & therapeutics* 2013;137:331-340.
71. Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Seminars in nephrology* 2013;33:2-13.
72. Krysiak R, Handzlik-Orlik G, Okopien B. The role of adipokines in connective tissue diseases. *European journal of nutrition* 2012;51:513-528.
73. Garten A, Schuster S, Penke M, Gorski T, de Giorgis T, Kiess W. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nature reviews Endocrinology* 2015;11:535-546.
74. Chang YH, Chang DM, Lin KC, Shin SJ, Lee YJ. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2011;27:515-527.

75. Pradeep A, Raghavendra N, Prasad MR, Kathariya R, Patel SP, Sharma A. Gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration: their relationship in periodontal health and disease. *Journal of periodontology* 2011;82:1314-1319.
76. Tabari ZA, Ghaedi FB, Azadmehr A, et al. Salivary Visfatin Concentration in Response to Non-surgical Periodontal Therapy. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2015;9:ZC05-ZC08.
77. Wu Y, Chen L, Wei B, Luo K, Yan F. Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Visfatin Concentrations in Serum and Gingival Crevicular Fluid of Patients With Chronic Periodontitis and Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Periodontology* 2015;86:795-800.
78. Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro JI, Sodhi K. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *International journal of medical sciences* 2016;13:25-38.
79. La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine* 2017;98:51-58.
80. Karthikeyan BV, Pradeep AR. Leptin levels in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J Periodontal Res* 2007;42:300-304.
81. Zhu J, Guo B, Gan X, et al. Association of circulating leptin and adiponectin with periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC oral health* 2017;17:104.
82. Ahuja CR, Kolte AP, Kolte RA. Effect of non-surgical periodontal treatment on gingival crevicular fluid and serum leptin levels in periodontally healthy chronic periodontitis and chronic periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus. 2019;10:e12420.
83. Karthikeyan BV, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid and serum leptin: their relationship to periodontal health and disease. *Journal of clinical periodontology* 2007;34:467-472.
84. Nokhbehshaim M, Keser S, Nogueira AV. Beneficial effects of adiponectin on periodontal ligament cells under normal and regenerative conditions. 2014;2014:796565.
85. Nogueira AV, Nokhbehshaim M, Eick S, et al. Regulation of visfatin by microbial and biomechanical signals in PDL cells. *Clinical oral investigations* 2014;18:171-178.
86. Nokhbehshaim M, Eick S, Nogueira AV, et al. Stimulation of MMP-1 and CCL2 by NAMPT in PDL cells. *Mediators of inflammation* 2013;2013:437123.
87. Matarese V, Bernlohr DA. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 1988;263:14544-14551.
88. Hofer P, Boeszoeremenyi A, Jaeger D, et al. Fatty Acid-binding Proteins Interact with Comparative Gene Identification-58 Linking Lipolysis with Lipid Ligand Shuttling. *The Journal of biological chemistry* 2015;290:18438-18453.
89. Prentice KJ, Saksi J, Hotamisligil GS. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *Journal of lipid research* 2019;60:734-740.
90. Cao H, Sekiya M, Ertunc ME, et al. Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell metabolism* 2013;17:768-778.
91. Li G, Robles S, Lu Z, et al. Upregulation of free fatty acid receptors in periodontal tissues of patients with metabolic syndrome and periodontitis. *J Periodontal Res* 2019;54:356-363.
92. Li HL, Wu X, Xu A, Hoo RL. A-FABP in Metabolic Diseases and the Therapeutic Implications: An Update. *International journal of molecular sciences* 2021;22.
93. Meshkani R, Vakili S. Tissue resident macrophages: Key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2016;462:77-89.
94. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol* 2000 2011;55:36-47.
95. Moreira AL, Novaes AB, Jr., Grisi MF, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* 2015;86:376-386.

96. Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *Journal of periodontal research* 2014;49:785-791.
97. Colombo APV, Bennet S, Cotton SL, et al. Impact of Periodontal Therapy on the Subgingival Microbiota of Severe Periodontitis: Comparison Between Good Responders and Individuals With Refractory Periodontitis Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. *Journal of Periodontology* 2012;83:1279-1287.
98. Slots J. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2004;75:1553-1565.
99. Lanau N, Mareque-Bueno J, Zabalza M. Does Periodontal Treatment Help in Arterial Hypertension Control? A Systematic Review of Literature. *European journal of dentistry* 2021;15:168-173.
100. Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *Journal of clinical periodontology* 2011;38 Suppl 1:159-177.
101. Tsubura S, Mizunuma H, Ishikawa S, et al. The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2009;28:1353-1356.
102. Invernici MM, Salvador SL, Silva PHF, et al. Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. 2018;45:1198-1210.
103. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology* 1997;24:324-334.
104. Invernici MM, Furlaneto FAC, Salvador SL, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. 2020;15:e0238425.
105. Ince G, Gursoy H, Ipci SD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yilmaz S. Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *Journal of periodontology* 2015;86:746-754.
106. Kuru BE, Laleman I, Yalnizoglu T, Kuru L, Teughels W. The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol* 2017;88:1115-1123.
107. Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpinski TM. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 2014;62:495-500.
108. Shah MP, Gujjari SK, Chandrasekhar VS. Evaluation of the effect of probiotic (inersan(R)) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2013;7:595-600.
109. 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. *Journal of clinical periodontology* 2013;40:1025-1035.
110. Oliveira LF, Salvador SL, Silva PH, et al. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol* 2017;88:197-208.
111. Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS one* 2017;12:e0179946.

112. Patel AK, Singhanian RR, Pandey A, Chincholkar SB. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. *Applied biochemistry and biotechnology* 2010;162:166-180.
113. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761-1772.
114. Sharafedtinov KK, Plotnikova OA, Alexeeva RI, et al. Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients--a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutrition journal* 2013;12:138-138.
115. Wang LX, Liu K, Gao DW, Hao JK. Protective effects of two *Lactobacillus plantarum* strains in hyperlipidemic mice. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2013;19:3150-3156.
116. Barreto FM, Colado Simao AN, Morimoto HK, Batisti Lozovoy MA, Dichi I, Helena da Silva Miglioranza L. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 2014;30:939-942.
117. Tenorio-Jimenez C, Martinez-Ramirez MJ, Gil A, Gomez-Llorente C. Effects of Probiotics on Metabolic Syndrome: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Nutrients* 2020;12.
118. Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by lactococci. *Journal of dairy science* 2002;85:3182-3188.
119. Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology* 2006;72:1729-1738.
120. Kang Y, Cai Y. Gut microbiota and hypertension: From pathogenesis to new therapeutic strategies. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 2018;42:110-117.
121. Li J, Zhao F, Wang Y, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome* 2017;5:14.
122. Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Malhotra M, et al. Effect of orally administered *L. fermentum* NCIMB 5221 on markers of metabolic syndrome: an in vivo analysis using ZDF rats. *Applied microbiology and biotechnology* 2014;98:115-126.
123. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology (Bethesda, Md)* 2016;31:283-293.
124. Ianiro G, Bibbo S, Gasbarrini A, Cammarota G. Therapeutic modulation of gut microbiota: current clinical applications and future perspectives. *Current drug targets* 2014;15:762-770.
125. Indiani C, Rizzardi KF, Castelo PM, Ferraz LFC, Darrieux M, Parisotto TM. Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Childhood obesity (Print)* 2018;14:501-509.
126. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009;58:1091-1103.
127. Chen J, Wang R, Li X-F, Wang R-L. Bifidobacterium adolescentis supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *The British journal of nutrition* 2012;107:1429-1434.
128. Virto L, Cano P, Jiménez-Ortega V, et al. Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *Journal of periodontology* 2018;89:176-185.
129. Wang J, Tang H, Zhang C, et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *The ISME journal* 2015;9:1-15.
130. Lebovitz HE. Insulin: potential negative consequences of early routine use in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 2011;34 Suppl 2:S225-230.

131. Nokhbehsaim M, Keser S, Jäger A, Jepsen S, Deschner J. Regulation of Regenerative Periodontal Healing by NAMPT. *Mediators of inflammation* 2013;2013:202530.
132. Silva GA, Moreira ALG, Silva PHF. The use of probiotics can reduce the severity of experimental periodontitis in rats with metabolic syndrome: An immunoenzymatic and microtomographic study. 2021.
133. de Oliveira LFF, Silva PHF. Probiotic consumption can modify the resilience of periodontal tissues in rats under experimental periodontitis. 2022.
134. SILVA GA. Efeitos da terapia probiótica na periodontite experimental em ratos portadores de síndrome metabólica induzida por meio de dieta hiperlipídica. *USP* 2021:130.
135. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *The Journal of nutrition* 1997;127:838s-841s.
136. Cheng HS, Ton SH, Tan JBL, Abdul Kadir K. The Ameliorative Effects of a Tocotrienol-Rich Fraction on the AGE-RAGE Axis and Hypertension in High-Fat-Diet-Fed Rats with Metabolic Syndrome. In: *Nutrients*. vol. 9, 2017.
137. Marques C, Meireles M, Norberto S, et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte* 2016;5:11-21.
138. Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. *Archives of endocrinology and metabolism* 2016;60:138-142.
139. Oliveira LFF, Salvador SL, Silva PHF, et al. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *Journal of periodontology* 2017;88:197-208.
140. Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2005;42:665-674.
141. Sanz M, D'Aiuto F, Deanfield J, Fernandez-Avilés F. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease—scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. *European Heart Journal Supplements* 2010;12:B3-B12.
142. Chapple ILC, Bouchard P, Cagetti MG, et al. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology* 2017;44:S39-S51.
143. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res* 2014;93:1045-1053.
144. Eke PI, Thornton-Evans G, Dye B, Genco R. Advances in surveillance of periodontitis: the Centers for Disease Control and Prevention periodontal disease surveillance project. *J Periodontol* 2012;83:1337-1342.
145. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 2015;69:7-17.
146. Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *Journal of clinical periodontology* 2017;44 Suppl 18:S23-s38.
147. Garcia RI, Krall EA, Vokonas PS. Periodontal disease and mortality from all causes in the VA Dental Longitudinal Study. *Annals of periodontology* 1998;3:339-349.
148. Ramseier CA, Anerud A, Dulac M, et al. Natural history of periodontitis: Disease progression and tooth loss over 40 years. *Journal of clinical periodontology* 2017;44:1182-1191.

149. Cardoso RS, Messori MR, Silva PHF, et al. Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis. *Benef Microbes* 2020;11:33-46.
150. 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 odontologica Scandinavica* 2009;67:19-24.
151. Teughels W, Van Essche M, Sliepen I, Quirynen M. Probiotics and oral healthcare. *Periodontology 2000* 2008;48:111-147.
152. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)* 2019;10:S49-s66.
153. He M, Shi B. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell & Bioscience* 2017;7:54.
154. Miglioranza Scavuzzi B, Miglioranza LH, Henrique FC, et al. The role of probiotics on each component of the metabolic syndrome and other cardiovascular risks. *Expert Opin Ther Targets* 2015;19:1127-1138.
155. !!! INVALID CITATION !!!
156. Messori MR, Pereira LJ, Foureaux R, et al. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Archives of oral biology* 2016;66:108-119.
157. Bagarolli RA, Tobar N, Oliveira AG, et al. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. *The Journal of nutritional biochemistry* 2017;50:16-25.
158. Tomosada Y, Villena J, Murata K, et al. Immunoregulatory effect of bifidobacteria strains in porcine intestinal epithelial cells through modulation of ubiquitin-editing enzyme A20 expression. *PloS one* 2013;8:e59259.
159. Karimi G, Jamaluddin R, Mohtarrudin N, Ahmad Z, Khazaai H, Parvaneh M. Single-species versus dual-species probiotic supplementation as an emerging therapeutic strategy for obesity. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 2017;27:910-918.
160. Le TK, Hosaka T, Nguyen TT, et al. *Bifidobacterium* species lower serum glucose, increase expressions of insulin signaling proteins, and improve adipokine profile in diabetic mice. *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 2015;36:63-70.
161. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clinical oral investigations* 2016;20:1203-1216.
162. Kaplan JM, Nowell M, Lahni P, O'Connor MP, Hake PW, Zingarelli B. Short-term high fat feeding increases organ injury and mortality after polymicrobial sepsis. *Obesity (Silver Spring, Md)* 2012;20:1995-2002.
163. Audrito V, Messina VG, Deaglio S. NAMPT and NAPRT: Two Metabolic Enzymes With Key Roles in Inflammation. *Frontiers in Oncology* 2020;10.
164. Laight DW, Kengatharan KM, Gopaul NK, Anggård EE, Carrier MJ. Investigation of oxidant stress and vasodepression to glyceryl trinitrate in the obese Zucker rat in vivo. *British journal of pharmacology* 1998;125:895-901.
165. Zhang M, Deng Q, Wang L, et al. Prevalence of dyslipidemia and achievement of low-density lipoprotein cholesterol targets in Chinese adults: A nationally representative survey of 163,641 adults. *International journal of cardiology* 2018;260:196-203.
166. Deeb A, Attia S, Mahmoud S, Elhaj G, Elfatih A. Dyslipidemia and Fatty Liver Disease in Overweight and Obese Children. *Journal of obesity* 2018;2018:8626818.
167. Nepomuceno R, Pigossi SC, Finoti LS, et al. Serum lipid levels in patients with periodontal disease: A meta-analysis and meta-regression. 2017;44:1192-1207.

168. Choi YH, Kosaka T, Ojima M, et al. Relationship between the burden of major periodontal bacteria and serum lipid profile in a cross-sectional Japanese study. *BMC Oral Health* 2018;18:77.
169. Chen S, Lin G, You X, et al. Hyperlipidemia causes changes in inflammatory responses to periodontal pathogen challenge: implications in acute and chronic infections. *Arch Oral Biol* 2014;59:1075-1084.
170. Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. HDL in infectious diseases and sepsis. *Handb Exp Pharmacol* 2015;224:483-508.
171. Norata GD, Pirillo A, Ammirati E, Catapano AL. Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis* 2012;220:11-21.
172. Asemi Z, Zare Z, Shakeri H, Sabihi SS, Esmailzadeh A. Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Annals of nutrition & metabolism* 2013;63:1-9.
173. Kim JH, Lee DE, Choi SH, Cha JH, Bak EJ, Yoo YJ. Diabetic characteristics and alveolar bone loss in streptozotocin- and streptozotocin-nicotinamide-treated rats with periodontitis. *J Periodontol Res* 2014;49:792-800.
174. Graves DT, Ding Z, Yang Y. The impact of diabetes on periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2020;82:214-224.
175. Wang Y, George SP, Roy S, Pham E, Esmaeilniakooshkghazi A, Khurana S. Both the anti- and pro-apoptotic functions of villin regulate cell turnover and intestinal homeostasis. *Scientific reports* 2016;6:35491.
176. Kiesslich R, Duckworth CA, Moussata D, et al. Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. *Gut* 2012;61:1146-1153.
177. Fiorese IFC, Gomes JC, Dos Santos BCC, et al. Effects of the Association of Periodontitis and Type 1 Diabetes Mellitus Induced on Periodontal Tissues and the Duodenal Mucosa of Wistar Rats. 2021;44:704-713.
178. Messori MR, Oliveira LF, Foureaux RC, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *Journal of periodontology* 2013;84:1818-1826.
179. Lourenço TGB, Spencer SJ, Alm EJ, Colombo APV. Defining the gut microbiota in individuals with periodontal diseases: an exploratory study. *J Oral Microbiol* 2018;10:1487741-1487741.
180. Alakhali MS, Al-Maweri SA, Al-Shamiri HM, Al-Haddad K, Halboub E. The potential association between periodontitis and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Clinical oral investigations* 2018;22:2965-2974.
181. Vasconcelos DF, Pereira da Silva FR, Pinto ME, et al. Decrease of Pericytes is Associated With Liver Disease Caused by Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *J Periodontol* 2017;88:e49-e57.
182. Kim OS, Shin MH, Kweon SS, et al. The severity of periodontitis and metabolic syndrome in Korean population: The Dong-gu study. *J Periodontol Res* 2018;53:362-368.
183. Andrade RSB, França LFC, Pessoa LDS, et al. High-fat diet aggravates the liver disease caused by periodontitis in rats. *J Periodontol* 2019;90:1023-1031.
184. Mahmoodpoor F, Rahbar Saadat Y, Barzegari A, Ardalan M, Zununi Vahed S. The impact of gut microbiota on kidney function and pathogenesis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2017;93:412-419.
185. Sharma P, Dietrich T, Ferro CJ, Cockwell P, Chapple IL. Association between periodontitis and mortality in stages 3-5 chronic kidney disease: NHANES III and linked mortality study. *J Clin Periodontol* 2016;43:104-113.
186. Lioudaki E, Florentin M, Ganotakis ES, Mikhailidis DP. Microalbuminuria: a neglected cardiovascular risk factor in non-diabetic individuals? *Current pharmaceutical design* 2013;19:4964-4980.

187. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney international* 2013;83:308-315.
188. Fisher MA, Taylor GW, West BT, McCarthy ET. Bidirectional relationship between chronic kidney and periodontal disease: a study using structural equation modeling. *Kidney international* 2011;79:347-355.
189. Saremi A, Nelson RG, Tulloch-Reid M, et al. Periodontal disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:27-32.
190. Iwasaki M, Taylor GW, Nesse W, Vissink A, Yoshihara A, Miyazaki H. Periodontal disease and decreased kidney function in Japanese elderly. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2012;59:202-209.
191. Lewis B, Mukewar S, Lopez R, Brzezinski A, Hall P, Shen B. Frequency and risk factors of renal insufficiency in inflammatory bowel disease inpatients. *Inflammatory bowel diseases* 2013;19:1846-1851.
192. Casén C, Vebø HC, Sekelja M, et al. Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2015;42:71-83.
193. Rabb H, Pluznick J, Noel S. The Microbiome and Acute Kidney Injury. *Nephron* 2018;140:120-123.
194. Jakobsson HE, Rodríguez-Piñeiro AM, Schütte A, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO reports* 2015;16:164-177.
195. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Frontiers in immunology* 2015;6:639.
196. Shi K, Wang F, Jiang H, et al. Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients. *Digestive diseases and sciences* 2014;59:2109-2117.
197. Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta pharmacologica Sinica* 2012;33:173-181.
198. Yamashita M, Okubo H. Alteration of gut microbiota by a Westernized lifestyle and its correlation with insulin resistance in non-diabetic Japanese men. 2019;10:1463-1470.
199. Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Mohd Yusof MR, Haji Suhaimi F. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed research international* 2014;2014:263897.
200. Ishikawa M, Yoshida K, Okamura H, et al. Oral Porphyromonas gingivalis translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Biochimica et biophysica acta* 2013;1832:2035-2043.
201. Kimizuka R, Kato T, Ishihara K, Okuda K. Mixed infections with Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola cause excessive inflammatory responses in a mouse pneumonia model compared with mono-infections. *Microbes Infect* 2003;5:1357-1362.
202. Huang Y, Zeng J, Chen G, Xie X, Guo W, Tian W. Periodontitis contributes to adipose tissue inflammation through the NF- κ B, JNK and ERK pathways to promote insulin resistance in a rat model. *Microbes and Infection* 2016;18:804-812.
203. Loman BR, Hernández-Saavedra D, An R, Rector RS. Prebiotic and probiotic treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition reviews* 2018;76:822-839.
204. Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, et al. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol* 2010;81:520-526.
205. Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, 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:e0134234.

206. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Scientific reports* 2014;4:4828.
207. Yoo SR, Kim YJ, Park DY, et al. Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring, Md)* 2013;21:2571-2578.
208. Miyoshi M, Ogawa A, Higurashi S, Kadooka Y. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice. *Eur J Nutr* 2014;53:599-606.
209. He J, Zhang F, Han Y. Effect of probiotics on lipid profiles and blood pressure in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis of RCTs. *Medicine* 2017;96:e9166.
210. Guo Z, Liu XM, Zhang QX, et al. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 2011;21:844-850.
211. Bernini LJ, Simao AN, Alfieri DF, et al. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 2016;32:716-719.
212. Wang J, Tang H, Zhang C, et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *The ISME journal* 2015;9:1-15.
213. Mofidi F, Poustchi H, Yari Z, et al. Synbiotic supplementation in lean patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot, randomised, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *The British journal of nutrition* 2017;117:662-668.
214. Dos Santos Carvalho J, Cardoso Guimarães Vasconcelos AC, Herlany Pereira Alves E, et al. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. 2017;52:883-892.
215. Vives-Soler A, Chimenos-Küstner E. Effect of probiotics as a complement to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis: a systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2020;25:e161-e167.
216. Dai Y, Quan J, Xiong L, Luo Y, Yi B. Probiotics improve renal function, glucose, lipids, inflammation and oxidative stress in diabetic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Renal failure* 2022;44:862-880.
217. Oliveira LFF, da Silva GA, Silva PHF, et al. Comparison Between Different Delivery Vehicles for the Probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 on Experimental Periodontitis in Rats. 2022;14:313-325.
218. de Oliveira AM, Lourenço TGB. Impact of systemic probiotics as adjuncts to subgingival instrumentation on the oral-gut microbiota associated with periodontitis: A randomized controlled clinical trial. 2021.
219. Furuhashi M. Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2019;26:216-232.
220. Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights Cardiology* 2014;8:23-33.
221. Hassan B, Baroukh B, Llorens A, et al. NAMPT expression in osteoblasts controls osteoclast recruitment in alveolar bone remodeling. 2018;233:7402-7414.
222. Cao X, Huo P, Li W, Li P, He L, Meng H. Interactions among moderate/severe periodontitis, ADIPOQ-rs1501299, and LEPR-rs1137100 polymorphisms on the risk of type 2 diabetes in a Chinese population. *Archives of oral biology* 2019;103:26-32.
223. Doğan B, Kemer Doğan ES. Synergistic Effect of Omega-3 and Probiotic Supplementation on Preventing Ligature-Induced Periodontitis. 2022;14:114-120.

224. Shimabukuro N, Cataruci ACS, Ishikawa KH, et al. Bifidobacterium Strains Present Distinct Effects on the Control of Alveolar Bone Loss in a Periodontitis Experimental Model. *Frontiers in pharmacology* 2021;12:713595.
225. Kim JW, Jung BH. Effect of Weissella cibaria on the reduction of periodontal tissue destruction in mice. 2020;91:1367-1374.
226. Kobyliak N, Abenavoli L, Falalyeyeva T, et al. Beneficial effects of probiotic combination with omega-3 fatty acids in NAFLD: a randomized clinical study. *Minerva medica* 2018;109:418-428.
227. Kobyliak N, Abenavoli L, Mykhalchyshyn G, et al. A Multi-strain Probiotic Reduces the Fatty Liver Index, Cytokines and Aminotransferase levels in NAFLD Patients: Evidence from a Randomized Clinical Trial. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD* 2018;27:41-49.
228. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *The American journal of clinical nutrition* 2001;73:444s-450s.
229. Rocha-Ramírez LM, Pérez-Solano RA. Probiotic Lactobacillus Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. 2017;2017:4607491.
230. Rocha-Ramírez LM, Hernández-Chiñas U. Probiotic Properties and Immunomodulatory Activity of Lactobacillus Strains Isolated from Dairy Products. 2021;9.
231. Vizoso Pinto MG, Rodríguez Gómez M, Seifert S, Watzl B, Holzapfel WH, Franz CM. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *International journal of food microbiology* 2009;133:86-93.
232. Ondee T, Pongpirul K. Lactiplantibacillus plantarum dfa1 Outperforms Enterococcus faecium dfa1 on Anti-Obesity in High Fat-Induced Obesity Mice Possibly through the Differences in Gut Dysbiosis Attenuation, despite the Similar Anti-Inflammatory Properties. 2021;14.
233. Musazadeh V, Zarezadeh M, Ghalichi F, et al. Anti-obesity properties of probiotics; a considerable medical nutrition intervention: Findings from an umbrella meta-analysis. *European journal of pharmacology* 2022;928:175069.
234. Zhang Z, Zhou Z, Li Y, Zhou L, Ding Q, Xu L. Isolated exopolysaccharides from Lactobacillus rhamnosus GG alleviated adipogenesis mediated by TLR2 in mice. *Scientific reports* 2016;6:36083.
235. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes & metabolism* 2004;30:294-309.
236. Girard J, Perdereau D, Fougère F, Prip-Buus C, Ferré P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1994;8:36-42.
237. Salans LB, Cushman SW, Weismann RE. Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *The Journal of clinical investigation* 1973;52:929-941.
238. Schwiertz A, Taras D, Schäfer K, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring, Md)* 2010;18:190-195.
239. Wong J, Piceno YM, DeSantis TZ, Pahl M, Andersen GL, Vaziri ND. Expansion of Urease- and Uricase-Containing, Indole- and p-Cresol-Forming and Contraction of Short-Chain Fatty Acid-Producing Intestinal Microbiota in ESRD. *American Journal of Nephrology* 2014;39:230-237.
240. Takemura N, Okubo T, Sonoyama K. Lactobacillus plantarum strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010;235:849-856.
241. Lin HV, Frassetto A, Kowalik EJ, Jr., et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS one* 2012;7:e35240.

242. Arnlöv J, Evans JC, Meigs JB, et al. Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005;112:969-975.
243. Zhang A, Li M, Qiu J, et al. The relationship between urinary albumin to creatinine ratio and all-cause mortality in the elderly population in the Chinese community: a 10-year follow-up study. *BMC nephrology* 2022;23:16.
244. American Diabetes A. Standards of Medical Care in Diabetes-2016 Abridged for Primary Care Providers. *Clin Diabetes* 2016;34:3-21.
245. Yacoub R, Kaji D, Patel SN, et al. Association between probiotic and yogurt consumption and kidney disease: insights from NHANES. *Nutrition journal* 2016;15:10.
246. Poveda J, Sanchez-Niño MD, Glorieux G, et al. p-cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2014;29:56-64.
247. Bravo Javier A, Forsythe P, Chew Marianne V, et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:16050-16055.
248. Huang Y, Liao Y, Luo B, Li L, Zhang Y, Yan F. Non-surgical Periodontal Treatment Restored the Gut Microbiota and Intestinal Barrier in Apolipoprotein E(-/-) Mice With Periodontitis. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2020;10:498.
249. Wang B, Gong L, Zhou Y, et al. Probiotic Paenibacillus polymyxa 10 and Lactobacillus plantarum 16 enhance growth performance of broilers by improving the intestinal health. *Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)* 2021;7:829-840.
250. Mao X, Gu C, Hu H, et al. Dietary Lactobacillus rhamnosus GG Supplementation Improves the Mucosal Barrier Function in the Intestine of Weaned Piglets Challenged by Porcine Rotavirus. *PLoS one* 2016;11:e0146312.
251. Nwachukwu CU, Aliyu KI, Ewuola EO. Growth indices, intestinal histomorphology, and blood profile of rabbits fed probiotics- and prebiotics-supplemented diets. 2021;5:txab096.
252. Mocanu V, Zhang Z, Deehan EC, et al. Fecal microbial transplantation and fiber supplementation in patients with severe obesity and metabolic syndrome: a randomized double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Nature Medicine* 2021;27:1272-1279.
253. Chen X, Devaraj S. Gut Microbiome in Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes. *Curr Diab Rep* 2018;18:129.
254. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews Immunology* 2015;15:30-44.
255. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS one* 2010;5:e9085.
256. Galdeano CM, Perdigon G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal of applied microbiology* 2004;97:673-681.
257. Lahtinen SJ, Forssten S, Aakko J, et al. Probiotic cheese containing Lactobacillus rhamnosus HN001 and Lactobacillus acidophilus NCFM® modifies subpopulations of fecal lactobacilli and Clostridium difficile in the elderly. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 2012;34:133-143.
258. McNulty NP, Yatsunenko T, Hsiao A, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Science translational medicine* 2011;3:106ra106.
259. Sánchez-Muniz FJ, Macho-González A. The Nutritional Components of Beer and Its Relationship with Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. 2019;11.

260. Gordon DM. The potential of bacteriocin-producing probiotics and associated caveats. In. vol. 4, 2009:941-943.
261. Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied microbiology and biotechnology* 2008;81:591-606.
262. Miglioranza Scavuzzi B, Miglioranza LHdS, Henrique FC, et al. The role of probiotics on each component of the metabolic syndrome and other cardiovascular risks. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2015;19:1127-1138.
263. Sánchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular nutrition & food research* 2017;61.
264. Akbari V, Hendijani F. Effects of probiotic supplementation in patients with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Nutrition reviews* 2016;74:774-784.
265. Hu YM, Zhou F, Yuan Y, Xu YC. Effects of probiotics supplement in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized trials. *Medicina clinica* 2017;148:362-370.
266. Liang T, Wu L, Xi Y, et al. Probiotics supplementation improves hyperglycemia, hypercholesterolemia, and hypertension in type 2 diabetes mellitus: An update of meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2021;61:1670-1688.
267. Ruan Y, Sun J, He J, Chen F, Chen R, Chen H. Effect of Probiotics on Glycemic Control: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *PloS one* 2015;10:e0132121.
268. Samah S, Ramasamy K, Lim SM, Neoh CF. Probiotics for the management of type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes research and clinical practice* 2016;118:172-182.
269. Khalesi S, Sun J, Buys N, Jayasinghe R. Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension* 2014;64:897-903.
270. Michels N, Zouiouich S, Vanderbauwhede B, Vanacker J, Indave Ruiz BI, Huybrechts I. Human microbiome and metabolic health: An overview of systematic reviews. *Obesity Reviews* 2022;23:e13409.

8. *ANEXO*

8.1 Certificado de aprovação emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

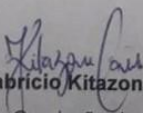
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “Efeitos da terapia com *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 na periodontite experimental associada à Síndrome Metabólica. Estudo microtomográfico, histomorfométrico, imunoenzimático e genético em ratos”, Protocolo nº 2017.1.886.58.9, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Michel Reis Messora – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 18/04/2018, com alterações em 15/06/2018.

Vigência do Projeto	18/04/2018 a 18/04/2020
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Sprague-Dawley
Nº de animais	72
Peso/Idade	3 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 15 de junho de 2018.


Prof. Dr. Fabricio Kitazono de Carvalho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais