



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

**Efeitos da terapia probiótica com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis***

**HN019 em ratas prenhes com periodontite experimental: estudo  
microbiológico, histomorfométrico, histopatológico, imunológico,  
microtomográfico e bioquímico**

**ÁTILA VINÍCIUS VITOR NOBRE**

**PG.PERIO**  
FCRP-USP

**RIBEIRÃO PRETO, SP**

**2023**

**ÁTILA VINÍCIUS VITOR NOBRE**

**Efeitos da terapia probiótica com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis***

**HN019 em ratas prenhes com periodontite experimental: estudo  
microbiológico, histomorfométrico, histopatológico, imunológico,  
microtomográfico e bioquímico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Odontologia (Periodontia) da Faculdade de  
Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade  
de São Paulo, como requisito para a obtenção de  
título de Doutor em Odontologia (Periodontia).

Área de concentração: Periodontia

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador

**RIBEIRÃO PRETO, SP**

**2023**

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

### **Catálogo da Publicação**

**Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto**

**Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**

Nobre, Átila Vinícius Vitor

Efeitos da terapia probiótica com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em ratas prenhes com periodontite experimental: estudo microbiológico, histomorfométrico, histopatológico, imunológico, microtomográfico e bioquímico. Ribeirão Preto - São Paulo, 2023.

161 p.: il; 30 cm

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: Salvador, Sérgio Luiz de Souza

1. Periodontite. 2. Gravidez. 3. Probióticos. 4. *Bifidobacterium*.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

NOBRE, A. V. V. **Efeitos da terapia probiótica com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em ratas prenhes com periodontite experimental: estudo microbiológico, histomorfométrico, histopatológico, imunológico, microtomográfico e bioquímico.** 2023. 161f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção de título de Doutor em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2023

### Banca Examinadora

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_



Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

---

*Dedicatoria*

## DEDICATÓRIA

### *À minha família,*

Dedico este trabalho à minha família, meu pai **Valderi**, minha mãe **Tereza** e meu irmão **Ítalo**, por serem o meu suporte e alicerce, sempre me apoiando em todas as minhas decisões e vibrando comigo em todas as conquistas. A finalização deste trabalho não é só uma grande conquista, ela envolve muita luta, determinação, abdicção, trabalho, foco e amor. Amor que eu recebi e recebo da minha família, amor que eu observo no trabalho deles, no que eles produzem ou fazem e nas pessoas que eles tocam, amor este que também pude nutrir pela docência e pela pesquisa e aplicar na minha rotina, no meu trabalho, nos meus alunos, na Odontologia. Este trabalho é dedicado a vocês, que me ensinam nas pequenas coisas, onde realmente está o amor.

---

Agradecimentos

## AGRADECIMENTOS

### *A Deus,*

Por me manter firme e forte na fé. Por não me deixar sucumbir diante dos obstáculos. Por não soltar a minha mão nos momentos difíceis, em que a minha força se esvaiu e eu cheguei a me questionar se conseguiria. Por ser meu guia em todos os momentos.

### *À minha família,*

Meu maior porto seguro. Agradeço ao meu pai, **Valderi**, minha mãe **Tereza**, e meu irmão **Ítalo**, por todo apoio, pelas demonstrações de amor e carinho, pela força nos momentos difíceis. É tudo por vocês!

### *Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador,*

Eu não poderia ter tido tanta sorte em ter o senhor como orientador nesta jornada. É Deus, sempre perfeito em tudo que faz. Quem conhece o professor **Sérgio**, sabe da pessoa educada, compreensiva e humana que ele é. Nesses anos, nós vivemos vários momentos juntos. O laboratório de Bacteriologia foi minha segunda casa durante anos e, junto com a Marina, nossa convivência era maravilhosa. Eu me sentia em casa, entre amigos e família, mesmo estando tão longe dos meus. Com o professor Sérgio, eu aprendi muito mais do que Microbiologia, aprendi sobre vida, sobre lidar com pessoas e situações que lhe desafiavam. Eu aprendi várias técnicas microbiológicas, mas aprendi muito mais sobre postura, carreira, decisões importantes, docência, e estes ensinamentos, eu irei levar por toda vida. Uma vez eu ouvi “todo orientando, ao final, parece um pouco com seu orientador”, e eu tenho orgulho de ter herdado seus ensinamentos. Obrigado por tudo que o senhor fez e faz por mim!

### *À Marina Constante Gabriel Del Arco Mastrange,*

**Marina** é um anjo que Deus colocou na minha vida. Quem passa pelo laboratório do prof. Sérgio, e conhece a Marina, é unânime: que pessoa maravilhosa! Além de me ajudar em todos os processos da minha pesquisa de Doutorado, de me ensinar tudo sobre o laboratório,

de participar ativamente da minha pesquisa, a Marina se tornou uma amiga que eu quero levar para a vida. Foram anos de convivência, de cafês, de conversas, em que eu pude conhecer além da excelente técnica em Microbiologia, uma boa filha, boa tia, boa esposa, grande amiga, uma pessoa do coração gigante. Sorte de quem te tem por perto, Marina. Obrigado por tudo!

### *À profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta,*

Eu fui o primeiro orientado de Mestrado da profa. **Carol** no programa de Periodontia da FORP/USP. Essa experiência foi única na minha vida, pois com ela, a minha curva de aprendizado, em todos os aspectos da vida, cresceu exponencialmente. Ter trabalhado com a profa. Carol me fez ser quem eu sou hoje, pois eu pude extrair dela, as melhores características: ser humano, no melhor sentido da palavra, ser dedicado em tudo que faz, ser criterioso, ser firme e honesto e, principalmente, amar o que faz. Esta última é o que eu mais vivi enquanto aluno da profa Carol, amor ao que faz. Amor à docência. Amor ao paciente. Amor na entrega. Ela se entrega em tudo que se propõe. Gratidão a Deus por ter percebido tudo isso, por ter cruzado nossos caminhos e por todos os ensinamentos que a senhora me proporciona até hoje. Muito obrigado por tudo!

### *Aos professores do programa de Pós-graduação em Periodontia da FORP/USP,*

**Prof. Dr. Michel Messorá, Profa. Dra Flávia Furlaneto, Prof. Dr. Sérgio Scombatti, Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr., Prof. Mário Taba Jr e Profa. Dra. Daniela Palioto**, minhas maiores referências em Periodontia. Agradeço a vocês por todos os ensinamentos, por todas as oportunidades, pela boa convivência, por me mostrarem a Periodontia de excelência que eu saí do Ceará para buscar, e superou todas as minhas expectativas. Além de professores, eu os considero amigos. Obrigado por tudo!

*Aos funcionários e técnicos de laboratório do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Periodontia da FORP/USP,*

**Isabel Gobbo, Dulce Negretti, Daniela, Dra. Rose e Milla Sprone**, muito obrigado por tornarem a vida de nós, alunos, mais fácil neste processo. Obrigado pela ajuda, pela compreensão, pela boa convivência. Me lembrarei sempre de vocês com um sorriso no rosto.

*Aos funcionários e técnicos de laboratório do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP,*

**Sandra, Lúcia e Emerson**, muito obrigado por toda ajuda ao longo desta trajetória.

*À Daniela Steter, da clínica de pós-graduação,*

**Dani**, não tenho palavras para te agradecer por tudo que você já fez por mim. Obrigado pela ajuda, pelos bons momentos que vivemos, por todo suporte que você dá aos alunos. Sou grato a tudo que você me proporcionou neste processo.

*Aos colegas de pós-graduação (Mestrado e Doutorado) em Periodontia da FORP/USP,*

**Pedro Henrique Félix Silva, Cristhiam de Jesus Hernandez Martinez, Renata Silva Cardoso de Campos, Yara Loyanne Levi, Yasmin Simões Dal Acqua, Uislen Cadore, Natacha Malu Miranda da Costa, Valessa Florindo, Ricardo Denardi, Diana Estefanía Ramos Peña, Rafaella Scannavino, Marília Bianchini Reis, Kleber Tanaka Suzuki, Luiz Fernando de Oliveira e Giselle Aparecida Silva (in memorian)**. Agradeço a todos vocês por todos os bons momentos juntos, pela parceria nas atividades clínica e de pesquisa e por toda a amizade nesses anos.

*Aos meus amigos Pedro Félix, Renata Cardoso e Cristhiam de Jesus,*

Os anos passaram, o Mestrado passou, mas eu volto para agradecer novamente a vocês três por tudo que construímos, em especial, nossa amizade. Tomamos rumos diferentes, não nos falamos todos os dias, mas o carinho, a admiração, o respeito e a amizade por vocês permanecem vivos comigo. Obrigado por tudo que vocês fizeram por mim desde que eu cheguei em Ribeirão Preto, e continuam fazendo até hoje. Contem comigo para qualquer coisa nessa vida. Amo vocês!

*À profa. Dra. Raquel Gerlach e toda a equipe do Laboratório de Proteínas do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP/USP,*

Um exemplo de ser humano que eu tive o prazer de trabalhar e aprender. Uma pessoa de um coração gigante. Sem dúvidas, uma inspiração para mim na docência. Obrigado por tudo, profa **Raquel** e toda a equipe do laboratório de proteínas da FORP/USP: **Pati, Renê, Karina e Júnia.**

*Ao prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos e equipe do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Farmacologia da FMRP/USP,*

Gratidão especial ao prof. **Tanus**, a doutoranda **Graziele Ferreira** e a mestranda **Indiara Santana** por todo suporte nas análises laboratoriais da minha tese de Doutorado. Foram dias intensos de experimentos no laboratório de Farmacologia, onde eu fui muito bem recebido, respeitado e auxiliado. Muito obrigado, pessoal!



*À profa. Dra. Elen Rizzi e equipe do Laboratório de Biotecnologia da UNAERP,*

Meu agradecimento por toda ajuda nas análises de zimografia da minha tese, especialmente à doutoranda **Laura Molezini** e **profa. Dra. Elen Rizzi**. Foram dias intensos de experimentos, onde eu fui muito bem recebido pela equipe. Gratidão!

*À profa. Dra. Luciene Figueiredo e equipe do Laboratório de Microbiologia da UNG,*

Muito obrigado por abrir as portas do laboratório para mim, **profa. Luciene** e **Izilvânia**. A contribuição de vocês neste processo foi grandiosa. Eu e o prof. Sérgio somos muito gratos pela parceria.

*À profa. Dra. Therezila Machado Coimbra e equipe do Laboratório de Função Renal do Departamento de Fisiologia da FMRP/USP,*

Meu muito obrigado a **profa. Therezila**, a **Cleo** e **Dra. Heloísa Francescato** pela ajuda valiosa nas análises bioquímicas da minha tese. A contribuição de vocês foi crucial para esta pesquisa e para o meu crescimento profissional.

*À profa. Dra. Janaína Serra Azul Evangelista da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Ceará,*

Meu muito obrigado a **profa. Janaína** pela ajuda valiosa nas análises histopatológicas da minha tese. Sua contribuição foi essencial para esta pesquisa e para o meu crescimento profissional.

*À toda a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto –  
Universidade de São Paulo,*

Por ter se tornado a minha segunda casa, onde eu obtive um crescimento imensurável de grande importância para a minha vida profissional.

*À Coordenação de Apoio à Pesquisa (CAPES),*

Pela concessão de bolsas de Doutorado, essenciais para nossa estadia e dedicação exclusiva.

“A caminhada e sua construção diária são muito mais importantes que alcançar seu objetivo final. Sem suas lutas, seu final é só um final. Sem suas dores, conquistar seus sonhos é só mais uma conquista. O que torna seu final importante é o que você fez e viveu para chegar até ele. O Senhor cumprirá o que prometeu, se você confia nele de todo o seu coração, só descanse. Faça sempre a sua parte, mas nunca esqueça que quem realmente faz a obra se tornar completa é Ele. Nos nossos momentos mais fracos, nunca esqueçamos que o próprio Deus é a nossa fortaleza e é para Ele que devemos olhar”

**Autor desconhecido**

---

Resumo

## RESUMO

NOBRE, A.V.V. **Efeitos da terapia probiótica com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em ratas prenhes com periodontite experimental: estudo microbiológico, histomorfométrico, histopatológico, imunológico, microtomográfico e bioquímico.** 2023. 161 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A relação entre periodontite (PD) e disbiose polimicrobiana nos desfechos adversos da gravidez vem sendo investigada na literatura e cada vez mais se tem buscado alternativas ecológicas para o tratamento de doenças periodontais (DP), devido seu reconhecido efeito sistêmico. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da PD na gravidez e se a administração sistêmica do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) promoveu efeitos benéficos na PD experimental em ratas prenhes. Foram utilizadas 48 ratas e divididas nos seguintes grupos: C (controle), PROB (probiótico), DP (periodontite induzida por ligadura + gavagem de *Porphyromonas gingivalis* diariamente por 15 dias) e DPxPROB (periodontite + probiótico). A suplementação com *B. lactis* iniciou-se 3 semanas antes do protocolo experimental. O dia 0 foi estabelecido pela confirmação da prenhez. A PD foi induzida no 4º dia gestacional e ao 19º dia, a pressão arterial (PA) invasiva foi aferida e os animais, eutanasiados. Foram coletados fetos, placentas, ligaduras, biofilme oral, urina, soro, hemi-mandíbulas, intestino e rins, para avaliação dos seguintes parâmetros: 1) pesos materno, dos fetos e das placentas; 2) microbiota oral (*checkerboard DNA-DNA hybridization*); 3) proteinúria e creatinina na urina (análise bioquímica); 4) concentração de nitrato/nitrito plasmático (análise bioquímica); 5) expressão de metaloproteinases-2 e -9 da matriz na placenta e no soro (zimografia); 6) microarquitetura e volume ósseo (microtomografia computadorizada por transmissão de raios X); 7) níveis de inserção conjuntiva (NIC) em tecidos periodontais, altura de vilosidades (AV) e profundidade de criptas (PC) em tecidos intestinais (duodeno e jejuno), espaço da cápsula de Bowman (CP), circunferência da CP, circunferência glomerular (CG) e diâmetro glomerular (DG) em tecidos renais (análise histomorfométrica). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ( $p < 0,05$ ). Foi observado que a PD causou malefícios na prenhez pela expressão aumentada de proteinúria, creatinina e razão proteína/creatinina na urina, aumento de porosidade óssea, separação entre trabéculas, porcentagem de área sem osso em área de bifurcação (AB), NIC interproximal,

espaço da CB, circunferência da CP, EG e DG, bem como menor volume ósseo em AB e espessura e número de trabéculas ósseas, comparados ao grupo C ( $p<0,05$ ). A administração sistêmica de *B. lactis* HN019 mostrou valores intermediários no volume ósseo em AB, porosidade óssea, espessura de trabéculas, NIC e todos os parâmetros renais analisados em comparação ao grupo C ( $p<0,05$ ). Dentro das limitações deste estudo, podemos concluir que a disbiose da microbiota oral e intestinal promovida pela PD gera efeitos negativos locais e sistêmicos na gravidez e que o uso sistêmico de *B. lactis* parece promover um efeito protetor na perda óssea alveolar e integridade dos tecidos renais.

**Palavras-chave:** Periodontite; Gravidez; Probióticos; *Bifidobacterium*

---

Abstract

## ABSTRACT

NOBRE, A.V.V. **Effects of probiotic therapy with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in pregnant rats with experimental periodontitis: microbiological, histomorphometric, histopatological, immunological, microtomographic and biochemical study.** 2023. 161 p. Thesis (Doctor's Degree) – Faculty of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2023.

The relationship between periodontitis (PD) and polymicrobial dysbiosis in adverse pregnancy outcomes has been investigated in the literature and ecological alternatives have been increasingly sought for the treatment of periodontal diseases, due to their recognized systemic effect. The aims of this study were to evaluate the effects of PD in pregnancy and whether systemic administration of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) promoted beneficial effects on experimental PD in pregnant rats. 48 rats were used and divided into the following groups: C (control), PROB (probiotic), PD (periodontitis induced by silk ligature + oral gavage of *Porphyromonas gingivalis* daily for 15 days) and PD-PROB (PD + PROB). Supplementation with *B. lactis* started 3 weeks before the experimental protocol. Day 0 was established by confirmation of pregnancy. PD was induced on the 4th day of gestation and on the 19th day, invasive blood pressure (BP) was measured, and the animals euthanized. Pups, placentas, ligatures, oral biofilm, urine, serum, hemi-mandibles, intestine and kidneys were collected for evaluation of the following parameters: 1) maternal, fetal and placental weights; 2) oral microbiota (checkerboard DNA-DNA hybridization); 3) proteinuria and creatinine in the urine (biochemical analysis); 4) plasma nitrate/nitrite concentration (biochemical analysis); 5) expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in placenta and serum (zymography); 6) microarchitecture and bone volume (computed microtomography by X-ray transmission); 7) clinical attachment level (CAL) in periodontal tissues, villus height (VH) and crypt depth (CD) in intestinal tissues (duodenum and jejunum), Bowman's capsule space (BC), BC circumference, glomerular circumference (GC) and glomerular diameter (GD) in renal tissues (histomorphometric analysis). The data obtained were submitted to statistical analysis ( $p < 0.05$ ). It was observed that PD caused harm in pregnancy by the increased expression of proteinuria, creatinine and protein/creatinine ratio in the urine, increased bone porosity, separation between trabeculae, percentage of boneless area in the bifurcation area (BA), interproximal CAL, BC space, BC circumference, GC and GD, as well as lower bone volume in BA and thickness and number of bone trabeculae, compared to group C ( $p < 0.05$ ).



Systemic administration of *B. lactis* HN019 showed intermediate values in bone volume in BA, bone porosity, trabecular thickness, CAL, and all analyzed renal parameters compared to group C ( $p < 0.05$ ). Within the limitations of this study, we can conclude that the dysbiosis of the oral and intestinal microbiota promoted by PD generates local and systemic negative effects in pregnancy and that the systemic use of *B. lactis* seems to promote a protective effect on alveolar bone loss and integrity of renal tissues.

**Keywords:** Periodontitis; Pregnancy; Probiotics; *Bifidobacterium*

---

Listas

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos.....	51
<b>Tabela 2</b> – Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme.....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – (A) Animal posicionado na mesa operatória para colocação das ligaduras; (B) Fio de seda em posição subgingival para indução da periodontite no primeiro molar inferior.....	46
<b>Figura 2</b> – Linha do tempo do protocolo experimental.....	48
<b>Figura 3</b> – Peso materno antes da eutanásia em gramas. Letras diferentes significam diferença estatística.....	62
<b>Figura 4</b> – Peso dos fetos por grupo em gramas (g). Letras diferentes significam diferença estatística.....	63
<b>Figura 5</b> – Quantidade de fetos/mãe em números (n). Letras diferentes significam diferença estatística.....	64
<b>Figura 6</b> – Comparativo de tamanho entre os fetos.....	65
<b>Figura 7</b> – Peso das placentas em gramas (g).....	66
<b>Figura 8</b> – Comparativo de tamanho entre as placentas.....	66
<b>Figura 9</b> – Proteinúria em mg/dL. Letras diferentes significam diferença estatística.....	67
<b>Figura 10</b> – Creatinina na urina em mg/dL. Letras diferentes significam diferença estatística.....	68
<b>Figura 11</b> – Relação proteinúria/creatinina na urina em mg/dL. Letras diferentes significam diferença estatística.....	69
<b>Figura 12</b> – PA sistólica por grupo em mmHg.....	69
<b>Figura 13</b> (A) – Nitrato no soro em $\mu\text{M}$ . Letras diferentes significam diferença estatística. (B) Nitrito no soro em $\mu\text{M}$ .....	70
<b>Figura 14</b> Expressão de MMP-2 na placenta – (A) Gel representativo de zimografia mostrando a atividade gelatinolítica da MMP-2 de diferentes pesos moleculares. (B) Expressão da MMP-2 de peso molecular 64 kDa na placenta. (C) Expressão da MMP-2 de peso molecular 72 kDa na placenta. (D) Expressão da MMP-2 de peso molecular 75 kDa na placenta. (E) Soma da expressão de todas as MMP-2 na placenta. MMP-2 = Metaloproteinase – 2; kDa = Kilo Dalton; PAD = Padrão. Letras diferentes significam diferença estatística.....	71
<b>Figura 15</b> Expressão de MMP-9 na placenta – (A) Gel representativo de zimografia mostrando a atividade gelatinolítica da MMP-9 de diferentes pesos moleculares. (B) Expressão da MMP-9 na placenta. MMP-9 = Metaloproteinase – 9; kDa = Kilo Dalton; PAD = Padrão. Letras diferentes significam diferença estatística.....	72

**Figura 16** Expressão de MMP-2 no soro – (A) Gel representativo de zimografia mostrando a atividade gelatinolítica da MMP-2 de diferentes pesos moleculares no soro. (B) Expressão da MMP-2 de peso molecular 72 kDa no soro. (C) Expressão da MMP-2 de peso molecular 75 kDa no soro. MMP-2 = Metaloproteinase – 2; kDa = Kilo Dalton; PAD = Padrão.....74

**Figura 17** – Médias da contagem total ( $\times 10^5$ ) de 40 espécies bacterianas presentes nos biofilmes nos animais dos grupos experimentais. (A) Grupo C; (B) Grupo PROB; (C) Grupo DP; (D) Grupo DPxPROB. \* significa diferença estatística quando comparado ao grupo C; # significa diferença estatística quando comparado ao grupo PROB;  $\Delta$  significa diferença estatística quando comparado ao grupo DP.....75

**Figura 18** – (A) Medianas de volume ósseo; (B) Porosidade óssea; (C) Espessura de trabéculas; (D) Número de trabéculas; (E) Separação entre trabéculas. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. BV/TV = volume ósseo em %; PoTot = porosidade óssea em %; Tb.Th = espessura de trabéculas; Tb.N = número de trabéculas; Tb.Sp = separação entre trabéculas.....77

**Figura 19** – Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas das ratas dos grupos C (A); PROB (B); DP (C); DPxPROB (D). Vista da superfície vestibular externa. Tamanho do *pixel* = 7,96  $\mu\text{m}$ .....78

**Figura 20** – Tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º molar inferior dos grupos C (A, B), PROB (C, D), DP (E, F) e DPxPROB (G, H). Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 10x (A, C, E, G); 20x: (B, D, F, H). TF = teto da furca; OA = osso alveolar; setas pretas = vasos sanguíneos; setas vermelhas = osteoclastos; setas brancas = osteoblastos; setas cinzas (B, D) = fibras colágenas seguindo orientação organizada; setas cinzas (H) = fibras colágenas interpostas entre o osso alveolar e o cimento radicular; \* (asterisco) = fibras colágenas desconexas com presença de edema intersticial.....80

**Figura 21** – Tecidos periodontais na região interproximal entre o 1º e 2º molares inferiores dos grupos C (A), PROB (B), DP (C) e DPxPROB (D). Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 20x. PMI = primeiro molar inferior; SMI = segundo molar inferior; seta preta = junção cimento-esmalte; seta branca = inserção conjuntiva.....81

**Figura 22** – Histometria dos tecidos periodontais de todos os grupos. (A) Área de bifurcação em  $\text{mm}^2$ ; (B) Nível de inserção conjuntiva entre o 1º e 2º molares inferiores entre os grupos DP

e DPxPROB. NIC = Nível de inserção clínica. Letras diferentes significam diferença estatística.....	82
<b>Figura 23</b> – Medianas de profundidade de criptas e altura de vilosidades do duodeno e jejuno. (A) Profundidade de criptas do duodeno em mm; (B) Altura de vilosidades do duodeno; (C) Profundidade de criptas do jejuno em mm; (B) Altura de vilosidades do jejuno. Letras diferentes significam diferença estatística.....	83
<b>Figura 24</b> – Fotomicrografia representativa do corte duodenal. (A) Corte duodenal do grupo C; (B) Corte duodenal do grupo PROB; (C) Corte duodenal do grupo DP; (B) Corte duodenal do grupo DPxPROB. Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 10x. Seta preta = cripta; seta vermelha = vilosidade.....	84
<b>Figura 25</b> – Fotomicrografia representativa do corte jejunal. (A) Corte jejunal do grupo C; (B) Corte jejunal do grupo PROB; (C) Corte jejunal do grupo DP; (B) Corte jejunal do grupo DPxPROB. Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 10x. Seta preta = cripta; seta vermelha = vilosidade.....	85
<b>Figura 26</b> – Medianas dos parâmetros renais. (A) Espaço da cápsula de Bowman; (B) Circunferência da cápsula de Bowman; (C) Espaço glomerular; (D) Diâmetro glomerular.....	86
<b>Figura 27</b> – Fotomicrografia representativa dos tecidos renais. Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 10x. Seta preta = cripta; seta vermelha = vilosidade.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**DP:** Doença periodontal

**PD:** Periodontite

**HIV:** Vírus da imunodeficiência humana

**PP:** Parto prematuro

**BPN:** Baixo peso ao nascimento

**PE:** Pré-eclâmpsia

**g:** Gramas

**UTI:** Unidade de terapia intensiva

**Th1:** T Helper 1

**Th2:** T Helper 2

***P. gingivalis:*** *Porphyromonas gingivalis*

***B. lactis:*** *Bifidobacterium lactis*

**RAR:** Raspagem e alisamento radicular

**MMPs:** Metaloproteinases

**MICRO-CT:** Microtomografia computadorizada

**CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais

**FORP:** Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

**USP:** Universidade de São Paulo

**ARRIVE:** *Animal Research Reporting of In Vivo Experiments*

**VO:** Volume ósseo

**SPF:** *Specific pathogen free*

**mL:** Mililitro

**mg:** Miligrama

**dL:** Decilitro

**NO:** Óxido nítrico

**NO<sub>3</sub>:** Nitrato

**NO<sub>2</sub>:** Nitrito

**µL:** Microlitro

**mM:** Micromolar

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**TE:** Tampão Tris-EDTA  
**H&E:** Hematoxilina & Eosina  
**NIC:** Nível de inserção clínica  
**JCE:** Junção cimento-esmalte  
**AV:** Altura de vilosidades  
**PC:** Profundidade de criptas  
**PO:** Porosidade óssea  
**VOI:** Volume ósseo de interesse  
**Tb.N:** Número de trabéculas  
**Tb.S:** Separação entre trabéculas  
**ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
**LPS:** Lipopolissacarídeo  
**T-reg:** Células T-reguladoras  
**IL:** Interleucina  
**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral-alfa  
**RANK:** Receptor do ativador do fator Kappa B  
**RANKL:** Ligante do receptor do ativador do fator Kappa B  
**OPG:** Osteoprotegerina  
**OVX:** Ovariectomizada  
**Rh-BMP-2:** Proteína morfogenética óssea-2  
**AGCC:** Ácidos graxos de cadeia curta  
**TLR:** Receptor Toll-like  
**MAPKs:** Proteínas quinases ativadas por mitógenos  
**SS:** Sangramento à sondagem  
**PA:** Pressão arterial  
**MEC:** Matriz extra-celular  
**kDa:** Kilo Dalton



## LISTA DE SÍMBOLOS

%: Por cento

$\leq$ : Menor ou igual a (símbolo matemático)

$\geq$ : Maior ou igual a (símbolo matemático)

$>$ : Maior a (símbolo matemático)

$<$ : Menor a (símbolo matemático)

$=$ : Igual

$n$ : Tamanho da amostra

$p$ : Probabilidade de significância

$^{\circ}$ : Grau

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO A:</b> Declaração de aprovação do CEUA.....	124
<b>ANEXO B:</b> Artigo publicado.....	125
<b>ANEXO C:</b> Artigo submetido.....	134

---

# Sumário

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>34</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>41</b>
2.1 Objetivo geral .....	41
2.2 Objetivos específicos .....	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
3.1 Apreciação ética .....	44
3.2 Cálculo do tamanho amostral .....	44
3.3.1 Descrição dos grupos experimentais.....	45
3.5 Indução da periodontite por inoculação oral de <i>P. gingivalis</i> .....	47
3.6 Indução da periodontite com ligadura .....	47
3.7 Preparo das culturas probióticas e administração aos animais.....	48
3.8 Eutanásia e coleta de material biológico para análises .....	49
3.9 Proteinúria .....	49
3.11 Avaliação hemodinâmica dos animais acordados .....	50
3.12.2 Ensaio de quantificação de nitrito plasmático .....	51
3.13 Avaliação microbiológica .....	51
3.13.1 Coleta das amostras .....	51
3.13.2 Cepas bacterianas e condições de crescimento .....	51
3.13.3 Isolamento do DNA e preparo das sondas .....	52
3.13.4 Checkerboard DNA-DNA hybridization .....	53
3.14 Processamento histológico .....	55
3.16 Análise histomorfométrica dos tecidos intestinais .....	56
3.17 Análise histopatológica e histomorfométrica dos tecidos renais.....	56
3.18 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT) ....	57
3.20 Variáveis de resultado .....	59
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
4.1 Peso materno, peso e quantidade dos fetos e peso das placentas.....	62
4.1.1 Peso materno antes da eutanásia .....	62
4.1.2 Peso dos fetos .....	63
4.1.3 Quantidade de fetos por animal.....	64
4.1.4 Peso das placentas .....	66
4.2 Proteinúria .....	67
4.5 Pressão arterial sistólica invasiva .....	70
4.7.1 MMP-2 na placenta .....	71
4.7.2 MMP-9 na placenta .....	73
4.7.3 MMP-2 no soro.....	74
4.8 Análise microbiológica .....	75
4.9 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT) .....	77
4.10 Análise histopatológica e histomorfométrica dos tecidos periodontais .....	79
4.10.1 Análise histopatológica dos tecidos periodontais .....	79

4.10.2 Análise histomorfométrica dos tecidos periodontais.....	83
<b>4.11 Análise histomorfométrica dos tecidos intestinais .....</b>	<b>84</b>
<b>5. <i>DISCUSSÃO</i> .....</b>	<b>91</b>
<b>6. <i>CONCLUSÕES</i> .....</b>	<b>102</b>
<b>7. <i>REFERÊNCIAS</i> .....</b>	<b>104</b>

---

Introdução e Revisão de literatura

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Doença periodontal (DP) trata-se de uma doença infecto-inflamatória crônica, multifatorial, causada inicialmente por bactérias que colonizam a cavidade oral (Armitage, 1999; Caton et al., 2018; Kwon et al., 2021). Esta condição pode atingir os tecidos de proteção (gengiva) e de suporte (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar) dos dentes, e causar danos irreversíveis. A DP pode ser classificada em gengivite, forma reversível da doença, que se limita à inflamação na gengiva, e periodontite (PD), forma mais grave, que resulta na destruição progressiva do aparato de sustentação dentária (Caton et al., 2018; Papapanou & Kornman, 2020).

Considerada a 6ª doença de maior prevalência na humanidade, a PD tem sua patogênese associada a alteração do equilíbrio natural da microbiota subgengival, favorecendo o crescimento de espécies anaeróbias gram-negativas, o que leva a disbiose (Kassebaum et al., 2014; Lamont & Hajishengallis, 2015). Dentre as manifestações clínicas da PD, destaca-se o sangramento gengival, perda de inserção clínica, formação de bolsas periodontais e perda óssea alveolar (Kassebaum et al., 2014; Papapanou & Kornman, 2020). Apesar do caráter silencioso e indolor, a PD tem impacto negativo na qualidade de vida do indivíduo, de acordo com o conceito de saúde, baseado no modelo biopsicossocial, por resultar em sequelas que comprometem além da saúde, a estética (Fischer et al., 2020).

Durante muitos anos, os conhecimentos sobre a fisiopatologia das DPs, especialmente a PD, limitavam os malefícios apenas ao periodonto. Com o passar do tempo, o entendimento sobre a DP induzida por biofilme se ampliou, e os efeitos sistêmicos oriundos da infecção periodontal, deram origem ao termo Medicina Periodontal (Williams & Offenbacher, 2000, Beck et al., 2019). A Academia Americana de Periodontia e Federação Europeia de Periodontia conceituam Medicina Periodontal como o ramo da Periodontia que estuda as associações entre DPs e doenças sistêmicas (Williams & Offenbacher, 2000; Beck et al., 2019). Dentre as condições sistêmicas estudadas, estão incluídas: diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, artrite reumatoide, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e intercorrências gestacionais (Humphrey et al., 2008; Graziani et al., 2018; Pólvora et al., 2018; Nobre et al., 2019; Bobetsis et al., 2020; Mata et al., 2021; Ramos Peña et al., 2022).

A relação entre PD e intercorrências gestacionais vem sendo amplamente explorada na literatura. Parto prematuro (PP), baixo peso ao nascimento (BPN) e pré-eclâmpsia (PE) são as principais intercorrências gestacionais associadas a PD, por meio de diferentes mecanismos de ação (Daalderop et al., 2018). PP é definido como parto antes das 37 semanas (< 259 dias de

gestação). É considerada a principal causa de morte e incapacidade perinatal em crianças (Puertas et al., 2018). BPN equivale a todo recém-nascido com menos de 2.500 gramas (g) ao nascimento. É determinante biológico relevante para morbidade e mortalidade infantil. PE trata-se de um distúrbio multissistêmico da gravidez associado a hipertensão gestacional e proteinúria. Geralmente afeta 2% a 5% das gestantes e é uma das principais causas de mortalidade e morbidade materna e perinatal (Vest & Cho, 2014; Teshome & Yitayeh, 2016; Figuero et al., 2020).

Além do alto risco de morte materna e fetal produzido pelas intercorrências gestacionais, os neonatos que sobrevivem, tornam o bebê prematuro ou de BPN, um “fardo socioeconômico” (Bobetsis et al., 2020). Despesas com unidades de terapia intensiva (UTI) neonatais, além dos desafios ao longo da vida, como distúrbios respiratórios, cardiovasculares e metabólicos, deficiências cognitivas e intelectuais, dificuldades motoras e de aprendizagem, tornam as intercorrências gestacionais, um importante problema de saúde pública e de natureza global (Saigal & Doyle, 2008). A etiologia das intercorrências gestacionais é multifatorial, porém sabe-se que a infecção e a inflamação materna atuam diretamente no resultado neonatal. Desta forma, os avanços na ciência acerca da fisiopatologia das intercorrências gestacionais sinalizam a prevenção de infecções e distúrbios metabólicos maternos como uma estratégia para erradicação (Conde-Agudelo et al., 2008; Sykes et al., 2012).

A resposta imune durante a gravidez é complexa. Após a fertilização de um óvulo, metade do DNA do produto é de origem paterna, ou seja, o feto é considerado um enxerto semi-alogênico, produzido por dois indivíduos biocompatíveis (van Nieuwenhoven et al., 2003; Orefice, 2021). Desta forma, ao passo que a mãe precisa “tolerar” e “adaptar” o feto, o sistema imune precisa combater os antígenos paternos, e isto é realizado, pela mudança no padrão de citocinas T helper 1 (Th1) para T helper 2 (Th2) (van Nieuwenhoven et al., 2003; Sykes et al., 2012). Alguns patógenos estão associados a uma resposta imune Th1, e as alterações imunológicas observadas na gravidez, tornam a mulher grávida mais susceptível a infecções, principalmente por bactérias e vírus (Fuhler, 2020; Orefice, 2021).

Além das alterações no padrão de resposta imune, durante a gravidez, ocorrem alterações importantes nos níveis de hormônios sexuais femininos, principalmente progestinas e estrogênios (van Nieuwenhoven et al., 2003). O principal estrogênio no plasma é o estradiol, e a principal progestina secretada pelo corpo lúteo, córtex adrenal e placenta, é a progesterona, que atingem níveis máximos ao final do terceiro trimestre gestacional (Wu et al., 2015). Estudos mostraram que os receptores destes hormônios e seus subtipos foram encontrados no periodonto, e têm papel importante na diferenciação, proliferação e queratinização do epitélio



gengival, proliferação de fibroblastos e maturação de tecido conjuntivo, tornando os tecidos periodontais, um possível alvo (Vittek et al., 1982; Wu et al., 2015).

O aumento da permeabilidade vascular induzida pelos níveis elevados de hormônios sexuais femininos, podem dar origem a gengivite da gravidez (Gürsoy et al., 2013; Caton et al., 2018). O estudo clássico de Kornman & Loesche (1980), demonstrou que, à medida que a gravidez progride, ocorre uma mudança na microbiota subgengival, para uma microbiota predominantemente anaeróbica. Isto pôde ser observado pela correlação entre o aumento dos níveis sistêmicos de progesterona e estradiol, durante a gravidez, e o aumento de *Prevotella melaninogenica*, em amostras de placa subgengival de mulheres grávidas. Esta inflamação não difere clinicamente da gengivite induzida por biofilme, porém pode-se observar exacerbação da inflamação gengival na presença de quantidades relativamente baixas de biofilme (Wu et al., 2015; Bobetsis et al., 2020). Além de inflamação local, este aumento da permeabilidade vascular pode resultar na disseminação de micro-organismos e seus subprodutos tóxicos para a circulação sistêmica e permitir uma infecção metastática na unidade feto-placentária (Contreras et al., 2006; Madianos et al., 2013; Krüger et al., 2019).

O avanço das técnicas de diagnóstico microbiológico usando Biologia Molecular, tem associado a presença de periodonto-patógenos, tais como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* e *Treponema denticola* a distúrbios hipertensivos da gravidez (Contreras et al., 2006; Swati et al., 2012; Chaparro et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que a *P. gingivalis* tem a capacidade de inibir a invasão do trofoblasto de maneira dose-dependente, e subsequentemente, suprimir o remodelamento vascular, que prejudica o crescimento placentário e o bem-estar fetal. Isto pode explicar, em partes, a crescente prevalência das intercorrências gestacionais em mulheres com PD (Hirohata et al., 2017).

Seguindo os princípios de que a prevenção é a melhor estratégia para erradicação de doenças/intercorrências, faz-se importante a prevenção e tratamento periodontal, especialmente em mulheres grávidas. O tratamento padrão-ouro para a PD consiste no debridamento mecânico do biofilme subgengival e cálculo, por meio da raspagem e alisamento radicular (RAR) das superfícies acometidas pela PD, associado a efetivo controle do biofilme supragengival (Deas & Mealey, 2010; Cobb & Sottosanti, 2021). Este tratamento causa efeitos benéficos aos tecidos periodontais, entretanto, apenas a terapia mecânica isolada, muitas vezes não produz os resultados clínicos desejados em casos de PD em estágios e graus avançados (Haas et al., 2021).

Irregularidades da superfície dentária e áreas de bifurcação, incapacidade de acessar bolsas periodontais profundas, capacidade de penetração em tecidos moles de micro-organismos específicos, além da presença de fatores modificadores da DP são exemplos de limitações da terapia periodontal. Estas limitações resultam na recolonização por periodonto-patógenos e recorrência da doença (Berezow & Darveau, 2011; Jepsen et al., 2011). Desta forma, o clínico é instigado a utilizar terapias adjuvantes, como a terapia antimicrobiana associada a RAR, com o objetivo de eliminar patógenos que persistiram em sítios não-responsivos (Teughels et al., 2020; Haas et al., 2021).

O uso de antibióticos sistêmicos associados a RAR garante resultados efetivos por atingir todas as superfícies e fluidos orais, além de atingir periodonto-patógenos que invadem os tecidos do hospedeiro. O protocolo antibiótico adjuvante a terapia periodontal mais bem documentado na literatura é o uso sistêmico do metronidazol e amoxicilina (Teughels et al., 2020, Feres et al., 2021). Além do menor número de bolsas residuais  $\geq 5$  mm, maior redução na profundidade de sondagem, e maior ganho de inserção clínica observado no tratamento, esta terapêutica permite uma mudança benéfica no perfil microbiano subgingival (Soares et al., 2014; Feres et al., 2015; Tamashiro et al., 2016). Apesar dos efeitos positivos do uso de antibióticos, é necessário, todavia, sempre pesar os efeitos colaterais e reações adversas contra os possíveis benefícios, quando instituídos na terapia periodontal ou de doenças infecciosas em geral. Reações de hipersensibilidade, náuseas, vômitos e distúrbios gastrointestinais são os efeitos adversos mais comuns relatados em estudos sobre o uso de antibióticos sistêmicos como adjuvantes a terapia periodontal (Teughels et al., 2020). Além dos efeitos colaterais, outro grande problema relacionado ao uso de antibióticos é o desenvolvimento de resistência bacteriana, o que tem gerado grande preocupação entre as autoridades de saúde nacionais e internacionais (Samreen et al., 2021; Larsson & Flach, 2022).

Um número cada vez maior de estudos sobre a interação entre micro-organismos e o eixo cérebro-boca-intestino tem ampliado substancialmente o uso de bactérias específicas para melhorar o metabolismo do hospedeiro e prevenir/tratar várias doenças (Oliveira et al., 2017; Ricoldi et al., 2017; Ouwehand et al., 2018; Invernici et al., 2018, 2020; Silva et al., 2019; Haas et al., 2021; Messoria et al., 2021; Silva et al., 2022).

Desse modo, a utilização de bactérias probióticas surge como uma abordagem terapêutica adjuvante ao tratamento periodontal convencional, uma vez que elas apresentam capacidade imuno-moduladora da resposta inflamatória do hospedeiro, além de modificar a microbiota oral e intestinal (Teughels et al., 2011; Messoria et al., 2013; Haas et al., 2021;

Messora et al., 2021). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (OAA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (Hill et al., 2014). Vários estudos descreveram os potenciais benefícios dos probióticos na saúde sistêmica, como por exemplo, controle dos níveis de colesterol total e lipoproteína de baixa densidade, e regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, e em desordens médicas, dentre elas, doenças gastrointestinais, síndrome metabólica e síndrome do intestino irritável (Broekaert & Walker, 2006; Guo et al., 2011; Barreto et al., 2014; Khalesi et al., 2014).

Quanto à utilização de probióticos na gravidez, foi reportado que a intervenção dietética com *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* reduziram a incidência de diabetes gestacional em humanos (Luoto et al., 2010). Além disso, estudos pré-clínicos e clínicos mostraram benefícios terapêuticos da utilização de probióticos na prevenção do PP, por meio do controle da inflamação sistêmica e intra-uterina e pela modulação da microbiota vaginal materna (Vitali et al., 2012; Yang et al., 2014).

O *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (*B. lactis* HN019), originado a partir do leite, é considerado um probiótico com capacidade de adesão a vários tipos de células do epitélio intestinal e propriedades imuno-moduladoras (Chiang et al., 2000; Waller et al., 2011; Cheng et al., 2021). Hojo e colaboradores (2007) demonstraram que espécies do gênero *Bifidobacterium* podem estar fortemente associadas a saúde periodontal e Jäsberg e colaboradores (2016) observaram que espécies de *Bifidobacterium* apresentam potencial de adesão ao biofilme subgingival *in vitro*, além de reduzir significativamente a contagem de *P. gingivalis*, melhorando a saúde periodontal.

Dados publicados por nosso grupo de pesquisa demonstraram potenciais benefícios do *B. lactis* HN019 em estudos pré-clínicos e clínicos. Dentre eles, podemos destacar: diminuição da perda óssea alveolar e perda de inserção clínica em ratos com PD experimental (Oliveira et al., 2017), melhora do potencial da RAR no tratamento da PD experimental em ratos (Ricoldi et al., 2017), melhora nos parâmetros clínicos, imuno-inflamatórios e microbiológicos em indivíduos com PD quando comparados a indivíduos que receberam RAR associada a placebo (Invernici et al., 2018, 2020), melhora nos parâmetros sistêmicos da artrite reumatoide (Cardoso et al., 2020) e da síndrome metabólica na PD experimental (Silva et al., 2022) e nos parâmetros clínicos da mucosite peri-implantar (Messora et al., 2019).

Diferentes pesquisadores avaliaram a associação entre PD e intercorrências gestacionais e produziram resultados conflitantes (Chambrone et al., 2011; Wei et al., 2013).

Esta relação permanece controversa na literatura. Isso pode ser devido a presença de fatores de confusão presentes nos estudos clínicos, tais como: a não exclusão de doenças/condições sistêmicas consideradas modificadoras das DPs em mulheres grávidas, como diabetes mellitus, tabagismo, e fatores genéticos, bem como as diversas metodologias usadas para avaliar a PD, o desenho do estudo, o tamanho amostral, e a heterogeneidade da população estudada (Collins et al., 1994; Moore et al., 2004; Srinivas et al., 2009; Chambrone et al., 2011; Wei et al., 2013). É importante ressaltar também que apenas um estudo relatou o impacto da probioticoterapia na gengivite associada a gravidez (Schlagenhauf et al., 2016) e que não há estudos que avaliaram o impacto da terapia probiótica na associação entre PD e gravidez. Desta forma, o objetivo do presente estudo é avaliar primeiramente os efeitos da PD na gravidez e se a terapia probiótica com *B. lactis* HN019 é capaz de causar benefícios nessa interface.

---

Proposição

## 2. PROPOSIÇÃO

### 2.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar os efeitos da PD na gravidez e o impacto da administração sistêmica do probiótico *B. lactis* HN019 na PD experimental induzida por ligadura e inoculação oral de *P. gingivalis* em ratas prenhes.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar em ratas prenhes, com e sem PD induzida por ligadura e inoculação oral de *P. gingivalis*, tratadas ou não com *B. lactis* HN019:

- ✓ Peso materno;
- ✓ Peso e quantidade de fetos;
- ✓ Peso das placentas;
- ✓ Proteinúria por meio de análise bioquímica;
- ✓ Creatinina na urina por meio de análise bioquímica;
- ✓ Pressão arterial invasiva pela avaliação hemodinâmica em tempo real;
- ✓ Quantificação de nitrito e nitrato no plasma por meio da quimiluminescência através de ozônio;
- ✓ Determinação dos níveis de metaloproteinases (MMPs)-2 e 9 no plasma e na placenta pelo método zimografia em gel;
- ✓ Microbiota presente em amostras de biofilme oral por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*;
- ✓ Perda óssea alveolar por meio da análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios x (micro-CT);
- ✓ Nível de inserção conjuntiva na região interproximal entre o 1º e o 2º molares inferiores por meio da análise histomorfométrica;
- ✓ 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 da análise histopatológica;
- ✓ Altura de vilosidades e profundidade de criptas nos tecidos intestinais (duodeno e jejuno) por meio de histomorfometria;
- ✓ Espaço da cápsula de Bowman, circunferência da cápsula de Bowman, diâmetro e circunferência glomerular nos rins por meio de histomorfometria;

- ✓ Grau de inflamação, padrão de celularidade, conteúdo do infiltrado inflamatório intratubular e estruturação tecidual nos rins por meio de análise histopatológica.

---

Material e Métodos



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Apreciação ética

A pesquisa foi realizada respeitando os princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas para prática didático-científica da vivissecção dos mesmos (Lei 11.794/2008). Todos os procedimentos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo 2018.1.800.58.8 – ANEXO A) e seguiram as diretrizes do *ARRIVE Guidelines (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)* (Danos et al., 2010).

#### 3.2 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa *Graphpad Statemate 9.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados que foram obtidos neste estudo foi calculado considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão entre os grupos DP e C do estudo de Oliveira et al., (2017) reconhecendo a diferença significativa de 5% ( $\delta$ ) entre os grupos, intervalo de confiança de 95% ( $\alpha = 0,05$ ), desvio-padrão ( $\sigma$ ) de 23%, mudanças na média do volume ósseo (VO) como variável primária [ $Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)$ ] = 7.84. O cálculo da amostra por grupo foi baseado na fórmula:  $n \geq \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$ . O número necessário foi de 8 animais por grupo experimental. De acordo com estudos prévios do nosso grupo (estudo piloto), 30% dos animais podem apresentar ausência de perda óssea alveolar com o modelo de PD ou perda de ligaduras no pós-operatório. Além disso, algumas ratas podem não emprenhar, portanto, foram utilizadas 12 ratas por grupo experimental, como margem de segurança.

#### 3.3 Modelo experimental

Foram utilizadas 48 ratas fêmeas e 24 ratos machos, da linhagem *Sprague-Dawley SPF* (livre de agentes patógenos específicos), provenientes do Biotério Central da USP Ribeirão Preto, com idade entre 7 e 8 semanas de vida. Os animais foram mantidos no Biotério da FORP/USP, acomodados em caixas de polipropileno autoclaváveis e submetidos a um período de 7 dias de aclimação com o ambiente e com a equipe de execução do projeto. A sala foi climatizada em uma temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida livre de nitritos e nitratos e água *ad*

*libitum*. O protocolo de acasalamento foi executado quando todas as fêmeas atingiram 10 semanas de vida, em ambiente escuro, utilizando o sistema harém, isto é, 2 fêmeas para 1 macho (Mattaraia & Moura, 2012). Para a confirmação da prenhez, foi realizado o lavado vaginal para observação de espermatozoides por meio de microscopia óptica (Duan et al., 2018).

Antes de iniciar o protocolo experimental, todos os animais foram identificados por um código numérico e alocados em diferentes grupos com ajuda de um *software* em computador. A sequência de alocação permaneceu oculta para os avaliadores do estudo (avaliadores de resultados e bioestatísticos). Todas as análises foram, então, realizadas por examinadores calibrados que desconheciam os grupos experimentais do presente estudo.

### 3.3.1 Descrição dos grupos experimentais

- ✓ **Grupo controle** (C; n=12): Constituído por 12 ratas prenhes saudáveis. Estes animais não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico ou protocolo de infecção, apenas receberam água e carboximetilcelulose por gavagem oral como placebo;
- ✓ **Grupo probiótico** (PROB; n=12): Constituído por 12 ratas prenhes saudáveis. Estes animais não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico ou protocolo de infecção, apenas receberam *B. lactis* HN019 na água desde a chegada no biotério, até o final do protocolo experimental e carboximetilcelulose por gavagem oral (placebo);
- ✓ **Grupo doença periodontal** (DP; n=12): Constituído por 12 ratas prenhes com periodontite experimental induzida pela colocação de ligadura de fio de seda e gavagem oral de *P. gingivalis* W83;
- ✓ **Grupo doença periodontal x probiótico** (DPxPROB; n=12): Constituído por 12 ratas prenhes com periodontite experimental induzida pela colocação de ligadura de fio de seda e gavagem oral *P. gingivalis* W83 e que receberam *B. lactis* HN019 na água desde a chegada no biotério, até o final do protocolo experimental.

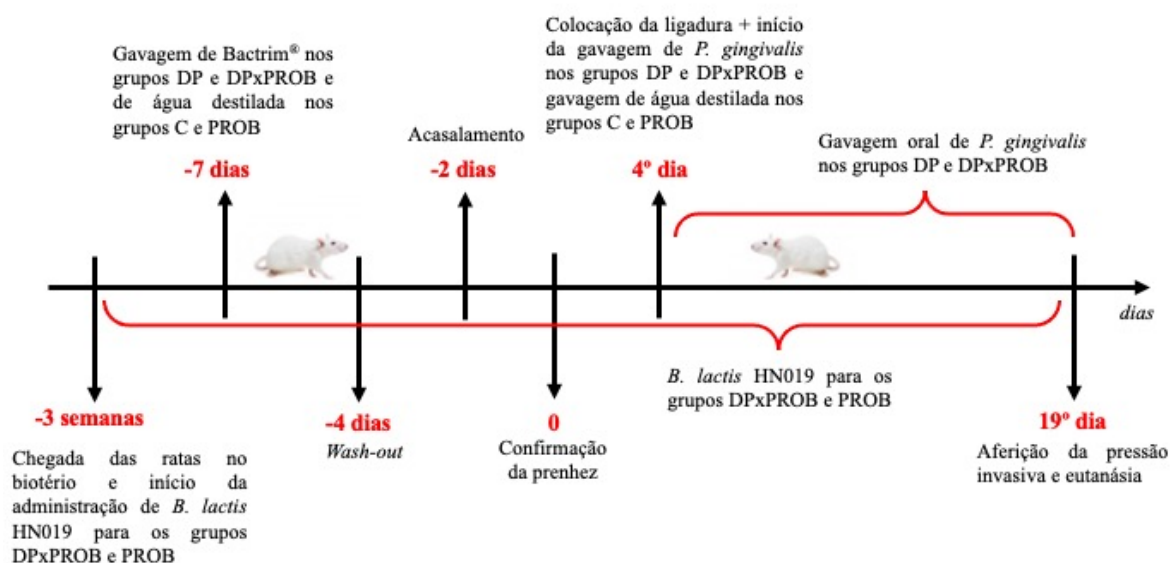
### 3.4 Protocolo experimental

As ratas fêmeas chegaram ao biotério entre 7 e 8 semanas de vida. Após o período de aclimatação (7 dias), aleatorização e codificação de cada animal, foi iniciado o protocolo experimental. Os animais anteriormente alocados nos grupos PROB e DPxPROB iniciaram o consumo do probiótico *B. lactis* HN019 desde a chegada no biotério e permaneceram até o fim

do experimento. Após o período de aclimação, os animais DP e DPxPROB, receberam Bactrim® – sulfametoxazol 200 mg e trimetoprima 40 mg (Roche®, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, RJ) por 7 dias (1 vez ao dia) para depleção da microbiota indígena, como parte do protocolo de indução da PD (Palioto et al., 2019). Cada comprimido foi macerado em gral e pistilo, diluído em 1 mL de água destilada e inoculado via gavagem nos animais que receberam o protocolo de infecção. Os animais que não receberam o protocolo de infecção (C e PROB) receberam a gavagem de 1 mL de água destilada para simular o mesmo estresse.

Ao final da administração do antibiótico, foi realizado um período de *wash-out* de 4 dias. Quando todas as ratas completaram 10 semanas de vida, foi induzido o acasalamento. Para isto, foi utilizado 1 macho para cada 2 fêmeas (método harém). As fêmeas foram acomodadas na caixa do macho, no período noturno, e permaneceram por 2 noites. Ao final das duas noites, foi realizado o *plug* vaginal para confirmação da prenhez. O dia “0” do experimento foi considerado o dia da confirmação da prenhez de todas as fêmeas.

No 4º dia gestacional, foi induzida a PD pela colocação da ligadura e iniciou-se a gavagem oral de *P. gingivalis*, como descrito anteriormente. Os animais que não receberam a infecção, receberam gavagem de uma solução de 2% de carboximetilcelulose em PBS para simular o mesmo estresse. Ao 19º dia gestacional, foi realizada a aferição da pressão arterial invasiva, as ratas foram eutanasiadas e o material biológico foi coletado (**Figura 1**)



**Figura 1** – Linha do tempo do protocolo experimental.

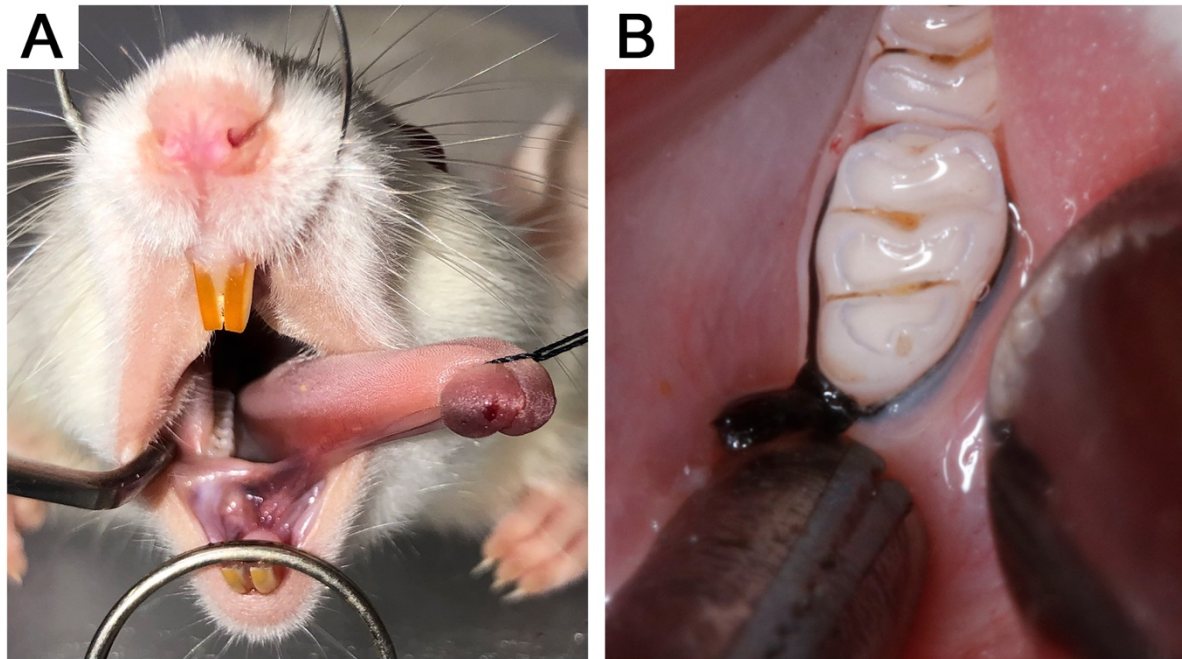
### 3.5 Indução da periodontite por inoculação oral de *P. gingivalis*

*Porphyromonas gingivalis* ATCC<sup>®</sup>BAA308<sup>™</sup> W83 obtida a partir de estoque congelado, foi cultivada em ágar BHI (*Brain heart infusion Agar* - Difco<sup>®</sup>) suplementado com sangue desfibrinado de ovelha a 5%, hemina (0,5 µg/mL) e menadiona (0,5 µg/mL), e incubada em anaerobiose (BD GasPak EZTM<sup>™</sup>) por 48 horas a 37°C. As colônias obtidas foram transferidas para caldo BHI (*Brain heart infusion Broth* - Difco<sup>®</sup>) adicionado de hemina (0,5 µg/mL) e menadiona (0,5 µg/mL). Após a incubação, a suspensão bacteriana foi padronizada por meio da determinação da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Micronal AJX-1000) no comprimento de onda 625 nanômetros (nm) ajustado para 0,700 a fim de obter o inóculo  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). A suspensão foi, então, centrifugada a 2.000 g/10 minutos e o *pellet* ressuscitado em solução de 2% de carboximetilcelulose em *Phosphate buffered saline* (PBS). O protocolo de indução da PD teve início com a administração sistêmica de sulfametoxazol 200 mg e trimetoprima 40 mg (Roche<sup>®</sup>, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, RJ) por 7 dias (1 vez ao dia) para depleção da microbiota indígena, seguido de 4 dias de *wash-out*. A gavagem de 1,0 mL de  $1 \times 10^9$  UFCs de *P. gingivalis* teve início no 4º dia gestacional e continuou durante 15 dias (Mata et al., 2021). Os grupos experimentais que não receberam gavagem com *P. gingivalis*, receberam 1 mL de uma solução de 2% de carboximetilcelulose em PBS, com metodologia semelhante à acima descrita.

### 3.6 Indução da periodontite com ligadura

No 4º dia gestacional, as ratas foram anestesiadas por injeção intraperitoneal com solução de cloridrato de xilazina a 2% (2 mg/mL) (Rompum<sup>®</sup> - Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e cloridrato de ketamina a 10% (10 mg/mL) (Dopalen<sup>®</sup> - Ceva Saúde Animal LTDA., Paulínia, SP, Brasil) nas respectivas doses de 10 mg/quilo (kg) (xilazina) e 80mg/kg (ketamina). Após a anestesia, cada animal foi colocado em mesa operatória, para permitir manter a boca da rata aberta, facilitando o acesso aos dentes posteriores da mandíbula (de Molon et al., 2018) (**Figura 2A**). Com o auxílio de porta agulha tipo Castroviejo (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil) e sonda exploradora odontopediátrica (Golgran, São Paulo, Brasil), foi colocado um fio de seda 4-0 (Ethicon, Jhonson & Jhonson, São José dos Campos, SP, Brasil)

ao redor da área cervical dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo de cada rata, permanecendo subgingivalmente nas faces vestibular e lingual (**Figura 2B**). A ligadura permaneceu em posição por 15 dias e sua presença foi verificada periodicamente. No 19º dia da gestação, os animais foram anestesiados com solução de isoflurano 2% e eutanasiados pela administração de uma sobredose de xilazina e ketamina.



**Figura 2** – (A) Animal posicionado na mesa operatória para colocação das ligaduras; (B) Fio de seda em posição subgingival para indução da periodontite no primeiro molar inferior.

### 3.7 Preparo das culturas probióticas e administração aos animais

*B. lactis* HN019 (HOWARU™ Bifido, E. I. Dupont® de Nemours and Company Wilmington, DE, EUA) foi cultivado em meio MRS Ágar (Man, Rogosa and Sharpe – Difco™ *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 bacteriológica esterilizada, o inóculo bacteriano foi transferido para tubos de centrifugação tipo Falcon contendo pérolas de vidro e água destilada esterilizada. Após homogeneização em agitador de tubos (Phoenix AP 65, Araraquara, SP, Brasil), a suspensão foi submetida à diluição decimal seriada até 10<sup>-9</sup>, em PBS, com pH 7,0 e acrescida de 2% de carboximetilcelulose. Alíquotas de 100 µl foram depositadas em placas de Petri contendo MRS Ágar 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 qualitativa dos inóculos foi obtida pela determinação da DO no comprimento de onda de 625 nm com espectrofotômetro, bem como por contagem em duplicata do número de UFCs/mL. Desta forma, a DO de 2,898 correspondeu ao inóculo padronizado com  $1,0 \times 10^{11}$  UFC/mL (L. F. F. Oliveira et al., 2017).

Nos grupos PROB e DPxPROB, 2 mL contendo  $1,0 \times 10^{11}$  UFC/mL de *B. lactis* HN019 foram adicionadas na água. O consumo diário de água contendo a suspensão probiótica foi medido diariamente e a média, por animal, foi de 47,5 mL/dia.

### 3.8 Eutanásia e coleta de material biológico para análises

No 19º dia gestacional, os animais foram pesados e anestesiados por inalação de isoflurano 2% e foi realizada eutanásia pela administração de uma sobredose de xilazina e ketamina. Foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca, que foi armazenado em freezer -80°C para análises bioquímicas. Posteriormente foi realizada uma incisão na região abdominal para retirada dos fetos, útero, placentas, rim e intestino. As hemi-mandíbulas direitas foram utilizadas para análise microtomográfica. As hemi-mandíbulas esquerdas foram submetidas as análises histomorfométricas.

Os fetos e placentas foram cuidadosamente retirados do útero, lavados com solução salina a 0,9% gelada (4°C) e pesados a fim de se avaliar os efeitos da infecção/probioticoterapia.

### 3.9 Proteinúria

Logo após a eutanásia dos animais e incisão abdominal, foi realizada a coleta de urina diretamente da bexiga da rata utilizando seringa de 1mL esterilizada. Esta amostra foi utilizada para quantificação de proteínas na urina, sendo utilizado o kit Bioclin (Bioprot U/LCR, Belo Horizonte, MG, Brasil) de método colorimétrico vermelho de pirogalol (apresenta a mesma sensibilidade para albumina e gama globulinas). As proteínas presentes na urina reagiram com o vermelho de pirogalol e o molibdato formando um complexo de cor vermelha, com absorção máxima em 600 nm. A intensidade de cor formada é diretamente proporcional a concentração de proteína na amostra. De acordo com os valores de absorbância, foram aplicados os cálculos seguindo as instruções descritas pelo fornecedor do kit diagnóstico, sendo o resultado da proteinúria expresso em miligramas por decilitro (mg/dL) de acordo com Mata et al., (2021).

### 3.10 Creatinina na urina

A coleta da amostra de urina foi realizada exatamente como descrita acima para a análise de proteinúria. Estas amostras foram utilizadas para quantificação de creatinina na urina, sendo utilizado o kit Bioclin (Bioprot U/LCR, Belo Horizonte, MG, Brasil) de método colorimétrico Jaffé modificado. A creatinina presente na urina reagiu com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado. Nesse pH ocorre a máxima formação do complexo corado Creatinina-Picrato, e, também com outros elementos plasmáticos. Com a adição do reagente ácido, o pH é diminuído e a cor devida à creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromogênios. Por diferença entre as leituras obtidas no pH ácido, obtém-se o valor real da creatinina. De acordo com os valores de absorvância, foram aplicados os cálculos seguindo as instruções descritas pelo fornecedor do kit diagnóstico, sendo o resultado da creatinina expresso em miligramas por decilitro (mg/dL).

### 3.11 Avaliação hemodinâmica dos animais acordados

As alterações hemodinâmicas induzidas foram monitoradas em tempo real. Resumidamente, no 19º dia gestacional, antes da eutanásia, um catéter de polietileno (2 cm PE-10 soldado a um catéter PE-50 de 18 cm) preenchido com salina heparinizada 50UI/mL foi inserido na artéria femoral dos animais. O procedimento foi realizado após anestesia com isoflurano 2%. O cateter inserido na artéria femoral foi acoplado a um transdutor de pressão, conectado a um sistema de aquisição de dados *PowerLab 4/35 and LabChart Pro* (ADInstruments Pty LTD) para acompanhamento da pressão arterial invasiva. Os cateteres usados foram submetidos à siliconização interna com Sigmacote.

### 3.12 Ensaios bioquímicos

O sangue total coletado na punção cardíaca foi centrifugado a 3000 rpm a 4°C em tubo heparinizado (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company) por 5 minutos. O plasma obtido foi aliquoteado em tubo âmbar contendo solução estabilizadora NEM/DTPA (10mM/2mM).

#### 3.12.1 Ensaio de quantificação de nitrato plasmático

Para quantificação de nitrato, as amostras foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio. Para tal, 10 µl de plasma foi injetado em duplicata no *purge vessel* em um sistema fechado contendo solução ácida de cloreto de vanádio (63mM) a

95°C. O nitrato da amostra é reduzido a óxido nítrico (NO) que é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (Sievers 280i). O óxido nítrico formado reage com o ozônio, resultando em quimiluminescência em intensidade diretamente proporcional a formação de NO. Os dados obtidos foram analisados pelo programa *OriginPro* 8.5.

### 3.12.2 Ensaio de quantificação de nitrito plasmático

Para quantificação de nitrito, as amostras foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio. Para tal, 100 µl de plasma foi injetado em duplicata no *purge vessel* em um sistema fechado contendo solução redutora de triiodeto (67mM Iodeto de potássio e 30mM Iodo em ácido acético glacial). O nitrito da amostra é reduzido a NO que é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (Sievers 280i). O NO formado reage com o ozônio resultando em quimiluminescência em intensidade diretamente proporcional a formação de NO. Os dados obtidos foram analisados pelo programa *OriginPro* 8.5.

## 3.13 Avaliação microbiológica da microbiota oral

### 3.13.1 Coleta das amostras

Nos grupos C e PROB, as amostras de biofilme foram coletadas nas coroas dentárias e região interproximal dos molares, utilizando *microbrushs* esterilizados. Nos grupos DP e DPxPROB, os espécimes foram obtidos pela remoção das ligaduras.

Após a obtenção, ambas as amostras foram imediatamente colocadas em microtubos do tipo Eppendorf contendo 300 µl de solução tampão (10mM TrisHCL, 1mM EDTA, pH 7,6 – solução TE). Todos os microtubos foram hermeticamente selados com filme de parafina plástica (Parafilm M<sup>®</sup>, Bemis NA, Wisconsin, EUA) previamente identificados com o código do animal e armazenados a -80°C até seu processamento por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

### 3.13.2 Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na **Tabela 1**. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA) ou do *Forsyth Institute* (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma Broth* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville,



MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *Tannerella forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrilado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresce em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrilado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivadas em caldo para crescimento de *Mycoplasma* suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

### 3.13.3 Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas em anaerobiose no meio de cultura ágar-sangue, com exceção das duas espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrífuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500 g por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, Synth<sup>®</sup>, Labsynth, Diadema, SP, Brasil) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0).

O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al., (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA). As espécies avaliadas (**Tabela 1**) foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Haffajee & Socransky, 1994; Socransky et al., 1998).

**Tabela 1.** Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos.

Complexo azul	Complexo roxo	Complexo amarelo	Complexo verde
<i>A. gerencseriae</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
<i>A. israelii</i>	<i>V. parvula</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>C. gingivalis</i>
<i>A. naeslundii I</i>		<i>S. mitis</i>	<i>C. sputigena</i>
<i>A. naeslundii II</i>		<i>S. oralis</i>	<i>C. ochracea</i>
		<i>S. sanguinis</i>	<i>E. corrodens</i>
Complexo laranja	Complexo vermelho	Outras espécies	
<i>C. gracilis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>E. saburreum</i>	
<i>C. rectus</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>G. morbillorum</i>	
<i>C. showae</i>	<i>T. denticola</i>	<i>L. buccalis</i>	
<i>E. nodatum</i>		<i>N. mucosa</i>	
<i>F. nucleatum</i>		<i>P. melaninogenica</i>	
<i>F. nuc. ss.</i>		<i>P. acnes</i>	
<i>polymorphum</i>		<i>S. noxia</i>	
<i>F. nuc. ss. vincentii</i>		<i>S. anginosus</i>	
<i>F. periodonticum</i>		<i>T. socranskii</i>	
<i>P. micra</i>			
<i>P. intermedia</i>			
<i>P. nigrescens</i>			
<i>S. constellatus</i>			

#### 3.13.4 Checkerboard DNA-DNA hybridization

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão de biofilme contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunelectics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a  $10^5$  e  $10^6$  células, ou seja, 1  $\mu$ g e 10  $\mu$ g de DNA de cada espécie, respectivamente. A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min.

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunelectics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , a fim de remover sondas que não hibridizaram

completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ( $C_4H_4O_4$ , Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e, logo após por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20 – pH 8,0 e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl – pH 9,5.

Para a detecção dos sinais a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star™ Detection Reagent* (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas a temperatura de 20°C.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas no presente estudo. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas duas linhas de controles contendo  $10^5$  e  $10^6$  bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de  $10^5$  células; 2 equivaleu a  $10^5$  células; 3 entre  $10^5$  e  $10^6$  células; 4 a aproximadamente  $10^6$  células e 5 equivaleu a mais de  $10^6$  células (**Tabela 2**). Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas.

**Tabela 2.** Índice utilizado para a determinação dos níveis dos micro-organismos nas amostras de biofilme.

ÍNDICE	NÍVEL DO MICRORGANISMO	CONTAGEM
0	Não detectado	0
1	Menos de $10^5$ células	10.000
2	Aproximadamente $10^5$ células	100.000
3	Entre $10^5$ e $10^6$ células	500.000
4	Aproximadamente $10^6$ células	1.000.000
5	Mais de $10^6$ células	10.000.000

### 3.14 Processamento histológico

As hemi-mandíbulas esquerdas foram dissecadas, fixadas em formol neutro a 10% por 48 horas e descalcificadas por meio de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético a 4% durante 90 dias. Após este período, as peças foram desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados, então, cortes seriados com 4  $\mu$ m de espessura, no plano mésio-distal. Os cortes obtidos foram destinados as análises histopatológicas e histomorfométricas.

### 3.15 Análises histopatológica e histomorfométrica dos tecidos periodontais

Dois cortes histológicos de cada espécime, representando a porção vestibulo-lingual central da hemi-mandíbula, foram corados utilizando a técnica Hematoxilina e Eosina (h&e). Com auxílio de microscopia de luz, foram analisadas as condições histopatológicas dos tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º molar inferior, considerado o conteúdo do infiltrado inflamatório periodontal, extensão da inflamação, padrão do tecido conjuntivo e perfil do osso alveolar presente.

Para análise histomorfométrica, as imagens dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico. Mensurações padronizadas foram determinadas com o auxílio de um sistema de imagens digitalizadas e *software* específico (*ImageLab* 2000, Diracon Bio Informaticam Ltda, Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) por um examinador calibrado, sem identificação dos grupos experimentais avaliados. 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 mm a distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a inserção conjuntiva. Para cada animal, foi obtida uma média dos valores dos dois cortes analisados.

### 3.16 Análise histomorfométrica dos tecidos intestinais

Após processamento laboratorial de rotina, foram obtidos cortes seriados (6 µm de espessura) seguindo os critérios propostos por Messoria et al., (2013). Dois cortes histológicos foram selecionados para as análises histológicas e histométricas e avaliados por examinadores calibrados, que desconheciam os grupos experimentais. Os tecidos intestinais do duodeno e jejuno foram analisados de acordo com os seguintes parâmetros: grau de inflamação, padrão de celularidade e estruturação tecidual. As seguintes mensurações foram realizadas usando o *software Image J* (Rasband, WS, EUA): 1) Altura de vilosidades (AV) – distância vertical do topo da vilosidade a junção vilosidade-cripta em 10 vilosidades por corte; 2) Profundidade de cripta (PC) – distância vertical da junção cripta-vilosidade ao limite mais inferior da cripta em 10 criptas por corte.

### 3.17 Análises histopatológica e histomorfométrica dos tecidos renais

O tecido da metade sagital do rim contendo a porção medular e córtex foi fixado em formol tamponado a 10% e processado. Após desidratação em concentrações crescentes de álcool e imersão em xilol, os espécimes foram incluídos em parafina. Os cortes seriados de 5 micrômetros (µm) de espessura foram corados com H&E.

A análise histopatológica foi realizada por um Especialista em Histologia Veterinária (JSAME) cego aos grupos experimentais e expressa em formato de laudo. Os parâmetros avaliados foram: grau de inflamação, padrão de celularidade, conteúdo do infiltrado inflamatório intratubular e estruturação tecidual renal.

A histomorfometria foi realizada por um examinador cego (PHFS) e previamente calibrado para os seguintes parâmetros: 1) Espaço da cápsula de Bowman, 2) Circunferência da cápsula de Bowman, 3) Circunferência glomerular, 4) Diâmetro glomerular.

#### 3.17.1 Medição da circunferência glomerular e da cápsula de Bowman

Depois que as fotomicrografias representativas (com ampliação de 100×) foram importadas para o software *Image J*, foi realizado um traçado a mão livre (“ferramenta linha livre”) das circunferências do glomérulo e da cápsula de Bowman. Os valores obtidos foram registrados em µm, tanto para o glomérulo quanto para a cápsula de Bowman, dependendo da estrutura selecionada.

### 3.17.2 Medição do espaço da cápsula de Bowman

A diferença entre a circunferência capsular de Bowman e a circunferência glomerular, gerada pelo *Image J*, foi considerada a medida do espaço capsular de Bowman. Esta é a distância real entre a cápsula de Bowman e o início do glomérulo embutido, conforme revelado pelas fotomicrografias representativas. Os valores obtidos foram registrados e expressos em  $\mu\text{m}$ .

### 3.17.3 Medição dos diâmetros capsulares e glomerulares de Bowman

O diâmetro foi tomado como uma medida da espessura da área de interesse. Isso envolveu as três etapas a seguir:

1. Usando a “ferramenta retângulo”, um retângulo foi traçado ao redor da área de interesse de forma que as bordas da área sob exame estivessem dentro e em contato com as bordas do retângulo;
2. Uma linha vertical e uma horizontal foram desenhadas dentro do retângulo do passo 1 acima usando a “ferramenta linha” do *Image J*. Essas linhas foram feitas de modo que cada uma se originasse e terminasse em um dos quatro lados do retângulo, de modo que uma cruz fosse formada dentro de cada retângulo.
3. Os valores de ambas as linhas (formando a cruz dentro do retângulo) foram registrados como expressos em  $\mu\text{m}$  e a média foi tomada como o diâmetro/espessura de cada área sob exame.

## 3.18 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT) das mandíbulas

Espécimes não desmineralizadas foram escaneados por um sistema de micro-CT de feixe cônico *Skyscan 1174* (Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raio-X foi operado com um potencial de aceleração de 60 kV, corrente de 165  $\mu\text{A}$  e tempo de exposição de 650 ms por projeção. As imagens foram produzidas com um tamanho de *voxel* de 6x6x6  $\mu\text{m}$ .

Usando um *software* apropriado (*Data Viewer*<sup>®</sup>, versão 1.5.0, Bruker, Kontich, Bélgica), os 3 modelos tridimensionais gerados foram rotacionados em uma posição padrão, com os seguintes critérios: (1) no plano transaxial, o 1º molar inferior teve o seu eixo em posição vertical, (2) no plano coronal, o osso mandibular foi verticalmente orientado, com a raiz mesial do 1º molar inferior na posição superior da imagem, e (3) no plano sagital, a superfície oclusal do 1º molar inferior foi horizontalmente posicionada. Medidas lineares foram

realizadas em quatro locais diferentes por um examinador calibrado (Renê Oliezer, FORP/USP) sem identificação dos grupos experimentais avaliados: vestibular, lingual, interproximais e bifurcação. Para sítios vestibulares, linguais e interproximais, foram mensuradas as distâncias lineares ( $\mu\text{m}$ ) da JCE à crista óssea alveolar (COA) como descrito por Lisboa et al., 2015). Para os sítios interproximais, os dados foram analisados utilizando *software CT-Analyser*<sup>®</sup> (CT-Analyser<sup>®</sup>, versão 1.13.5.1+, Bruker, Kontich, Bélgica). Na região de bifurcação, foi mensurada a distância ( $\mu\text{m}$ ) entre o centro do teto da bifurcação e a COA. As quatro medidas lineares obtidas em cada animal foram somadas para expressar o valor do nível ósseo alveolar.

As análises volumétricas foram realizadas com *software CT-Analyser*<sup>®</sup> na região de bifurcação do 1º molar inferior. As imagens foram visualizadas no eixo coronal e o intervalo de cortes analisados seguiu os seguintes parâmetros: 1) utilizou-se como ponto de partida para a análise o corte microtomográfico no qual as quatro raízes do 1º molar inferior estavam completamente separadas; 2) o corte microtomográfico final foi determinado como aquele em que não era possível observar mais o osso inter-radicular na região de bifurcação do 1º molar inferior. O retângulo foi a figura geométrica escolhida para representar a região medida e posterior determinação do volume de interesse (VOI). Em seguida, procedeu-se a binarização da imagem para a separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (limite inferior – 65 e limite superior – 255; *grayscale threshold* 0-255). Este padrão de binarização foi usado para todas as amostras. Os seguintes parâmetros foram determinados na análise volumétrica: a) VO: percentual do VOI preenchido com tecido ósseo; b) Porosidade óssea (PO): percentual de porosidades presentes no tecido ósseo determinado no VOI; c) Número de trabéculas (Tb.N): número ( $\text{mm}^{-1}$ ) de trabéculas ósseas presentes no VOI; d) Espaçamento trabecular (Tb.Sp): total de espaços (mm) entre as trabéculas ósseas presentes no VOI.

Reconstruções renderizadas das seções microtomográficas foram também obtidas para os grupos C, PROB, DP e DPxPROB utilizando o *software CTVox*<sup>®</sup> (CTVox<sup>®</sup>, versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica).

### **3.19 Determinação da expressão de metaloproteinase (MMP)-2 e 9 por zimografia em gel no soro e placentas**

As quantidades de MMP-2 e 9 na placenta e soro dos animais foram determinadas por meio da técnica de zimografia. As amostras dos tecidos foram trituradas, pesadas e colocadas

em tubos Eppendorf. Nesses tubos, foram adicionados 50  $\mu$ L de tampão de extração (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7,4, 1 mmol/L 1,10 fenantrolina, 1 mmol/L fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), 1 mmol/L N-etilmaleimida (NEM), e 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>) para cada 10 mg de tecido. Em seguida os tubos Eppendorf foram agitados e levados para o freezer para melhorar a extração de proteínas. Posteriormente, foram centrifugados a 4°C em 12.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e diluído em água 1:10 para a dosagem de proteínas pelo método de *Bradford*.

Em placas Elisa foram aplicadas em duplicata, 5  $\mu$ L do branco, dos 5 pontos da curva e das amostras. Em seguida foram adicionados em todos os poços da placa, 250  $\mu$ L de Bradford e feito a leitura no aparelho. No programa Excel, foram calculados os respectivos volumes a serem aplicados no gel.

As amostras foram diluídas no tampão de amostra (1:1, SDS 2%, Tris- HCl 125mM, glicerol 10% e azul de bromofenol) para a aplicação no gel de eletroforese contendo gelatina 1%. Após preparadas, as amostras foram separadas por meio de eletroforese, em um sistema descontínuo de tampões, utilizando géis de poliacrilamida na concentração de 12%. Após eletroforese, esses géis foram submetidos a 2 banhos de Triton X-100, para remover o SDS e colocados em tampão de ativação (Tris-HCl 50 mM e 10 mM de cálcio) por 18 horas. Posteriormente, foram corados com solução *Coommassie Blue*, descorados com solução descorante e fotografados. Com auxílio do programa *Image J*, as bandas encontradas nos géis referentes a MMP-2 e 9 foram quantificadas. As formas latentes e ativas da MMP-2 e 9 foram identificadas por meio dos pesos moleculares: 75 kDa, 72 kDa e 64 kDa, respectivamente.

### 3.20 Variáveis de resultado

Foi definida como variável primária deste estudo as diferenças entre os grupos obtidas na análise microtomográfica de VO. Os demais parâmetros microtomográficos (NOA, PO, Tb.N, Tb.Sp), microbiológicos, histopatológicos, histomorfométricos, imunológicos e bioquímicos analisados foram definidos como variáveis secundárias.

### 3.21 Análise estatística

As análises foram realizadas com o software *Graphpad Statemate Prism 9.0*. O animal foi considerado como unidade estatística (n=48). Foi adotado nível de significância estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os dados foram agrupados e apresentados como médias e desvios-padrão (variáveis contínuas) ou medianas, desvios interquartílicos e valores máximos e mínimos



(valores ordinais). 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.

As análises microbiológicas, histomorfométricas, imunológicas, microtomográficas e bioquímicas foram realizadas por examinadores calibrados previamente. Os coeficientes de valores intraclasse maiores que 90% foram considerados para assegurar a calibração dos examinadores. As análises histopatológicas dos tecidos periodontais e renais foram realizadas por examinadores cegos aos grupos experimentais (PHFS e JSAME).

A significância das diferenças entre os grupos para os parâmetros analisados de peso materno, peso dos fetos, peso das placentas, quantidade de fetos, nitrito plasmático, profundidade de criptas duodenais, altura de vilosidades jejunais, foi determinada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Para análise do *checkerboard DNA-DNA hybridization*, PA invasiva, proteinúria, creatinina na urina, relação proteinúria/creatinina na urina, nitrato plasmático, profundidade de criptas jejunais, altura de vilosidades duodenais, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. As diferenças intergrupos foram analisadas pelo teste t.

---

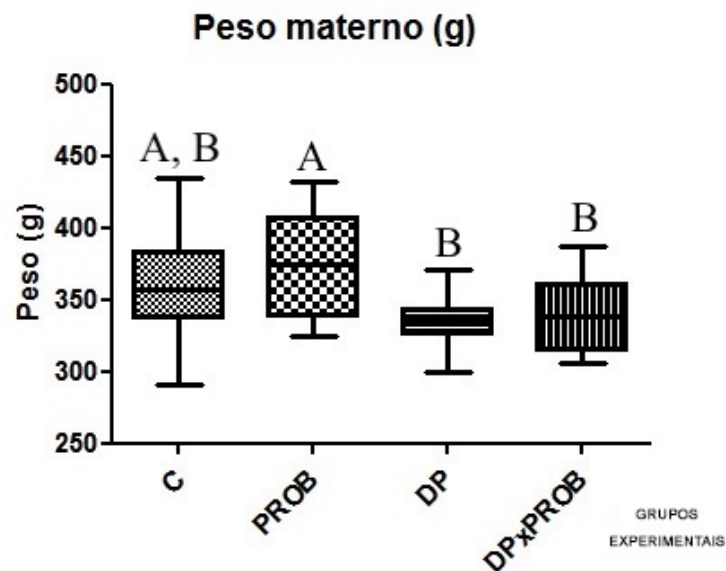
# Resultados

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Peso materno, peso e quantidade dos fetos e peso das placentas

#### 4.1.1 Peso materno antes da eutanásia

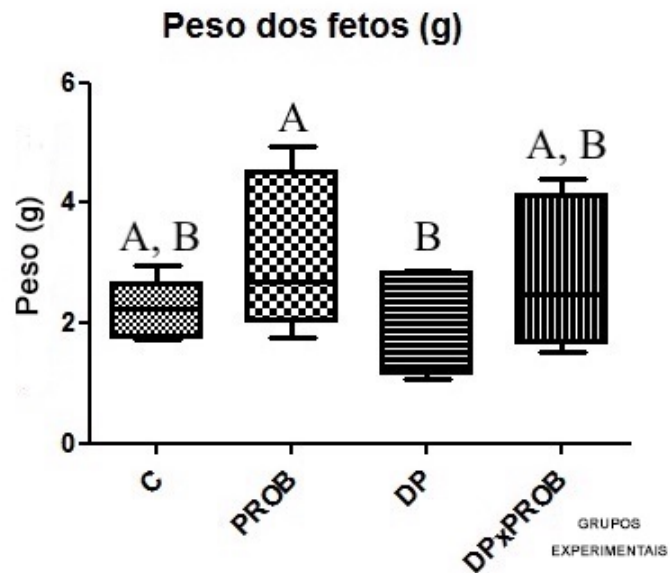
As médias de peso materno, em gramas, de cada grupo no início do experimento foram: C = 193,0g; PROB = 213,5g; DP = 190,8g; DPxPROB = 213,0g. No dia da eutanásia, foram realizadas novas pesagens. As médias de peso materno foram: C = 359,5g; PROB = 374,8g; DP = 332,5g; DPxPROB = 374,8g. A **Figura 3** apresenta as medianas e desvio interquartil de peso materno/grupo. O grupo DP apresentou menores valores de peso em comparação ao grupo PROB ( $p < 0,05$ ). O grupo DPxPROB também mostrou redução de peso materno estatisticamente significativa, comparado ao grupo PROB.



**Figura 3** – Peso materno antes da eutanásia em gramas. Letras diferentes significam diferença estatística.

#### 4.1.2 Peso dos fetos

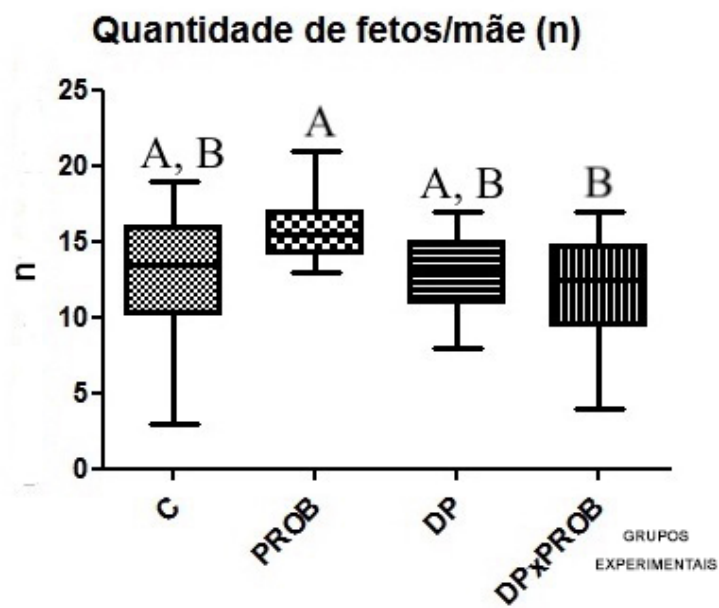
A **Figura 4** apresenta as medianas e desvio interquartil de peso da ninhada/grupo. O grupo DP mostrou redução estatisticamente significativa no peso dos fetos em comparação ao grupo PROB ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4** – Peso dos fetos por grupo em gramas (g). Letras diferentes significam diferença estatística.

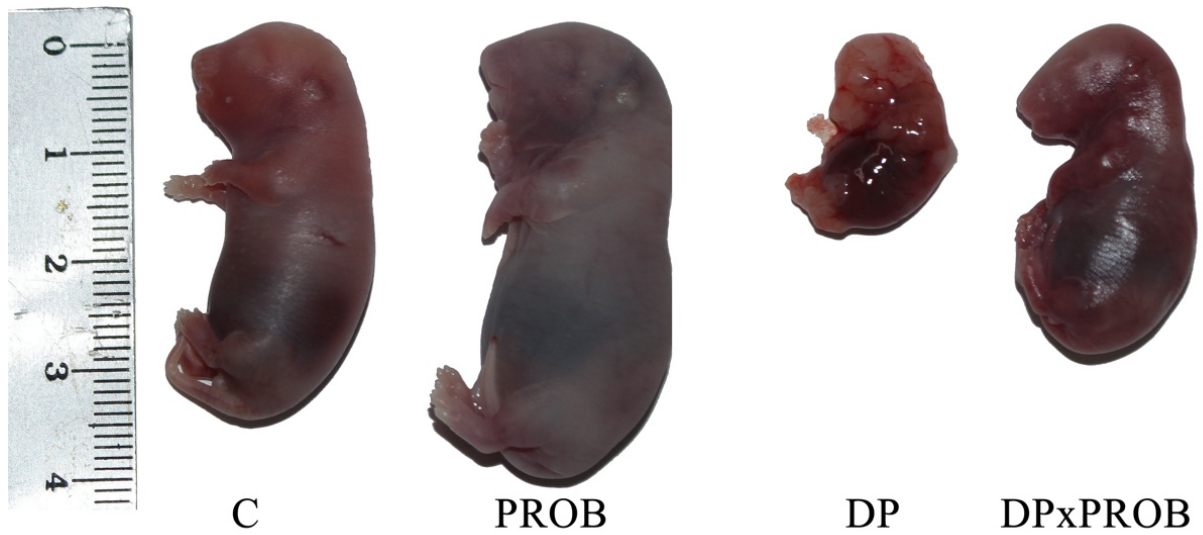
#### 4.1.3 Quantidade de fetos por animal

Foi contabilizado o tamanho da ninhada por mãe. A **Figura 5** representa um comparativo entre as medianas e desvio interquartil da quantidade de fetos por mãe. O grupo DPxPROB mostrou quantidade de fetos significativamente menor do que o grupo PROB ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5** – Quantidade de fetos/mãe em números (n). Letras diferentes significam diferença estatística.

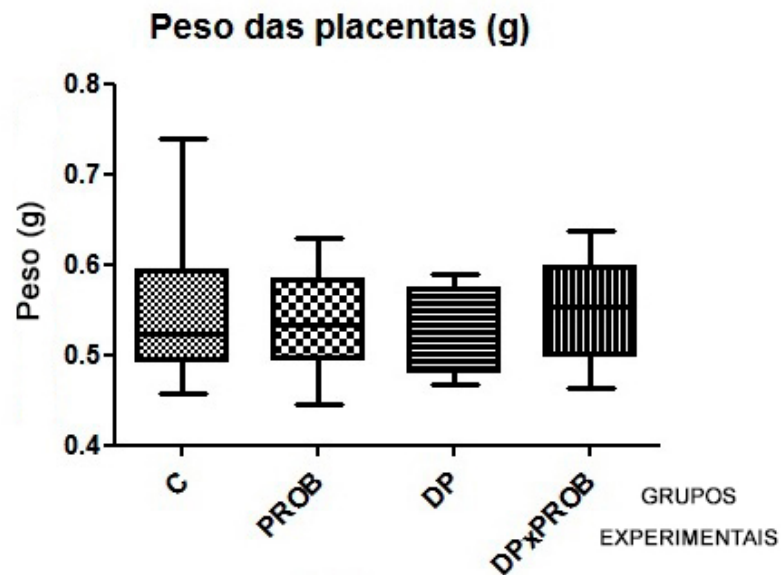
A **Figura 6** representa um comparativo entre o tamanho dos fetos, em centímetros (cm), em que é possível observar a redução do tamanho fetal no grupo DP.



**Figura 6** – Comparativo de tamanho entre os fetos em centímetros.

#### 4.1.4 Peso das placentas

A **Figura 7** apresenta as medianas e desvio interquartil de peso das placentas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p>0,05$ ).



**Figura 7** – Peso das placentas em gramas (g)

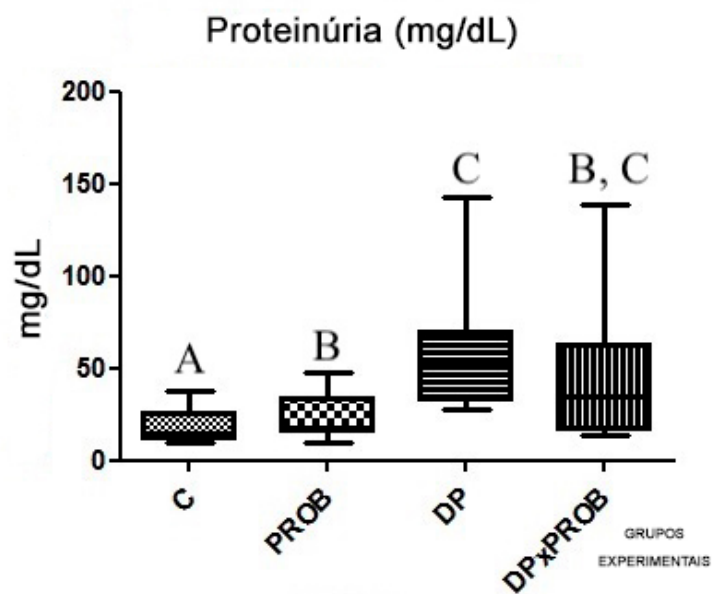
A **Figura 8** representa um comparativo entre o tamanho das placentas, em cm.



**Figura 8** – Comparativo de tamanho entre as placentas em centímetros.

## 4.2 Proteinúria

A **Figura 9** representa as medianas e desvio interquartil em mg/dL. O grupo DP mostrou aumento estatisticamente significativo da concentração de proteínas, quando comparado ao grupo C e PROB ( $p < 0,05$ ).

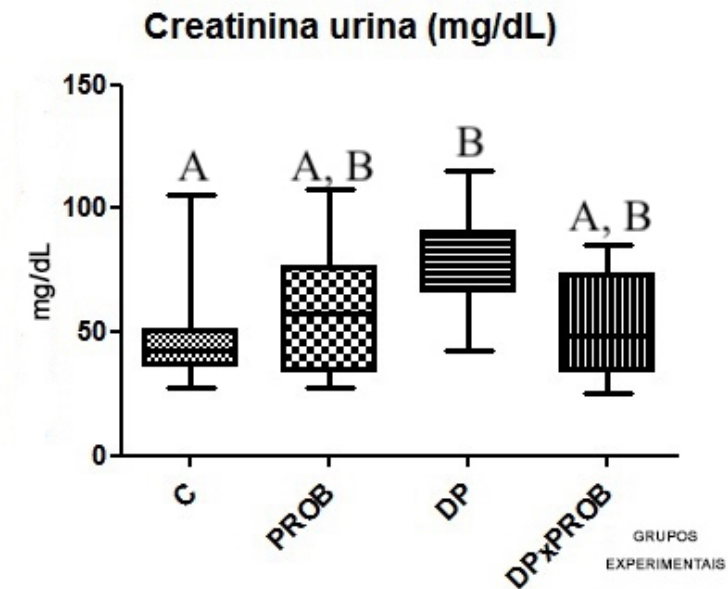


**Figura 9** – Proteinúria em mg/dL. Letras diferentes significam diferença estatística.



### 4.3 Creatinina na urina

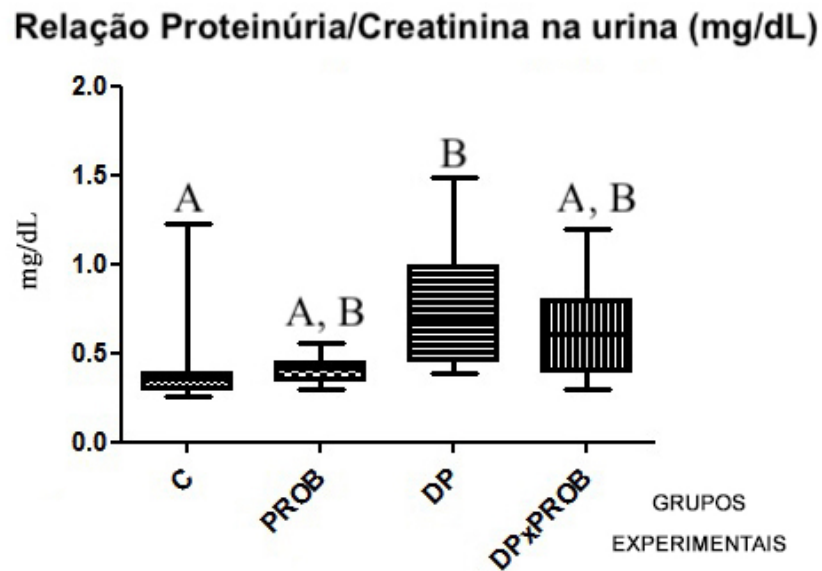
A **Figura 10** apresenta as medianas e desvio interquartil de creatinina na urina em mg/dL. O grupo DP mostrou aumento estatisticamente significativo da expressão de creatinina na urina comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10** – Creatinina na urina em mg/dL. Letras diferentes significam diferença estatística

#### 4.4 Relação proteinúria/creatinina na urina

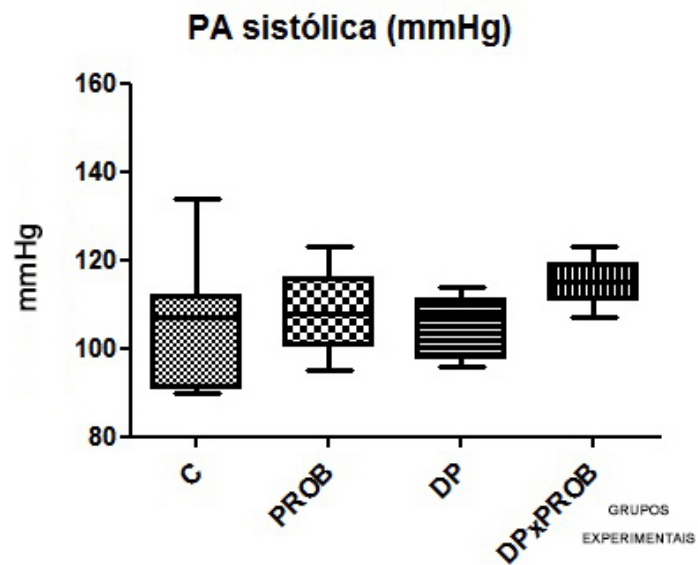
Foi realizada a relação proteinúria/creatinina na urina. A **Figura 11** mostra as medianas e desvio interquartil em mg/dL. O grupo DP mostrou aumento estatisticamente significativo da relação proteinúria/creatinina na urina comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11** – Relação proteinúria/creatinina na urina em mg/dL. Letras diferentes significam diferença estatística.

#### 4.5 Pressão arterial sistólica invasiva

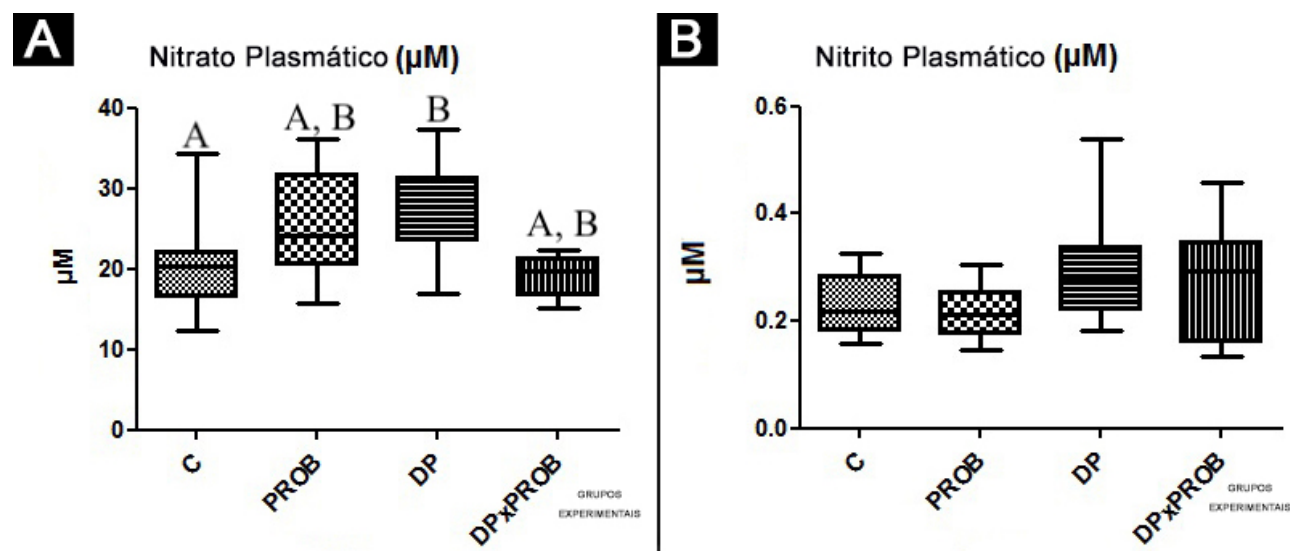
Foi realizada a aferição da pressão arterial (PA) invasiva antes da eutanásia. A **Figura 12** mostra as medianas e desvio interquartil da PA em mmHg por grupo. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).



**Figura 12** – PA sistólica por grupo em mmHg.

#### 4.6 Nitrato e nitrito plasmático

Foi realizada a dosagem de nitrato e nitrito plasmático em  $\mu\text{M}$ . A **Figura 13A** mostra as medianas e desvio interquartil de nitrato plasmático por grupo. O grupo DP mostrou aumento estatisticamente significativo de nitrato plasmático comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ). A **Figura 13B** mostra as medianas e desvio interquartil de nitrito plasmático por grupo. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

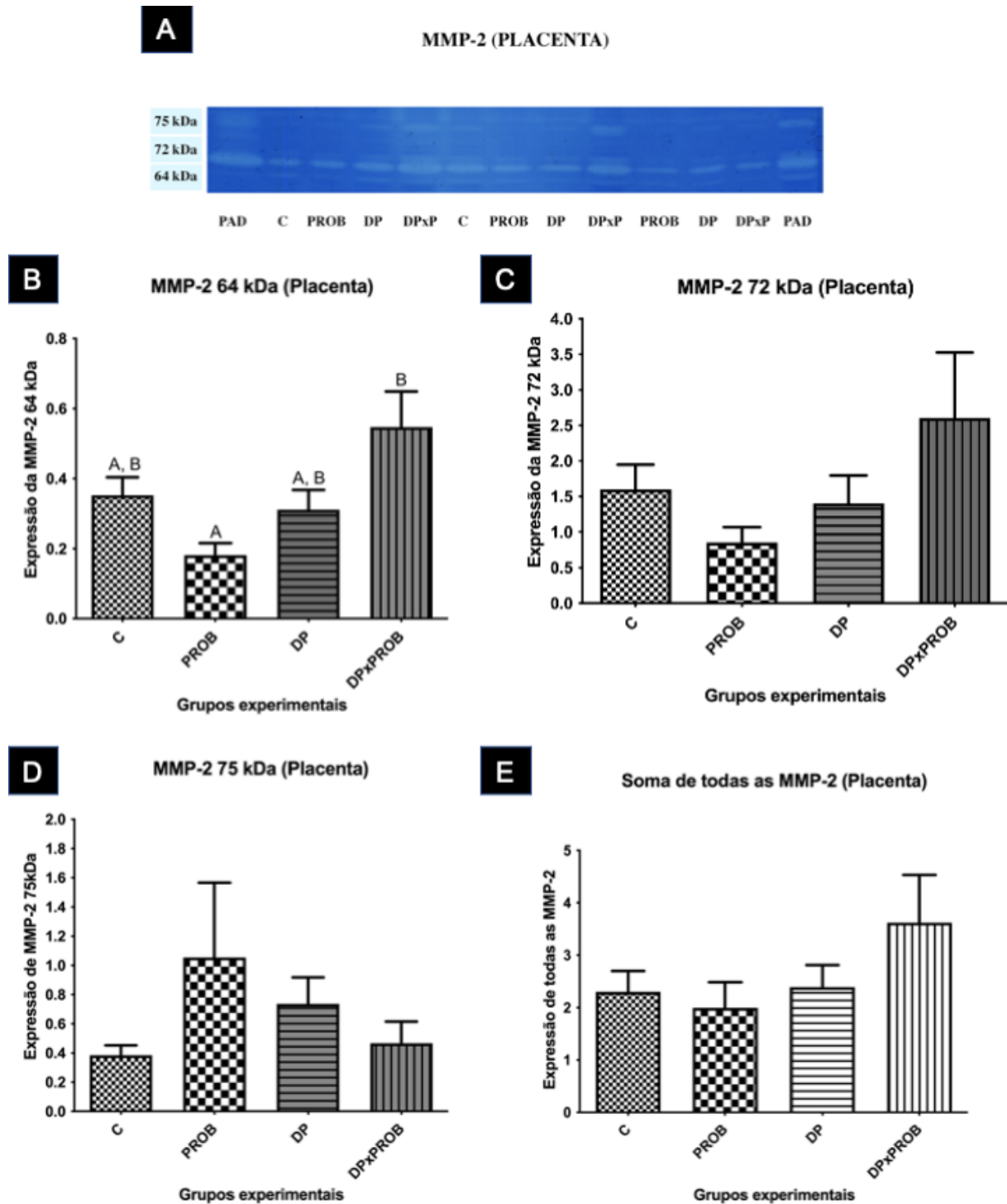


**Figura 13 (A)** – Nitrito no plasmático em  $\mu\text{M}$ . Letras diferentes significam diferença estatística. **(B)** Nitrito plasmático em  $\mu\text{M}$ .

#### 4.7 Expressão de MMPs na placenta e no soro

##### 4.7.1 MMP-2 na placenta

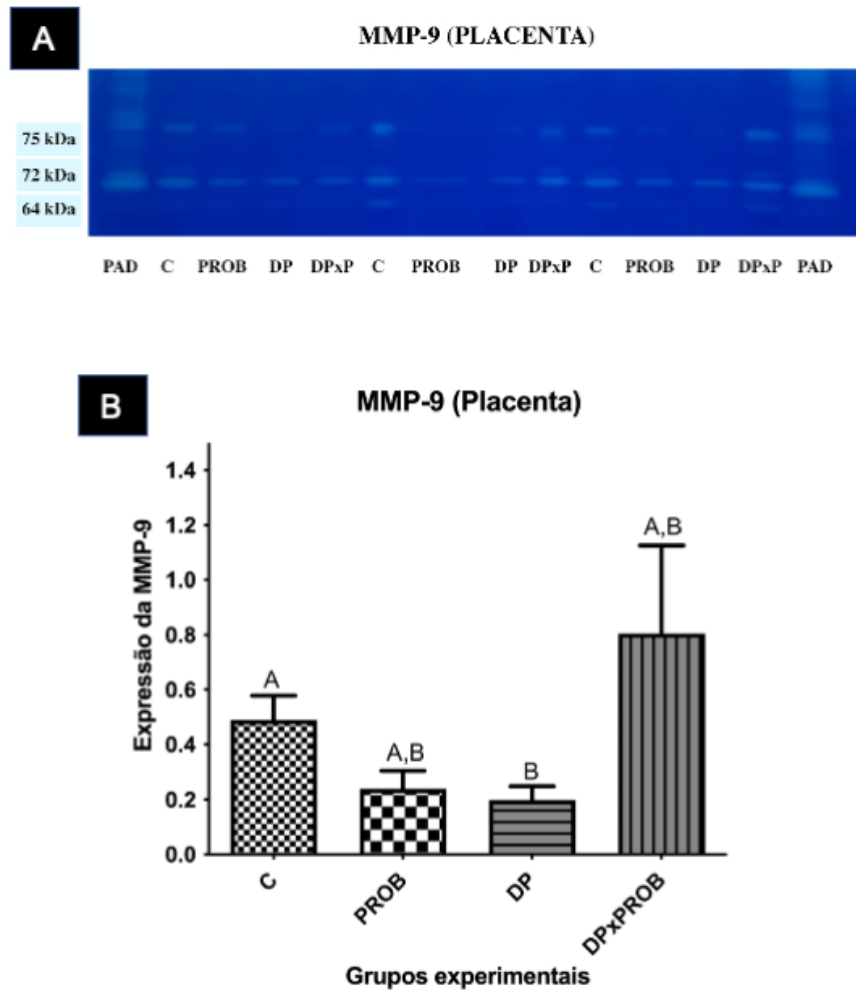
Foram detectadas três bandas de MMP-2 (64 kDa, 72 kDa e 75kDa) nas placentas (**Figura 14A**). As figuras 14B, 14C, 14D e 14E mostram as medianas e desvio interquartil entre os grupos da expressão de MMP-2 na placenta. O grupo DPxPROB mostrou aumento estatisticamente significativo na expressão de MMP-2 64 kDa na placenta comparado ao grupo PROB (**Figura 14B**) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos quanto a expressão de MMP-2 72 kDa (**Figura 14C**) e MMP-2 75kDa (**Figura 14D**) e soma de todas as MMP-2 na placenta (**Figura 14E**) ( $p > 0,05$ ).



**Figura 14** – Expressão de MMP-2 na placenta – (A) Gel representativo de zimografia mostrando a atividade gelatinolítica da MMP-2 de diferentes pesos moleculares. (B) Expressão da MMP-2 de peso molecular 64 kDa na placenta. (C) Expressão da MMP-2 de peso molecular 72 kDa na placenta. (D) Expressão da MMP-2 de peso molecular 75 kDa na placenta. (E) Soma da expressão de todas as MMP-2 na placenta. MMP-2 = Metaloproteinase – 2; kDa = Kilo Dalton; PAD = Padrão. Letras diferentes significam diferença estatística.

#### 4.7.2 MMP-9 na placenta

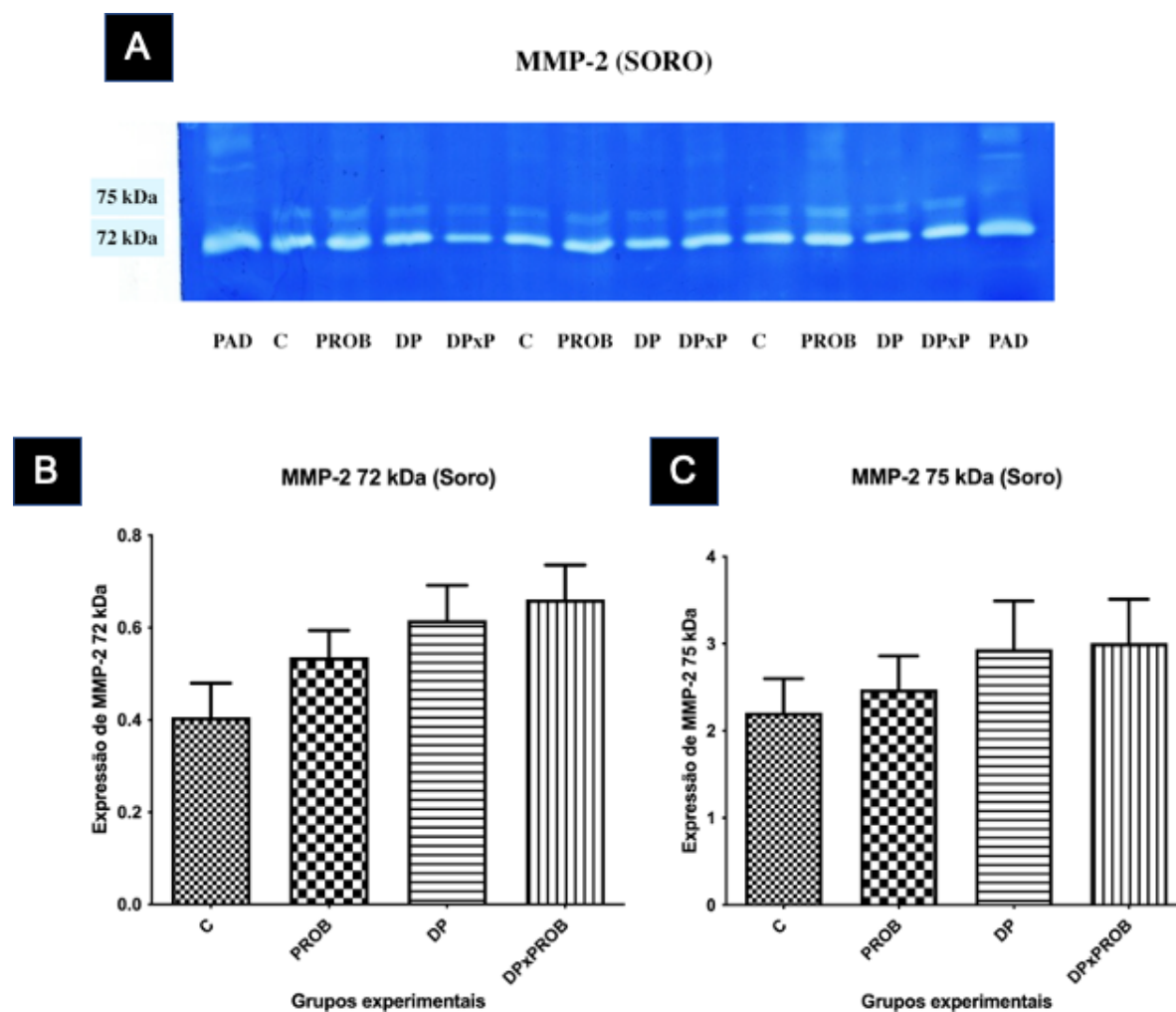
Foram detectadas três bandas de MMP-9 (64 kDa, 72 kDa e 75kDa) nas placentas (**Figura 15A**). A Figura 15B mostra as medianas e desvio interquartil da expressão de MMP-9 na placenta entre os grupos. O grupo C mostrou aumento estatisticamente significativo na expressão de MMP-9 na placenta comparado ao grupo DP (**Figura 15B**) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15** – Expressão de MMP-9 na placenta – (A) Gel representativo de zimografia mostrando a atividade gelatinolítica da MMP-9 de diferentes pesos moleculares. (B) Expressão da MMP-9 na placenta. MMP-9 = Metaloproteinase – 9; kDa = Kilo Dalton; PAD = Padrão. Letras diferentes significam diferença estatística.

## 4.7.3 MMP-2 no soro

Foram detectadas duas bandas de MMP-2 no soro (**Figura 16A**). As Figuras 16B e 16C mostram as medianas e desvio interquartil da expressão de MMP-2 no soro entre os grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos, quanto a expressão de MMP-2 72 kDa (**Figura 16B**) e MMP-2 75 kDa (**Figura 16C**) ( $p>0,05$ ).



**Figura 16** – Expressão de MMP-2 no soro – (A) Gel representativo de zimografia mostrando a atividade gelatinolítica da MMP-2 de diferentes pesos moleculares no soro. (B) Expressão da MMP-2 de peso molecular 72 kDa no soro. (C) Expressão da MMP-2 de peso molecular 75 kDa no soro. MMP-2 = Metaloproteinase – 2; kDa = Kilo Dalton; PAD = Padrão.

#### 4.8 Análise microbiológica da microbiota oral

Os resultados da avaliação microbiológica estão apresentados na **Figura 17**. A **Figura 17 (A, B, C e D)** apresenta os níveis de 40 espécies semelhantes as espécies bacterianas dos complexos de Socransky et al., (1998), em cada grupo experimental. Nota-se que houve diferença estatística entre espécies bacterianas de todos os complexos ( $p < 0,05$ ). O símbolo \* significa diferença estatística quando comparado ao grupo C; # significa diferença estatística quando comparado ao grupo PROB;  $\Delta$  significa diferença estatística quando comparado ao grupo DP.

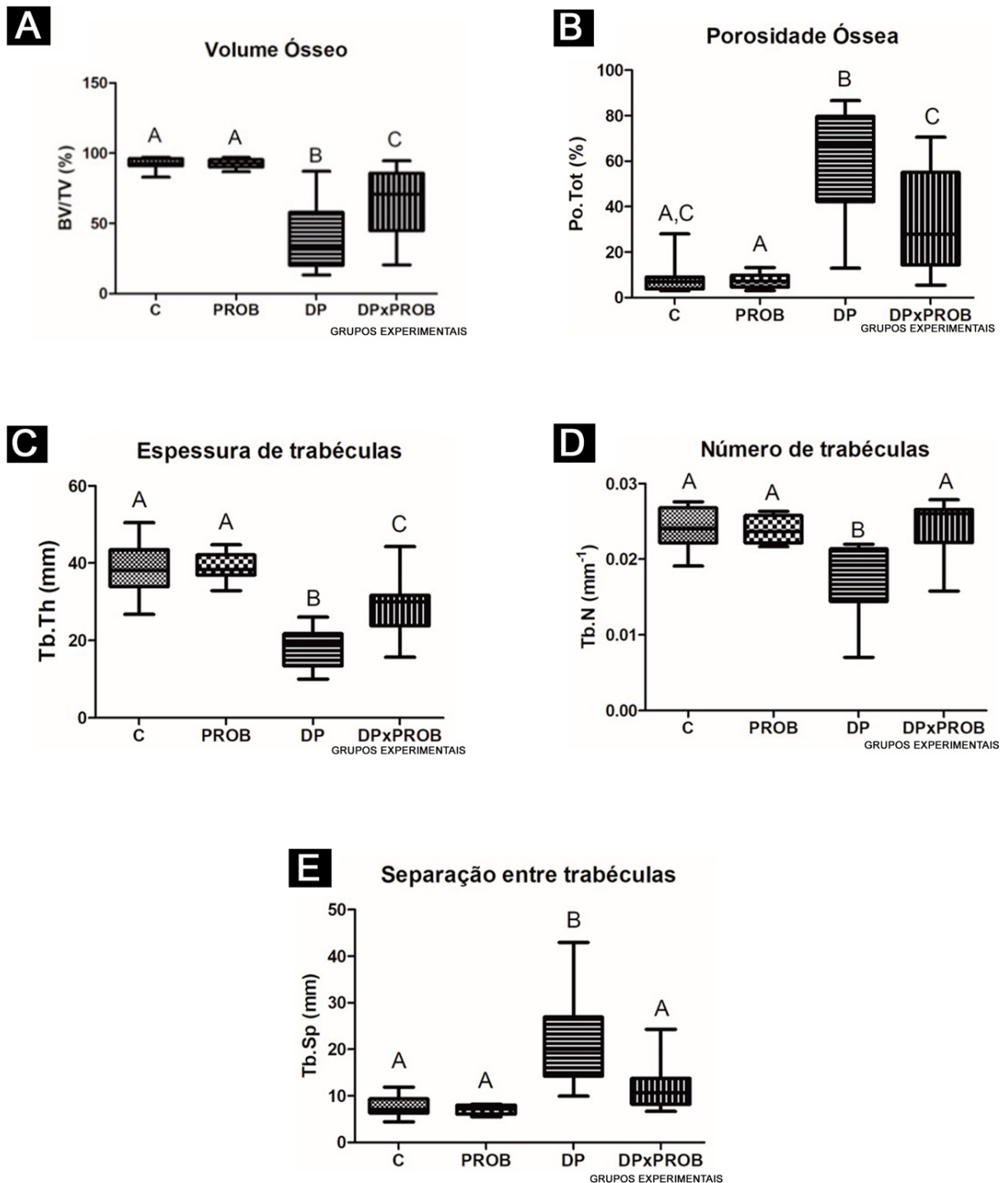




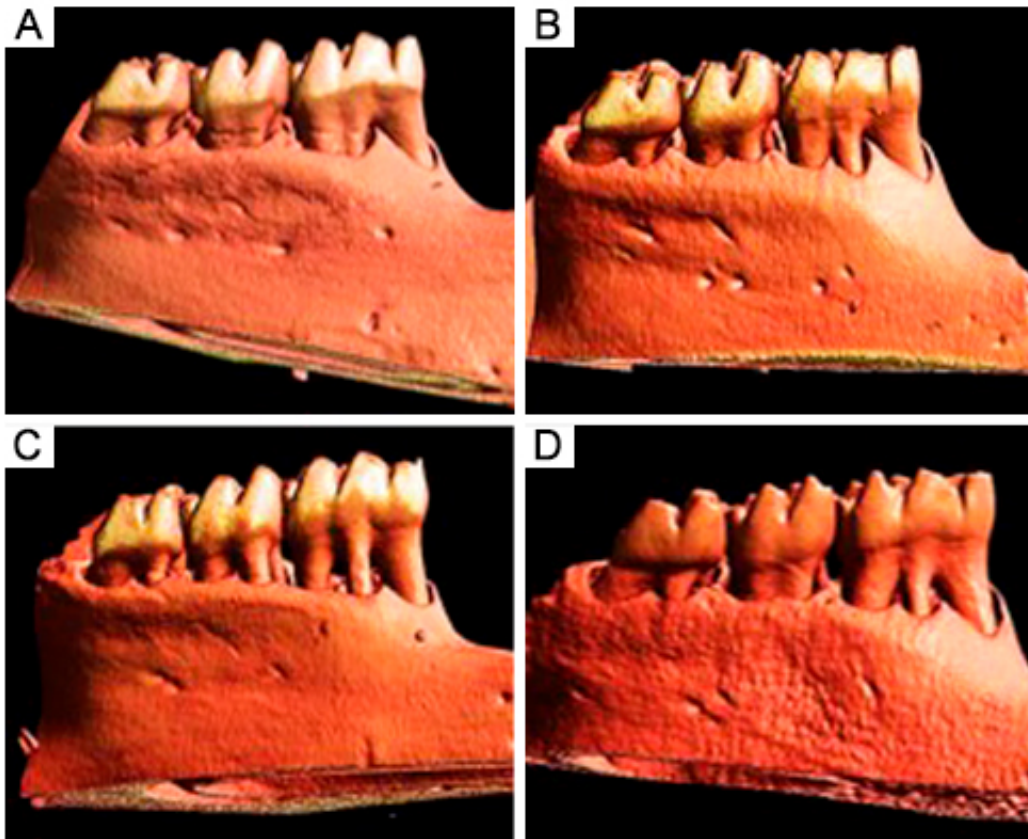
**Figura 17** – Médias da contagem total (x10<sup>5</sup>) de 40 espécies bacterianas presentes nos biofilmes nos animais dos grupos experimentais. (A) Grupo C; (B) Grupo PROB; (C) Grupo DP; (D) Grupo DPxPROB. \* significa diferença estatística quando comparado ao grupo C; # significa diferença estatística quando comparado ao grupo PROB; Δ significa diferença estatística quando comparado ao grupo DP.

#### 4.9 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT) das mandíbulas

Na análise de volume ósseo, os grupos DP e DPxPROB apresentaram valores significativamente menores em relação aos grupos C e PROB ( $p < 0,05$ ). O grupo DP apresentou o menor volume ósseo em relação aos demais grupos (**Figura 18A**) ( $p < 0,05$ ). Considerando a microarquitetura óssea na região de bifurcação do primeiro molar inferior, o grupo DP apresentou maiores valores de porosidade óssea (Po.Tot) (**Figura 18B**) e separação entre trabéculas (Tb.Sp) (**Figura 18C**), bem como menores valores de número de trabéculas (Tb.N) (**Figura 18D**) e espessura de trabéculas (Tb.Th) (**Figura 18E**), quando comparado aos grupos C, PROB e DPxPROB ( $p < 0,05$ ). A **Figura 19** apresenta reconstruções tridimensionais renderizadas elaboradas a partir das secções microtomográficas para os grupos C, PROB, DP e DPxPROB.



**Figura 18** – (A) Medianas e desvio interquartil de volume ósseo; (B) Porosidade óssea; (C) Espessura de trabéculas; (D) Número de trabéculas; (E) Separação entre trabéculas. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. BV/TV = volume ósseo em %; PoTot = porosidade óssea em %; Tb.Th = espessura de trabéculas; Tb.N = número de trabéculas; Tb.Sp = separação entre trabéculas.



**Figura 19** – Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas das ratas dos grupos C (A); PROB (B); DP (C); DPxPROB (D). Vista da superfície vestibular externa. Tamanho do *pixel* = 7,96  $\mu\text{m}$

#### 4.10 Análises histopatológica e histomorfométrica dos tecidos periodontais

##### 4.10.1 Análise histopatológica dos tecidos periodontais

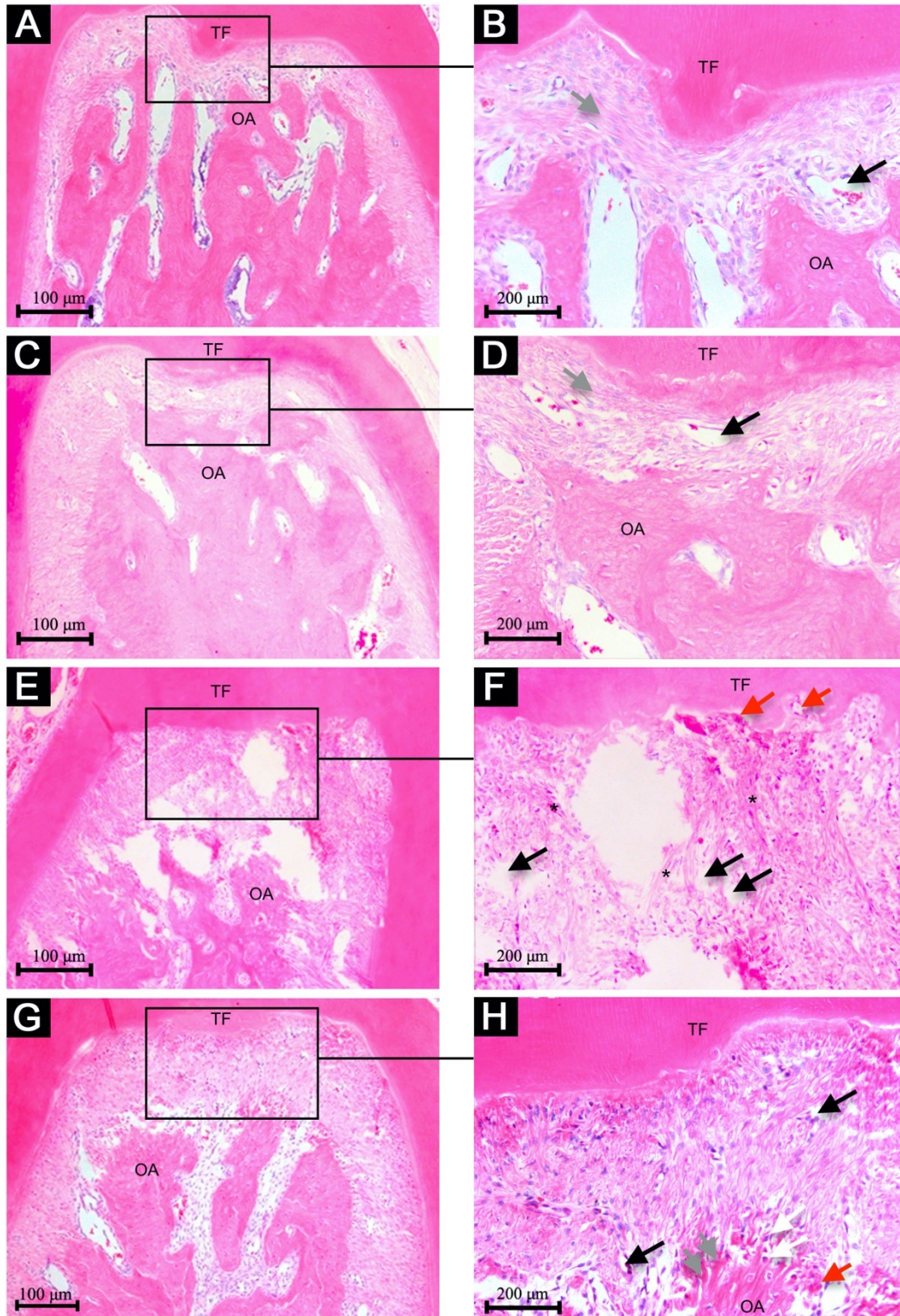
Os grupos C e PROB apresentaram ligamento periodontal dentro dos padrões de normalidade. Pode ser observado fibras colágenas organizadas, grande quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e discreto infiltrado inflamatório (**Figura 20; A-D**). O tecido ósseo na região de bifurcação apresenta grande quantidade de osteócitos, e crista regular com aposição de osteoblastos (**Figura 20; A-D**). A região interproximal, entre o 1º e 2º molar inferior, apresenta integridade do epitélio juncional e sulcular (**Figura 21A e 21B**).

O grupo DP apresentou danos estruturais no ligamento periodontal. Pode ser observado fibras colágenas desorganizadas e desconexas, com a presença de edema intersticial e infiltrado inflamatório. Em algumas regiões, o tecido conjuntivo apresentou intenso infiltrado inflamatório e presença de osteoclastos (**Figura 20E e 20F**). Na região interproximal, entre o

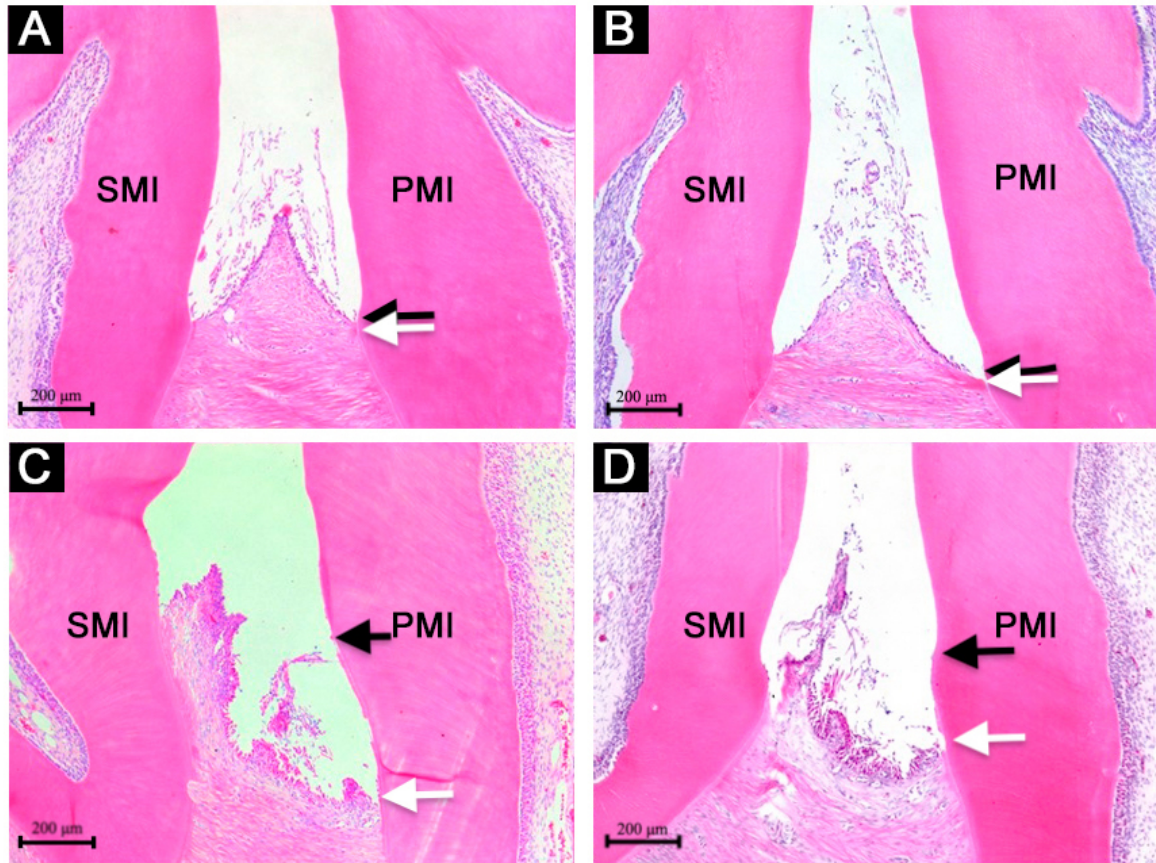
1º e 2º molar inferior, foram observados danos estruturais no epitélio sulcular e migração apical do epitélio juncional em relação a junção cimento-esmalte (**Figura 21C**).

O grupo DPxPROB também apresentou alterações estruturais no ligamento periodontal. Quando comparado ao grupo DP, pode ser observado tecido conjuntivo com maior quantidade de fibroblastos, fibras colágenas mais organizadas e interpostas entre o osso alveolar e o cimento radicular, e presença de osteoclastos (**Figura 20G e 20H**). Na região interproximal, entre o 1º e 2º molar inferior, foram observados menores danos estruturais ao epitélio sulcular e menor deslocamento apical do epitélio juncional em relação a junção cimento-esmalte, quando comparados aos resultados observados no grupo DP (**Figura 21D**).





**Figura 20** – Tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º molar inferior dos grupos C (A, B), PROB (C, D), DP (E, F) e DPxPROB (G, H). Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 10x (A, C, E, G); 20x: (B, D, F, H). TF = teto da furca; OA = osso alveolar; setas pretas = vasos sanguíneos; setas vermelhas = osteoclastos; setas brancas = osteoblastos; setas cinzas (B, D) = fibras colágenas seguindo orientação organizada; setas cinzas (H) = fibras colágenas interpostas entre o osso alveolar e o cimento radicular; \* (asterisco) = fibras colágenas desconexas com presença de edema intersticial.

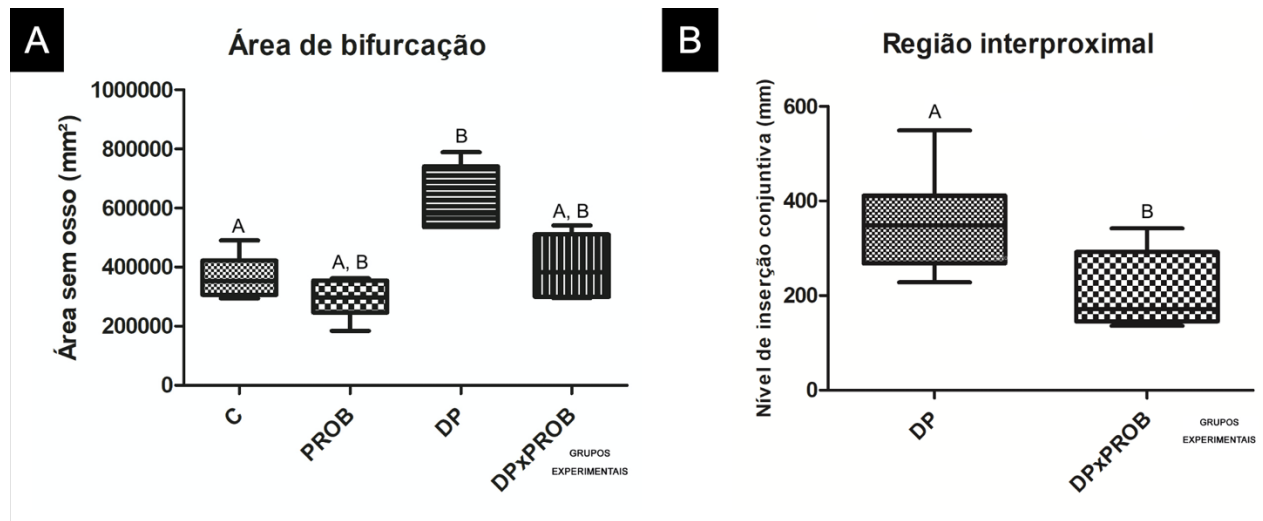


**Figura 21** – Tecidos periodontais na região interproximal entre o 1º e 2º molares inferiores dos grupos C (A), PROB (B), DP (C) e DPxPROB (D). Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 20x. PMI = primeiro molar inferior; SMI = segundo molar inferior; seta preta = junção cimento-esmalte; seta branca = inserção conjuntiva.



#### 4.10.2 Análise histomorfométrica dos tecidos periodontais

A **Figura 22** representa as medianas e desvio interquartil de área de bifurcação e nível de inserção clínica (NIC) em mm. O grupo DP mostrou aumento estatisticamente significativo na área sem osso em região de bifurcação comparado ao grupo C (**Figura 22A**) ( $p < 0,05$ ). Os grupos C e PROB apresentaram NIC = 0mm. O grupo DP apresentou NIC significativamente maior que o grupo DPxPROB (**Figura 22B**) ( $p < 0,05$ ).

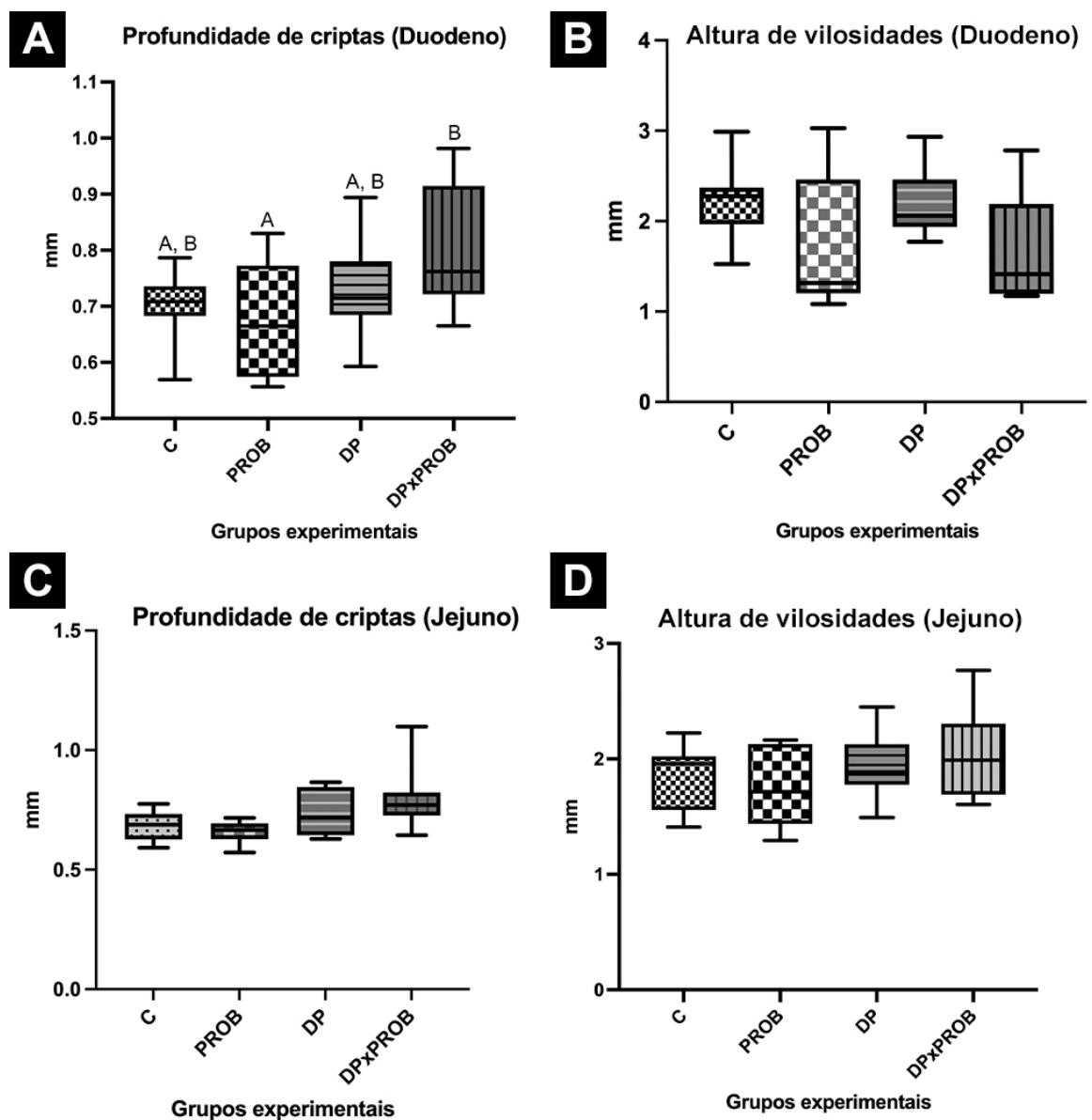


**Figura 22** – Histomorfometria dos tecidos periodontais de todos os grupos. (A) Área de bifurcação em mm<sup>2</sup>; (B) Nível de inserção conjuntiva entre o 1° e 2° molares inferiores entre os grupos DP e DPxPROB. NIC = Nível de inserção clínica. Letras diferentes significam diferença estatística.

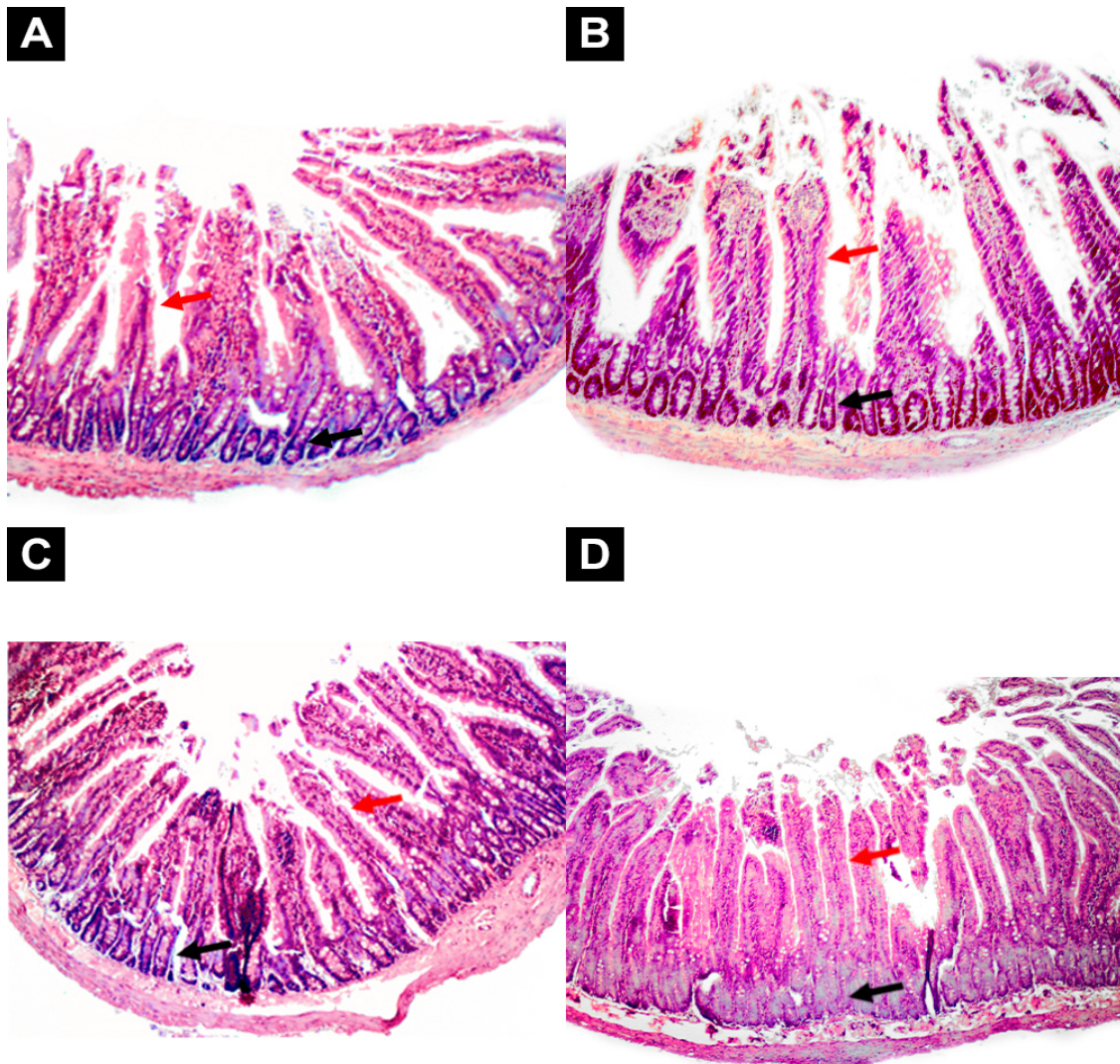


#### 4.11 Análise histomorfométrica dos tecidos intestinais

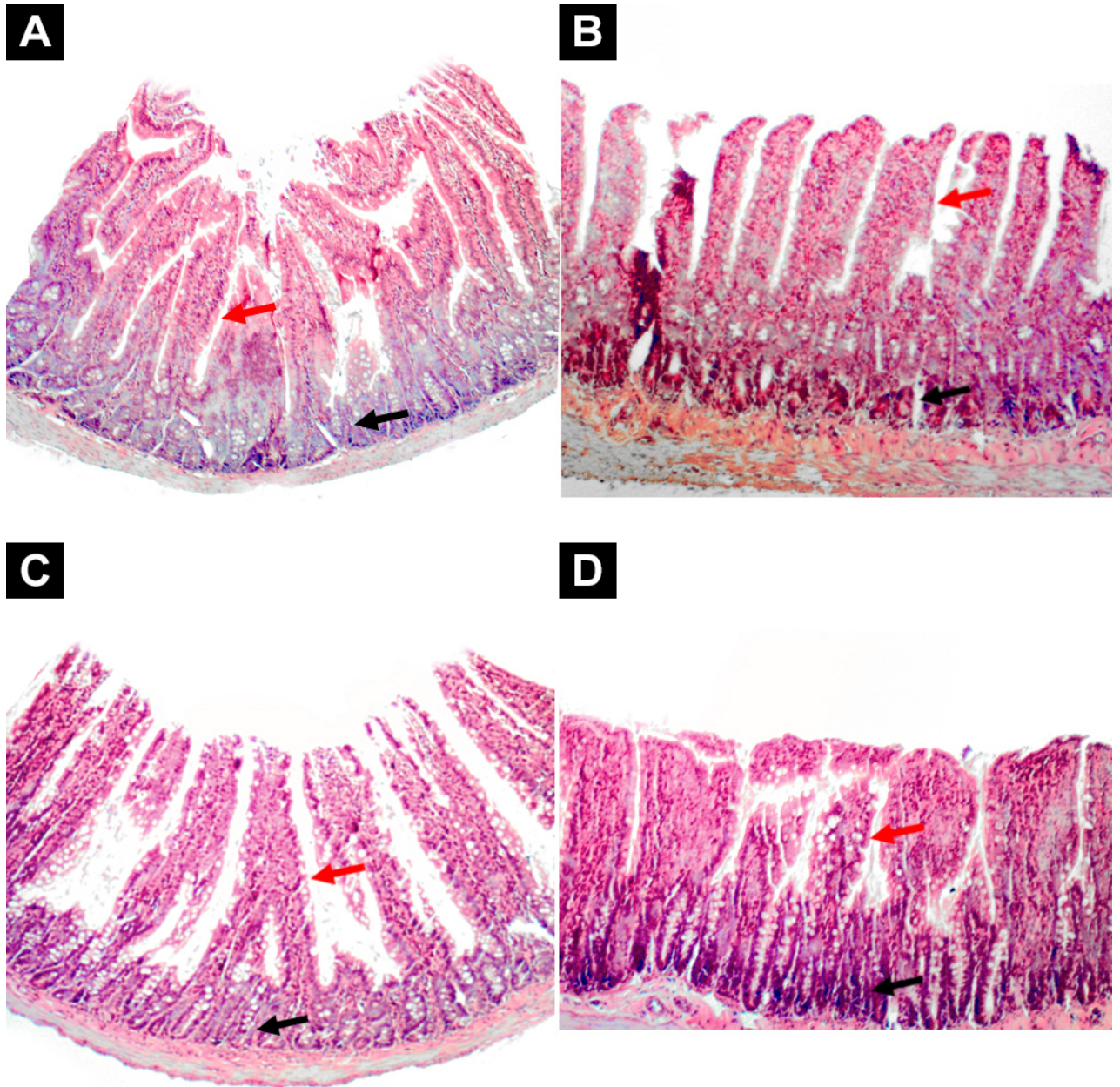
A **Figura 23** representa as medianas e desvio interquartil de profundidade de criptas e altura de vilosidades do duodeno (**23A** e **23B**) e jejuno (**23C** e **23D**) em mm. O grupo DPxPROB mostrou criptas significativamente mais profundas, em relação ao grupo PROB ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística quanto a PC no jejuno e nas AV do duodeno e jejuno ( $p > 0,05$ ). As **Figuras 24 (A, B, C e D)** e **25 (A, B, C e D)** representam a análise histológica dos tecidos duodenais e jejunais, respectivamente.



**Figura 23** – Medianas e desvio interquartil de profundidade de criptas e altura de vilosidades do duodeno e jejuno. (A) Profundidade de criptas do duodeno em mm; (B) Altura de vilosidades do duodeno; (C) Profundidade de criptas do jejuno em mm; (D) Altura de vilosidades do jejuno. Letras diferentes significam diferença estatística.



**Figura 24** – Fotomicrografia representativa do corte duodenal. (A) Corte duodenal do grupo C; (B) Corte duodenal do grupo PROB; (C) Corte duodenal do grupo DP; (D) Corte duodenal do grupo DPxPROB. Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 10x. Seta preta = cripta; seta vermelha = vilosidade.



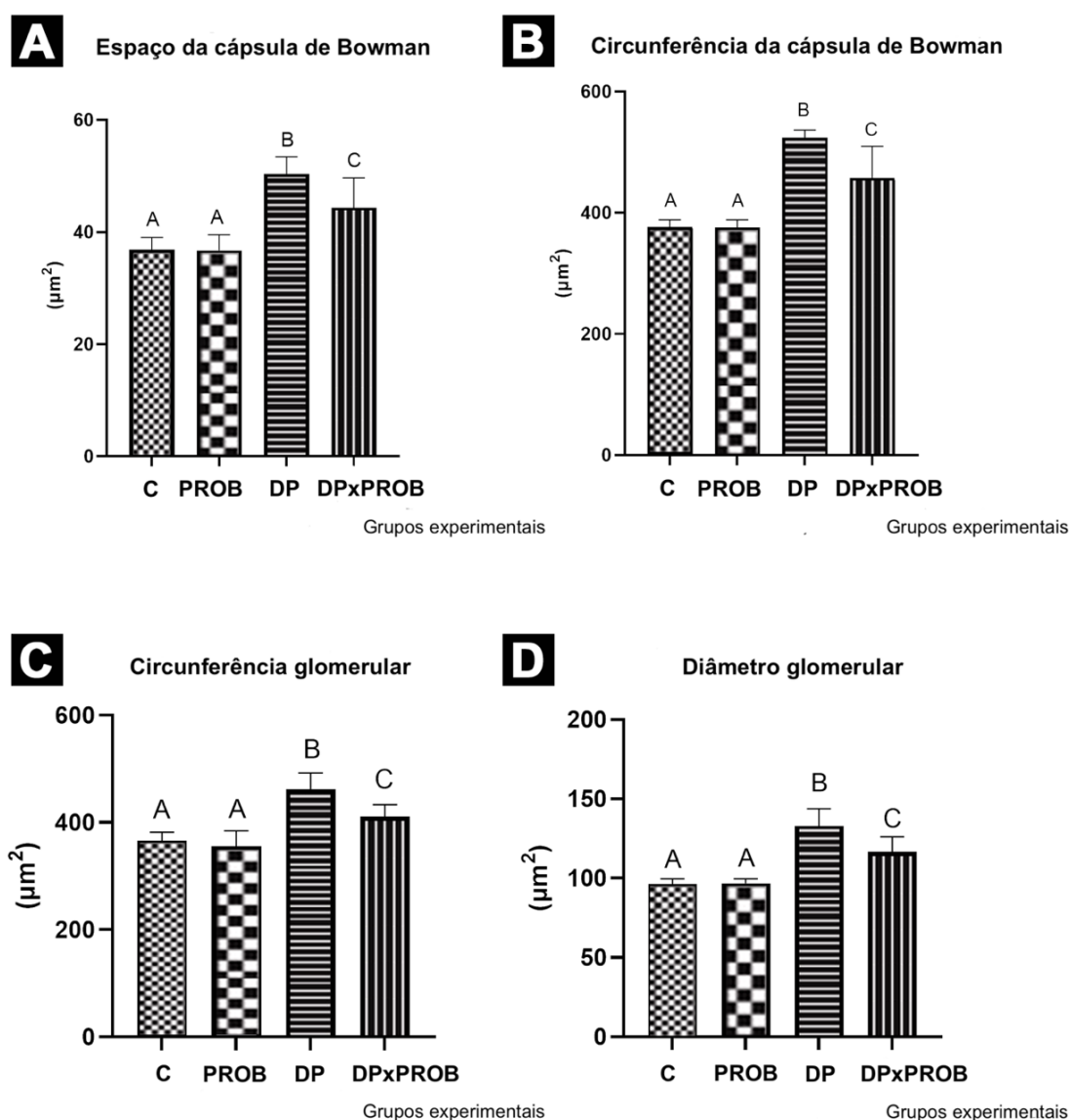
**Figura 25** – Fotomicrografia representativa do corte jejunal. (A) Corte jejunal do grupo C; (B) Corte jejunal do grupo PROB; (C) Corte jejunal do grupo DP; (D) Corte jejunal do grupo DPxPROB. Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 10x. Seta preta = cripta; seta vermelha = vilosidade.



## 4.12 Análises histomorfométrica e histopatológica dos tecidos renais

### 4.12.1 Análise histomorfométrica dos tecidos renais

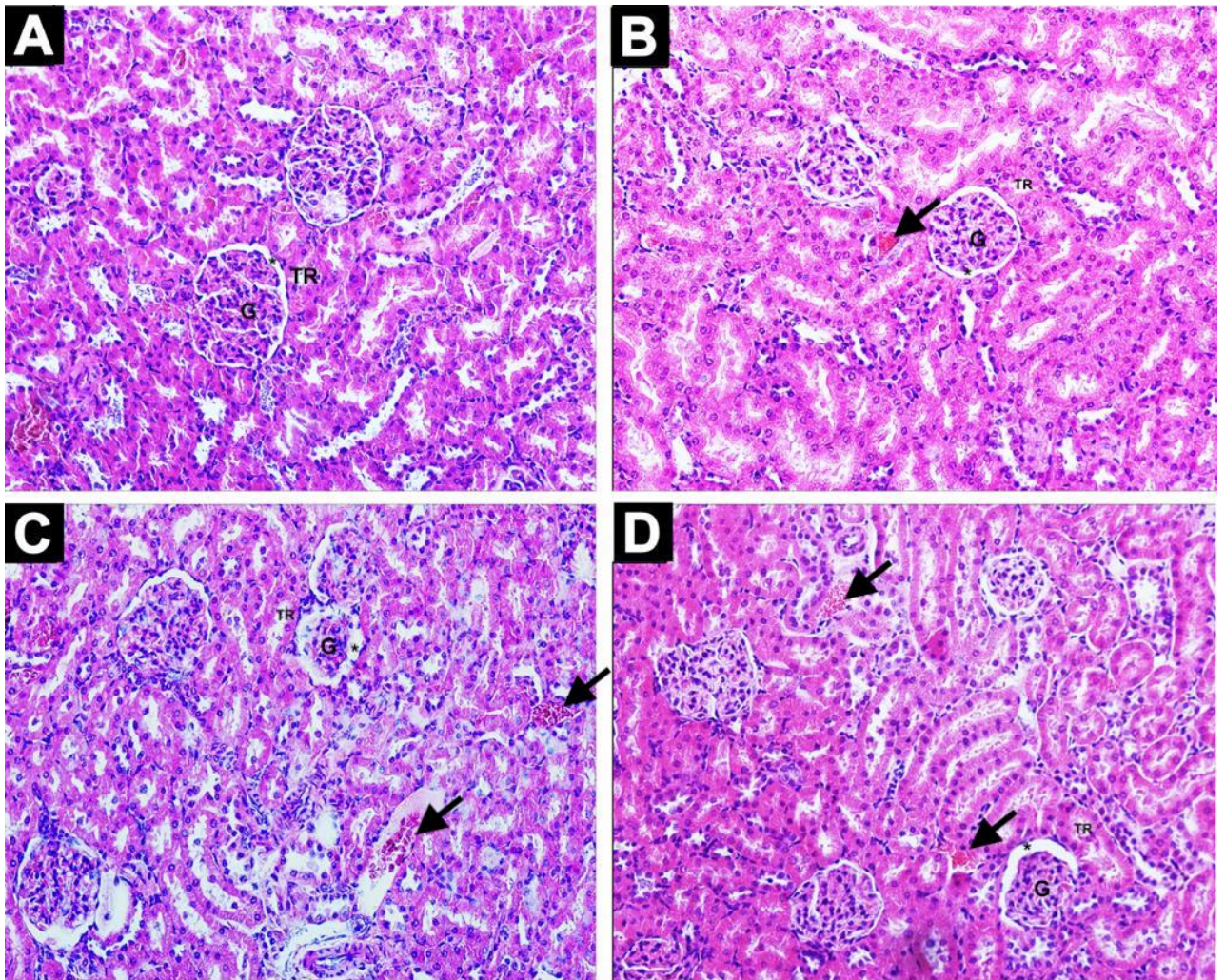
A **Figura 26** representa as medianas e desvio interquartil dos parâmetros analisados histomorfometricamente nos tecidos renais: **(A)** Espaço da cápsula de Bowman, **(B)** Circunferência da cápsula de Bowman, **(C)** Circunferência glomerular e **(D)** Diâmetro glomerular em  $\mu\text{m}$ . O grupo DP mostrou aumento estatisticamente significativo em todos os parâmetros, comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Observa-se também, que o grupo DPxPROB mostrou resultados intermediários entre o grupo DP e os controles (C e PROB).



**Figura 26** – Medianas e desvios interquartílicos dos parâmetros renais em  $\mu\text{m}^2$ . **(A)** Espaço da cápsula de Bowman; **(B)** Circunferência da cápsula de Bowman; **(C)** Circunferência glomerular; **(D)** Diâmetro glomerular. Letras diferentes significam diferença estatística.

#### 4.12.2 Análise histopatológica dos tecidos renais

A **Figura 27 (A, B, C e D)** representa a análise histopatológica dos tecidos renais nos diferentes grupos. A análise histopatológica descritiva mostrou no Grupo C, órgãos com arquiteturas teciduais normais, discretas fibroses nas regiões medulares e discretos edemas intersticiais. No Grupo PROB, foram observados órgãos com arquiteturas teciduais normais, presença discreta de degeneração hidrópica epitelial nos túbulos proximais e corticais e discretas áreas de fibrose medular. O Grupo DP mostrou alterações significativas na arquitetura tecidual, presença de material proteináceo intratubular, material basofílico intravascular, presença intensa de vasos congestos, hemorragia discreta e edema intersticial moderado, focos inflamatórios linfoplasmocitários moderados à intensos na medula e fibrose discreta na região medular. O Grupo DPxPROB mostrou degeneração hidrópica e tumefação variando de discreta à moderada no epitélio tubular, focos inflamatórios linfoplasmocitários na pelve associado a focos de hemorragia discretos, diminuição da presença de vasos congestos e hemorragia. Observou-se diminuição de material proteináceo intratubular e intravascular. Foi possível observar que os grupos DP e DPxPROB apresentaram alterações arquiteturais significativas, mesmo que de forma discreta à moderada e estas alterações foram mais intensas no grupo DP.



**Figura 27** – Fotomicrografia representativa do corte sagital do rim. (A) Grupo C; (B) Grupo PROB; (C) Grupo DP; (D) Grupo DPxPROB. \* significa espaço da cápsula de Bowman; G significa glomérulo; TR significa túbulos renais; seta preta indica vasos congestionados. Coloração: hematoxilina & eosina. Aumento original: 10x.

---

Discussão

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da periodontite experimental em ratas prenhes, bem como, se a terapia probiótica com *B. lactis* HN019 promove benefícios nesta interface. Considerando os achados microbiológicos, histopatológicos, histomorfométricos, microtomográficos, imunológicos e bioquímicos foi observado impacto negativo da PD na gravidez, a nível local e sistêmico, bem como malefícios no desenvolvimento fetal, e a terapia probiótica foi capaz de mitigar tais efeitos. Dentre os eventos negativos, destaca-se a perda óssea alveolar, destruição tecidual no periodonto de sustentação, aumento na expressão de proteinúria e creatinina na urina, redução do peso materno e do peso e quantidade de fetos e alterações intestinais e renais nas ratas com PD experimental. A administração sistêmica do *B. lactis* HN019 reduziu a perda óssea alveolar destes animais, reduziu os malefícios no desenvolvimento fetal e reduziu alterações renais. Apesar dos resultados, é importante frisar que a frequência e dosagem do probiótico, bem como a cepa utilizada, podem impactar os resultados.

Nosso modelo de indução de doença consistiu na colocação de ligadura de fio de seda, associado a gavagem oral de *P. gingivalis* W83, para garantir efeitos locais e sistêmicos da PD. Este modelo está de acordo com o utilizado por Liang et al., (2018) e Mata et al., (2021), e visa mimetizar a condição clínica, uma vez que a PD promove endotoxemia e deglutição de periodonto-patógenos. Alguns estudos, além da gavagem oral de *P. gingivalis* ATCC 33277, adicionam a injeção intravenosa do patógeno para simular os efeitos sistêmicos (Udagawa et al., 2018; Yoshida et al., 2022).

Em relação aos parâmetros anatômicos, pôde-se observar que a PD afetou o peso materno durante a prenhez. As ratas do grupo com PD induzida por ligadura e infecção por *P. gingivalis* apresentaram redução significativa de peso em relação ao grupo C, e isto refletiu em uma ninhada menor e com menor peso ao nascimento. Nossos achados estão de acordo com os achados de Liang et al., (2018), que reportaram redução significativa de peso materno, e de peso e quantidade dos fetos em ratas prenhes infectadas com *P. gingivalis* associada a ligadura, e com os achados de Mata et al., (2021), que usaram a mesma cepa bacteriana utilizada neste estudo. Além disso, estudos em camundongos infectados com a cepa *P. gingivalis* por via oral e endovenosa promoveram, além de alterações metabólicas na mãe, fetos com baixo peso ao nascimento (Udagawa et al., 2018; Yoshida et al., 2022). Apesar de alguns estudos demonstrarem efeitos diretos da infecção periodontal resultando em restrição de crescimento placentário, anatomicamente, isto não foi observado no presente estudo. Kunnen et al., (2014)



avaliaram o efeito da administração endovenosa de lipopolissacarídeos de *P. gingivalis* (Pg-LPS) em ratas prenhes e observaram a diminuição do peso placentário e o leve aumento do número de reabsorções fetais, com efeito dose-dependente (Ao et al., 2015; Udagawa et al., 2018). Podemos observar que a administração sistêmica do *B. lactis* HN019 mostrou uma tendência à regulação do peso dos fetos, em que o grupo DPxPROB mostrou fetos com peso intermediário entre o grupo C e o grupo DP. Isto pode ser explicado pela capacidade dos probióticos em remodelar comunidades microbianas, promovendo o crescimento e a sobrevivência de espécies comensais potencialmente benéficas à saúde sistêmica (Weichert et al., 2012). Além disso, foi reportado que os probióticos podem reduzir a expressão de genes associados a fatores de virulência de *P. gingivalis*, interferindo em sua capacidade de colonizar o hospedeiro e subverter a resposta imune (Ishikawa et al., 2020).

Sobre os efeitos locais, nossos achados mostraram que o modelo de indução de doença utilizado foi efetivo, elicitando manifestações clínicas da PD, tais como: perda óssea alveolar, perda de inserção clínica e degradação de tecido conjuntivo nos grupos DP e DPxPROB. O grupo DP apresentou os piores resultados na análise óssea por micro-CT das mandíbulas. Valores menores de volume ósseo em região de bifurcação, menor número, espessura e separação de trabéculas ósseas, e maior percentual de porosidade óssea pôde ser observado nos grupos DP e DPxPROB. Entretanto, podemos observar valores intermediários entre o grupo DPxPROB e os controles C e PROB (sem doença), sinalizando um efeito protetor do probiótico na perda óssea alveolar. Estes achados estão de acordo com os de Oliveira et al., (2017), Cardoso et al., (2020) e Silva et al., (2022) que reportaram o mesmo efeito protetor da administração local e sistêmica do *B. lactis* HN019 na perda óssea alveolar em ratos com PD.

Estudos têm demonstrado um papel crítico no equilíbrio entre células T helper 17 (Th17) / células T-reguladoras (T-reg) na perda óssea promovida pela osteoporose pós-menopáusia. As células Th17 representam uma linhagem de células Th pró-inflamatórias, que induzem a diferenciação de osteoclastos pela liberação de interleucina (IL)-17, IL-6, fator de necrose tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ) e ligante do ativador do receptor do fator Kappa-B (RANKL), levando à destruição óssea (Roggia et al., 2001; Sato et al., 2006; Jia et al., 2021). Foi demonstrado que a terapia probiótica, por meio da modulação da microbiota intestinal, é capaz de promover benefícios na supressão da perda óssea alveolar, por diferentes mecanismos de ação (Messora et al. 2013; Maekawa & Hajishengallis, 2014; Messora et al., 2016). Dentre eles, a modulação da via RANK-RANKL, e osteoprotegerina (RANK-RANKL-OPG) vem sendo investigada na literatura. Bactérias probióticas são capazes de reduzir a reabsorção óssea,

por meio do aumento da expressão de OPG. Este aumento induz a expressão gênica de proteína ácida secretada e rica em cisteína, e de proteína morfogenética óssea 2 (rh-BMP-2), alterando a frequência de células T-reguladoras na medula óssea e reduzindo a expressão de RANKL (Britton et al., 2014; Ohlsson et al., 2014; Oliveira et al., 2017). Este aumento das células T-reg na medula óssea de ratas ovariectomizadas (OVX) auxilia a suprimir a perda óssea induzida pela deficiência de estrogênio (Ohlsson et al., 2014; Dar et al., 2018).

A terapia probiótica foi capaz de reduzir os danos nos tecidos periodontais quando avaliada histomorfometricamente, resultados estes, similares a microtomografia computadorizada. Os grupos DP e DPxPROB mostraram danos estruturais no ligamento periodontal, além de desorganização de fibras colágenas e infiltrado inflamatório intenso. Entretanto, quando comparamos o grupo DPxPROB com o DP, podemos observar danos menores, como a maior quantidade de fibroblastos, fibras colágenas mais organizadas e menor perda de inserção clínica na região interproximal entre o primeiro e segundo molares inferiores. Quando observamos a região de bifurcação, a área sem osso, em mm<sup>2</sup>, foi significativamente maior no grupo DP, quando comparado ao grupo DPxPROB, mostrando mais uma vez, o efeito benéfico do *B. lactis* HN019 nesta interface. Os efeitos locais e sistêmicos da modulação da microbiota intestinal por meio da ingestão de probióticos, são descritos na literatura (Alshareef et al., 2020; Cosme-Silva et al., 2020; Ho et al., 2020). Outro importante efeito da administração de probiótico seria na modificação do perfil microbiano intestinal favorecendo o aumento das bactérias produtoras do ácido graxo de cadeia curta, butirato, melhorando a barreira intestinal e o equilíbrio Th17/T-reg, diminuindo a permeabilidade intestinal e a perda óssea alveolar de ratas OVX (Jia et al., 2021).

No tocante a análise microbiológica, este estudo avaliou a influência do *B. lactis* HN019 na composição da microbiota oral de ratas prenhes, utilizando 40 espécies bacterianas, selecionadas segundo suas associações à saúde ou DP humana, por meio da técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*. A validação desta técnica com sondas de espécies bacterianas humanas para hibridizar biofilmes de origem animal foi reportada anteriormente por (Duarte et al., 2010)). No entanto, este estudo comparou o biofilme presente em amostras de ligadura de ratos com PD, com amostras de biofilme de ratos periodontalmente saudáveis, coletadas com curetas periodontais (5-6 Mini-Five, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) obtidas da região interproximal de molares. Este protocolo de obtenção de biofilme também foi utilizado nos estudos de Oliveira et al., (2017) e Silva et al., (2019) e igualmente, não detectou nenhuma reação positiva nos grupos controle, talvez devido as baixas quantidades dos genomas bacterianos, abaixo do limite de detecção (10<sup>4</sup> células) e, segundo esses autores, seria uma

limitação inerente a técnica (Duarte et al., 2010; Oliveira et al., 2017; Silva et al., 2019). No presente estudo, no entanto, a utilização de um *microbrush* para a obtenção da microbiota da oral, permitiu a detecção bacteriana nos grupos de animais com ausência de PD (C e PROB).

Os estudos clássicos de Socransky et al., (1998) e Socransky & Haffajee (2002 e 2005) forneceram o entendimento sobre a ecologia da placa subgengival humana agrupando as espécies bacterianas em seis complexos. As bactérias dos complexos amarelo, verde, roxo e azul demonstram grande associação entre si e são compostos por espécies compatíveis com a saúde do hospedeiro. O complexo vermelho se relaciona fortemente com os parâmetros clínicos da DP e o complexo laranja precede a colonização do complexo vermelho e alberga algumas espécies periodonto-patogênicas, embora o seu papel como agente causal seja menos evidente. No presente estudo, foi possível observar o aumento na diversidade bacteriana nos grupos com doença (DP e DPxPROB), comparado aos grupos sem doença (C e PROB). Não houve diferença estatística entre as espécies bacterianas do complexo vermelho entre os grupos. *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* são bactérias periodonto-patogênicas detectadas em grande abundância em sítios com bolsas periodontais profundas, especialmente durante a gravidez (Contreras et al., 2006; Lin et al., 2007). Estudos clínicos e revisões de literatura com meta-análise revelam que a presença de nichos microbianos nos tecidos periodontais, funciona como reservatório para translocação de patógenos orais para órgãos distantes, e que *P. gingivalis* é capaz de colonizar a unidade feto-placentária, incluindo placenta, cordão umbilical e cavidade amniótica, e contribuir para desfechos adversos da gravidez (León et al., 2007; Kotz et al., 2009; Hasegawa-Nakamura et al., 2011; Vanterpool et al., 2016; Cobb et al., 2017; Jang et al., 2021).

No presente estudo, o grupo DP apresentou aumento significativo de espécies bacterianas do complexo roxo (*V. parvula*, *A. odontolyticus*) comparado aos demais grupos. *Veillonella spp* e *Actinomyces spp* são micro-organismos comensais da cavidade oral de humanos e animais, e são considerados colonizadores iniciais, fundamentais para a formação do biofilme e coadesão de colonizadores tardios, como a *P. gingivalis*. A maior perda óssea e perda de inserção clínica observada no grupo DP podem ser explicadas pela alta detecção de *V. parvula* neste grupo. Foi demonstrado que esta espécie bacteriana interage com *P. gingivalis* numa natureza unidirecional (comensalismo), pois nenhum benefício óbvio foi observado para *V. parvula*. Além de fornecer fator de crescimento para *P. gingivalis*, *V. parvula* produz heme, um dos nutrientes essenciais para o crescimento de periodonto-patógenos, como a *P. gingivalis* (Marcotte & Lavoie, 1998; Hojo et al., 2008; Zhou et al., 2016). *V. parvula* também apresenta duas propriedades que permitem que esta espécie seja considerada ponte para o

desenvolvimento do biofilme oral potencialmente patogênico, uma é a capacidade de coaderir com colonizadores iniciais, precoces e tardios da superfície dentária, conforme demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Kolenbrander et al., 2006, 2010), outra é a utilização do lactato (Rogosa, 1964). Essas propriedades permitem que espécies de *Veillonella* colonizem o biofilme oral, ligando-se aos colonizadores pioneiros, como *Streptococcus spp*, e utilizem o ácido láctico, secretado por estes micro-organismos, como fonte de carbono e energia diminuindo o potencial de óxido-redução, facilitando o crescimento e a multiplicação de bactérias anaeróbias (Zhou et al., 2016, 2017; Hoare et al., 2021). Além disso, foi demonstrado que o LPS de *V. parvula* pode induzir a produção de citocinas *in vitro* (TNF- $\alpha$  e IL-6) em modelos humanos e murinos (Matera et al., 2009). Esta liberação ocorre pelo reconhecimento do LPS de *V. parvula* por receptores Toll-like (TLR), como o TLR4, localizado por imuno-histoquímica no tecido gengival de pacientes com PD, que resulta no recrutamento de moléculas de sinalização citoplasmática, que eventualmente ativam proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). A ativação de MAPK leva a liberação de citocinas (Mori et al., 2003; Takeda & Akira, 2005; Elson et al., 2007; Huang et al., 2018). Foram observados maiores níveis de espécies bacterianas do complexo verde e azul nos grupos C e PROB comparado aos grupos DP e DPxPROB. O grupo PROB apresentou aumento expressivo de espécies do complexo verde, consideradas espécies compatíveis com saúde. Foi demonstrado que sítios periodontalmente saudáveis, ou seja, PS<4mm e sem sangramento à sondagem (SS) apresentam maiores contagens, em UFCs, de espécies do complexo verde, comparados a sítios com SS (Haffajee & Socransky, 1994; Socransky et al., 1998).

Quanto aos parâmetros sistêmicos, a proteinúria e creatinina na urina foram analisadas bioquimicamente. Foi observado que o grupo DP apresentou níveis significativamente mais elevados de ambas, comparado ao grupo C. Nossos achados estão de acordo com os de Mata et al., (2021) que reportaram aumento de 5 vezes nos níveis de proteinúria em ratas prenhes infectadas por *P. gingivalis* e ligadura, simulando modelo de PE experimental. Foi reportado que mulheres grávidas com PD apresentam maiores valores de proteinúria de 24h e risco elevado de PE (Contreras et al., 2006). A urinálise para proteínas é um dos testes de triagem pré-natal mais comumente utilizados, e a proteinúria durante a gravidez é considerada uma característica da PE, mas também um indicador inespecífico de doença renal e pode resultar de uma concentração elevada de proteína plasmática, aumento da permeabilidade glomerular, diminuição da reabsorção tubular de proteínas e alterações hemodinâmicas renais (Chawla & Sultan, 2022). A razão proteína/creatinina aleatória na urina é um método alternativo, rápido e

simples de detectar e estimar a avaliação quantitativa da proteinúria que elimina a necessidade diária de coleta de urina de 24h no monitoramento da doença renal, diabetes, hipertensão e PE (Kamińska et al., 2020). Embora o método padrão-ouro para quantificar a proteinúria seja a proteína da urina de 24 horas, este procedimento tem certo limite de tempo para detecção, baixa adesão do paciente e está propenso a erros de coleta. Desta forma, a razão proteína/creatinina na urina tem sido extensivamente estudada e é sugerida por apresentar maior precisão, viabilidade e fornecer resultados mais rápidos do que a excreção urinária de proteínas de 24 horas (Amin et al., 2014; Antunes et al., 2008). Estudos clínicos demonstraram a eficácia da relação proteína/creatinina urinária como ferramenta laboratorial simples para prever resultados adversos da gravidez (Cheung et al., 2016; Bhadarka et al., 2018; Stefańska et al., 2020). Mulheres com PE e relação proteína/creatinina urinária elevada, apresentam risco aumentado de complicações maternas, como: hipertensão grave, eclâmpsia, disfunção renal e trombocitopenia, indicando a necessidade de vigilância pré-natal frequente e estão mais propensas a precisar de monitoramento e tratamento em UTIs obstétricas (Chadha & Tayade, 2022). O presente estudo mostrou níveis significativamente elevados, em mg/dL, da razão proteína/creatinina na urina do grupo DP, comparado ao grupo C. Para conhecimento, na literatura não há estudos em animais que avaliaram a razão proteína/creatinina na urina na interface periodontite/gravidez para comparações.

Ainda em relação aos parâmetros sistêmicos, o presente estudo buscou avaliar a relação entre a microbiota oral, a via do nitrato-nitrito-óxido nítrico (via  $\text{NO}_3\text{-NO}_2\text{-NO}$ ) e os níveis de PA de ratas prenhes com PD, suplementadas ou não com *B. lactis* HN019 por meio da análise bioquímica e aferição de PA invasiva em tempo real. O óxido nítrico (NO) trata-se de uma molécula gasosa de sinalização, importante na homeostase metabólica e cardiovascular. O NO pode ser produzido endogenamente por enzimas específicas, ou pela redução de  $\text{NO}_3\text{-NO}_2\text{-NO}$ , conhecido como ciclo enterosalivar do nitrato, pela ação de bactérias redutoras de nitrato (Zhurakivska et al., 2019; Pignatelli et al., 2020). O papel da microbiota oral e de bactérias redutoras de nitrato na PA e saúde sistêmica vem sendo investigado na literatura, e atualmente, sabe-se que essas bactérias não agem apenas de forma independente, mas também em sinergia (Burleigh et al., 2018; Vanhatalo et al., 2018; Zhurakivska et al., 2019). Nossos achados não mostraram diferenças significativas quanto aos níveis pressóricos e dosagem de  $\text{NO}_2\text{-plasmático}$ . Entretanto, foi observado aumento significativo nos níveis de  $\text{NO}_3\text{-plasmático}$  no grupo DP, quando comparado ao grupo C. Entre as espécies redutoras de nitrato, identificadas na cavidade oral, estão: Firmicutes (*Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp* e *Veillonella spp*) e Actinobacterias (*Actinomyces spp*), seguidos por outras espécies, incluindo *Pasteurella spp*,

*Rothia spp*, *Neisseria spp*, *Haemophilus spp*, *Granulicatella spp* (Smith et al., 1999; Palmerini et al., 2003; Hyde et al., 2014). Os resultados da busca por uma relação entre o perfil microbiológico subgingival e a via  $\text{NO}_3\text{-NO}_2\text{-NO}$  devem ser interpretados com cautela, uma vez que não foi possível detectar diferenças significativas nos níveis plasmáticos de  $\text{NO}_2$ . A alta disponibilidade de  $\text{NO}_3$  plasmático no grupo DP pode estar relacionada à diminuição de espécies do complexo laranja, principalmente espécies de *F. nucleatum*, e *Streptococcus spp*, conhecidas como redutoras de  $\text{NO}_3$ . (Hyde et al., 2014). Além disso, o estudo de Koopman et al., (2016) que usou suplementação dietética de  $\text{NO}_3$  como pressão seletiva para bactérias capazes de reduzir o  $\text{NO}_3$ , encontraram proliferação de espécies de *Veillonella spp*, corroborando com nossos achados, em que foi detectada alta prevalência de *Veillonella spp* na microbiota subgingival do grupo DP.

A expressão de MMP-2 e -9 na placenta e no soro também foi analisada no presente estudo para investigação de efeitos sistêmicos da PD e da terapia com *B. lactis* HN019. MMPs são famílias de endopeptidases, zinco-dependentes, envolvidas na remodelação/degradação da matriz extracelular (MEC). As MMPs contribuem para o remodelamento tecidual, homeostase fisiológica e suprimento sanguíneo da MEC e seus níveis circulantes podem ser detectados no plasma e agir como biomarcadores no diagnóstico de doenças sistêmicas (Gerlach et al., 2005, 2007; Ellero et al., 2021). Entre as isoformas de MMPs, o desequilíbrio da MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B), vem sendo investigado na literatura, na patogênese de doenças sistêmicas, como a hipertensão (Castro et al., 2008; Bassiouni et al., 2021), PE (Karthikeyan et al., 2013; Chen & Khalil, 2017) e PD (Marcaccini et al., 2010; Liu et al., 2017).

Na análise placentária, a expressão de MMP-2 apresentou tendência ao aumento nos grupos DP e DPxPROB, porém não houve diferença estatística. A MMP-2 64kDa foi maior no grupo DPxPROB, em relação ao grupo C. O mesmo padrão se repetiu quanto a MMP-9 placentária, porém houve diferença estatística entre o grupo C e DP, com maior expressão para o C. Quanto a expressão de MMP-2 (72 e 75 kDa) no soro, foi observado leve aumento nos grupos com PD experimental (DP e DPxPROB), porém sem diferença estatística. Na gravidez normal, o organismo materno sofre alterações necessárias para a placentação adequada do embrião e suprimento sanguíneo e nutricional suficientes para o feto em desenvolvimento. Alguns destes eventos são mediados por MMPs, por exemplo, a degradação de proteínas da MEC para dar lugar a invasão trofoblástica. A MMP-2 e MMP-9 desempenham papel importante na remodelação do tecido endometrial durante o ciclo menstrual e a gravidez (Mishra et al., 2010; Zhang et al., 2010; Chen & Khalil, 2017). Normalmente, a MMP-2 (principal MMP no cordão umbilical) e MMP-9 séricas são expressas em abundância nas

células trofoblásticas, devido a invasividade destas células (Montagnana et al., 2009; Ali & Khalil, 2015). Além disso, o fator de crescimento epidérmico, que induz a invasão trofoblástica, está associado ao aumento da expressão/atividade da MMP-2 e -9 (Isaka et al., 2003; Qiu et al., 2004; Biadasiewicz et al., 2011). Na PD, foi demonstrado que há aumento significativo, a nível local e sistêmico, de MMPs, principalmente a MMP-2 e MMP-9. Liu et al., (2017) mostraram que indivíduos com PD apresentaram aumento significativo na expressão de MMP-2 e MMP-9 em biópsia gengival (Liu et al., 2017). A MMP-9 é liberada por macrófagos a nível sistêmico na presença de periodonto-patógenos (Chang et al., 2004; Holtfreter et al., 2013) e foi levantada hipótese de que o aumento na expressão de MMP-9, associado à proteína C reativa (PCR), regula negativamente o NO, com efeitos negativos no endotélio, levando a disfunção endotelial e aumento no risco de doenças cardiovasculares (DCV) (Gurav, 2014; Díaz et al., 2020). Posteriormente, Isola et al., (2021) demonstraram aumento na expressão de MMP-9 no soro e saliva de pacientes com PD e DCV, comparado a indivíduos saudáveis. Nossos resultados não demonstraram efeitos benéficos da administração de *B. lactis* HN019 na expressão de MMP-2 e -9 em ratas prenhes com PD.

A morfologia intestinal também foi analisada entre os grupos experimentais para investigar os efeitos da terapia com *B. lactis* HN019. Foi demonstrado que a disbiose da microbiota oral e intestinal, observada na PD e outras doenças sistêmicas, podem causar alterações estruturais, alterando a permeabilidade da mucosa do intestino (Messora et al., 2013; Lira & Figueredo, 2016; Fiorese et al., 2021). Foram analisadas profundidades de criptas (PC) e altura de vilosidades (AV) por meio de histomorfometria dos tecidos duodenais e jejunais. Nossos achados mostraram maiores valores de PC no duodeno dos grupos que receberam *B. lactis* HN019, principalmente no grupo DPxPROB. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas quanto à PCs no jejuno e quanto às AVs em ambos os tecidos (duodeno e jejuno), embora os grupos DP e DPxPROB tenham mostrado tendência a valores maiores de PC. Nossos achados estão de acordo com os achados de Messora et al., (2013), que reportaram valores maiores de PC e AV em ratos com PD induzida por ligadura, tratados com o probiótico *Bacillus subtilis* CH201 e com os achados de Gatej et al., (2020) que reportaram efeito protetor significativo no tratamento com *L. rhamnosus* GG sobre o íleo de camundongos, prevenindo alterações inflamatórias, como aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria, induzida pela infecção por duas bactérias periodonto-patogênicas, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*. Os efeitos benéficos dos probióticos na doença inflamatória intestinal e na função da barreira intestinal vêm sendo investigados na literatura. Sabe-se que bactérias probióticas aumentam a expressão de citocinas anti-inflamatórias intestinais, tais

como IL-10 e fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), enquanto reduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias intestinais (TNF- $\alpha$ , IL-8 e interferon- $\gamma$ ) (Vanderpool et al., 2008; Veerappan et al., 2012; Jakubczyk et al., 2020). Foi demonstrado que *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium bifidum* apresentam propriedades imunomoduladoras e reduzem a inflamação intestinal, bem como os sintomas clínicos da colite, aumentando significativamente o nível de IL-10 e reduzindo o nível de IL-1 $\beta$  nas secções do cólon, o que confirmou o efeito anti-inflamatório (Duranti et al., 2016; Javed et al., 2016; Satish Kumar et al., 2017).

Nossos achados mostraram alterações histológicas renais associadas à PD, e a administração sistêmica do *B. lactis* HN019, reduziu estas alterações. Foi demonstrado que as ratas do grupo DP mostraram aumento significativo em todos os parâmetros avaliados (espaço e circunferência da cápsula de Bowman, e diâmetro e circunferência glomerular). O grupo DPxPROB mostrou valores intermediários entre o grupo DP e os controles (C e PROB). O impacto sistêmico da PD pode causar danos em vários órgãos. Foi demonstrado que pacientes com PD eram mais propensos a sofrer de doença renal crônica (DRC) grave, do que DRC menos grave (Ausavarungrun et al., 2016). Outro estudo mostrou maior perda óssea alveolar avaliada por tomografias computadorizadas de feixe cônico em pessoas com doença renal (DR) em hemodiálise, do que pacientes controle (Zhao et al., 2014). Entretanto, a relação entre PD e DR permanece incerta.

A disbiose observada na PD e liberação de metabólitos bacterianos, como o LPS, induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas por neutrófilos ativadas e outras células de defesa (Singer et al., 2015; Oliveira et al., 2016). Citocinas pró-inflamatórias produzidas, periodonto-patógenos, bem como outros metabólitos finais das EROs contribuem para a destruição periodontal local, e podem atingir outros órgãos via circulação sistêmica, e causar danos, como aos tecidos renais (Tomofuji et al., 2007; Vasconcelos et al., 2017). Alterações nos tecidos renais podem estar associadas a produtos tóxicos bacterianos e/ou antígenos que alteram a resposta imune, estimulando linfócitos, macrófagos e células *natural killer* (NK). A ativação destas células libera quantidades excessivas de EROs, contribuindo para a geração de peróxido lipídico no rim (Ratliff et al., 2016). Nossos achados estão de acordo com os achados de França et al., (2017) e Galeno et al., (2020) que demonstraram danos estruturais no rim de ratos com PD experimental induzida por ligadura. Os autores reportaram alterações estruturais nos corpúsculos renais, que foram acompanhadas por alterações na histomorfometria renal e aumento significativo em todos os parâmetros (espaço e circunferência da cápsula de Bowman e diâmetro e circunferência



glomerular). Na análise histopatológica, o grupo DP mostrou danos na arquitetura tecidual renal, presença de material proteináceo intratubular, presença intensa de vasos congestionados, hemorragia discreta e edema intersticial moderado. Estes achados corroboram com os de França et al., (2017) que mostraram alterações histopatológicas marcantes no córtex renal, tais como: congestão peritubular e glomerular, esfoliação do revestimento celular epitelial tubular proximal e ruptura da borda em escova no grupo com PD induzida por ligadura. Um achado interessante do estudo em ratos de Galeno et al., (2021) é que mesmo após a remoção da ligadura no grupo com PD, a lesão renal persistiu. A razão pela qual as alterações renais causadas pela PD persistiram, pode estar associada ao efeito negativo dos periodontopatógenos, como *P. gingivalis*, onde essas bactérias possuem capacidade de alterar a expressão de 1.278 genes de forma diferente no intestino. Esta alteração pode ser extrapolada cuidadosamente também para os rins (Sasaki et al., 2018).

As análises histomorfométrica e histopatológica do rim mostraram que o grupo DPxPROB, apesar de apresentar danos estruturais nos tecidos renais, estes foram menores quando comparados ao grupo DP. Uma recente revisão de literatura com meta-análise de estudos clínicos randomizados avaliou os efeitos da intervenção com prebióticos, probióticos e simbióticos em pacientes com DRC. Os probióticos mais usados foram *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* e a conclusão mostrou que as terapias microbianas causaram efeitos significativamente benéficos nos marcadores inflamatórios sistêmicos (proteína C-reativa), indicadores de estresse oxidativo (malondialdeído, glutationa e capacidade total antioxidante) e no perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, colesterol de lipoproteína de baixa densidade e colesterol de lipoproteína de alta densidade) de pacientes com DRC (Zheng et al., 2021).

Este estudo apresenta limitações. Análises do perfil imuno-inflamatório, bem como análises microbiológicas mais aprofundadas, tanto nos tecidos periodontais, quanto nos tecidos placentários, análises proteômicas da urina e de outros órgãos poderiam ser úteis para sedimentar este estudo. O momento de induzir a DP também deve ser visto com cautela. Apesar de tais limitações, está claro que os probióticos apresentam potencial promissor na associação periodontite/gravidez e o potencial imunomodulador dos probióticos desempenha papel importante na regulação da saúde sistêmica.

---

Conclusões

## 6. CONCLUSÕES

Podemos concluir que a PD induzida por ligadura e infecção por *P. gingivalis* em ratas prenhes causa malefícios locais e sistêmicos na prenhez, tanto na saúde materna, quanto no desenvolvimento fetal. A terapia com *B. lactis* HN019 parece promover efeito protetor na perda óssea alveolar, perda de inserção clínica e alterações renais na associação PD/gravidez.

---

# Referências

## 7. REFERÊNCIAS

- Ali, S. M., & Khalil, R. A. (2015). Genetic, immune and vasoactive factors in the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 19, Issue 11).  
<https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1067684>
- Alshareef, A., Attia, A., Almalki, M., Alsharif, F., Melibari, A., Mirdad, B., Azab, E., Youssef, A. R., & Dardir, A. (2020). Effectiveness of Probiotic Lozenges in Periodontal Management of Chronic Periodontitis Patients: Clinical and Immunological Study. *European Journal of Dentistry*, *14*(2). <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709924>
- Amin, S. V., Illipilla, S., Hebbar, S., Rai, L., Kumar, P., & Pai, M. V. (2014). Quantifying Proteinuria in Hypertensive Disorders of Pregnancy. *International Journal of Hypertension*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/941408>
- Antunes, V. V. H., Veronese, F. J. V., & Morales, J. V. (2008). Diagnostic accuracy of the protein/creatinine ratio in urine samples to estimate 24-h proteinuria in patients with primary glomerulopathies: A longitudinal study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *23*(7). <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm949>
- Ao, M., Miyauchi, M., Furusho, H., Inubushi, T., Kitagawa, M., Nagasaki, A., Sakamoto, S., Kozai, K., & Takata, T. (2015). Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* induces preterm birth in mice. *PLoS ONE*, *10*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137249>
- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. In *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
- Ausavarungnirun, R., Wisetsin, S., Rongkiettechakorn, N., Chaichalermsak, S., Udompol, U., & Rattanasompattikul, M. (2016). Association of dental and periodontal disease with chronic kidney disease in patients of a single, tertiary care centre in Thailand. *BMJ Open*, *6*(7). <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2016-011836>
- Barreto, F. M., Colado Simão, A. N., Morimoto, H. K., Batisti Lozovoy, M. A., Dichi, I., & Helena da Silva Miglioranza, L. (2014). Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition*, *30*(7–8). <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.12.004>
- Bassiouni, W., Ali, M. A. M., & Schulz, R. (2021). Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. In *FEBS Journal* (Vol. 288, Issue 24). <https://doi.org/10.1111/febs.15701>

- Beck, J. D., Papapanou, P. N., Philips, K. H., & Offenbacher, S. (2019). Periodontal Medicine: 100 Years of Progress. *Journal of Dental Research*, 98(10).  
<https://doi.org/10.1177/0022034519846113>
- Berezow, A. B., & Darveau, R. P. (2011). Microbial shift and periodontitis. *Periodontology* 2000, 55(1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x>
- Bhadarka, N., Poddar, K., & Joshi, S. (2018). Utilization of urine protein/creatinine ratio in pregnancy for diagnosis of preeclampsia. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 7(9). <https://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20183769>
- Biadasiewicz, K., Sonderegger, S., Haslinger, P., Haider, S., Saleh, L., Fiala, C., Pollheimer, J., & Knöfler, M. (2011). Transcription factor AP-2 $\alpha$  promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology*, 152(4). <https://doi.org/10.1210/en.2010-0936>
- Bobetsis, Y. A., Graziani, F., Gürsoy, M., & Madianos, P. N. (2020). Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes. In *Periodontology 2000* (Vol. 83, Issue 1).  
<https://doi.org/10.1111/prd.12294>
- Britton, R. A., Irwin, R., Quach, D., Schaefer, L., Zhang, J., Lee, T., Parameswaran, N., & McCabe, L. R. (2014). Probiotic *L. reuteri* Treatment Prevents Bone Loss in a Menopausal Ovariectomized Mouse Model. *Journal of Cellular Physiology*, 229(11).  
<https://doi.org/10.1002/jcp.24636>
- Broekaert, I. J., & Walker, W. A. (2006). Probiotics and chronic disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3). <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00021>
- Burleigh, M. C., Liddle, L., Monaghan, C., Muggeridge, D. J., Sculthorpe, N., Butcher, J. P., Henriquez, F. L., Allen, J. D., & Easton, C. (2018). Salivary nitrite production is elevated in individuals with a higher abundance of oral nitrate-reducing bacteria. *Free Radical Biology and Medicine*, 120.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.023>
- Cardoso, R. S., Messoria, M. R., Silva, P. H. F., Oliveira, L. F., Leite-Panissi, C., Salvador, S., Casarin, R., Novaes, A. B., Palioto, D. B., & Furlaneto, F. A. C. (2020). Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis. *Beneficial Microbes*, 11(1).  
<https://doi.org/10.3920/BM2019.0038>
- Castro, M. M., Rizzi, E., Figueiredo-Lopes, L., Fernandes, K., Bendhack, L. M., Pitol, D. L., Gerlach, R. F., & Tanus-Santos, J. E. (2008). Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular

- hypertensive rats. *Atherosclerosis*, 198(2).  
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.10.011>
- Chadha, A., & Tayade, S. (2022). Urinary Protein-to-Creatinine Ratio: An Indicator of Adverse Clinical Outcomes in Preeclampsia With Proteinuria. *Cureus*.  
<https://doi.org/10.7759/cureus.23341>
- Chambrone, L., Pannuti, C. M., Guglielmetti, M. R., & Chambrone, L. A. (2011). Evidence grade associating periodontitis with preterm birth and/or low birth weight: II. A systematic review of randomized trials evaluating the effects of periodontal treatment. In *Journal of Clinical Periodontology* (Vol. 38, Issue 10). <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01761.x>
- Chang, Y. C., Chu, S. C., Yang, S. F., Hsieh, Y. S., Yang, L. C., & Huang, F. M. (2004). Examination of the signal transduction pathways leading to activation of gelatinolytic activity by interleukin-1 $\alpha$  and Porphyromonas gingivalis in human osteosarcoma cells. *Journal of Periodontal Research*, 39(3). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00720.x>
- Chaparro, A., Blanlot, C., Ramírez, V., Sanz, A., Quintero, A., Inostroza, C., Bittner, M., Navarro, M., & Illanes, S. E. (2013). Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola and toll-like receptor 2 are associated with hypertensive disorders in placental tissue: A case-control study. *Journal of Periodontal Research*, 48(6).  
<https://doi.org/10.1111/jre.12074>
- Chawla, S., & Sultan, P. (2022). Antenatal Care for Uncomplicated Pregnancies. In *Quick Hits in Obstetric Anesthesia*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-72487-0\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-030-72487-0_29)
- Chen, J., & Khalil, R. A. (2017). Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 148). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.04.001>
- Cheng, J., Laitila, A., & Ouwehand, A. C. (2021). Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 Effects on Gut Health: A Review. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.790561>
- Cheung, H. C., Leung, K. Y., & Choi, C. H. (2016). Diagnostic accuracy of spot urine protein-to-creatinine ratio for proteinuria and its association with adverse pregnancy outcomes in Chinese pregnant patients with pre-eclampsia. *Hong Kong Medical Journal*, 22(3). <https://doi.org/10.12809/hkmj154659>
- Chiang, B. L., Sheih, Y. H., Wang, L. H., Liao, C. K., & Gill, H. S. (2000). Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (Bifidobacterium

- lactis HN019): Optimization and definition of cellular immune responses. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(11). <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601093>
- Cobb, C. M., Kelly, P. J., Williams, K. B., Babbar, S., Angolkar, M., & Derman, R. J. (2017). The oral microbiome and adverse pregnancy outcomes. In *International Journal of Women's Health* (Vol. 9). <https://doi.org/10.2147/IJWH.S142730>
- Cobb, C. M., & Sottosanti, J. S. (2021). A re-evaluation of scaling and root planing. In *Journal of Periodontology* (Vol. 92, Issue 10, pp. 1370–1378). <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0839>
- Collins, J. G., Smith, M. A., Arnold, R. R., & Offenbacher, S. (1994). Effects of *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. In *Infection and Immunity* (Vol. 62, Issue 10). <https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4652-4655.1994>
- Conde-Agudelo, A., Villar, J., & Lindheimer, M. (2008). Maternal infection and risk of preeclampsia: Systematic review and metaanalysis. In *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 198, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.07.040>
- Contreras, A., Herrera, J. A., Soto, J. E., Arce, R. M., Jaramillo, A., & Botero, J. E. (2006). Periodontitis Is Associated With Preeclampsia in Pregnant Women. *Journal of Periodontology*, 77(2). <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050020>
- Cosme-Silva, L., Dal-Fabbro, R., Cintra, L. T. A., Ervolino, E., Piazza, F., Mogami Bomfim, S., Duarte, P. C. T., Junior, V. E. D. S., & Gomes-Filho, J. E. (2020). Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *International Endodontic Journal*, 53(8). <https://doi.org/10.1111/iej.13311>
- Daalderop, L. A., Wieland, B. V., Tomsin, K., Reyes, L., Kramer, B. W., Vanterpool, S. F., & Been, J. V. (2018). Periodontal disease and pregnancy outcomes: Overview of systematic reviews. In *JDR Clinical and Translational Research* (Vol. 3, Issue 1). <https://doi.org/10.1177/2380084417731097>
- Danos, O., Davies, K., Lehn, P., & Mulligan, R. (2010). The ARRIVE guidelines, a welcome improvement to standards for reporting animal research. In *Journal of Gene Medicine* (Vol. 12, Issue 7). <https://doi.org/10.1002/jgm.1472>
- Dar, H. Y., Shukla, P., Mishra, P. K., Anupam, R., Mondal, R. K., Tomar, G. B., Sharma, V., & Srivastava, R. K. (2018). *Lactobacillus acidophilus* inhibits bone loss and increases bone heterogeneity in osteoporotic mice via modulating Treg-Th17 cell balance. *Bone Reports*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.02.001>



- de Molon, R. S., Park, C. H., Jin, Q., Sugai, J., & Cirelli, J. A. (2018). Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microscopy Research and Technique*, 81(12). <https://doi.org/10.1002/jemt.23101>
- Deas, D. E., & Mealey, B. L. (2010). Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontology 2000*, 53(1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00334.x>
- Díaz, C. M., Bullon, B., Ruiz-Salmerón, R. J., Fernández-Riejos, P., Fernández-Palacín, A., Battino, M., Cordero, M. D., Quiles, J. L., Varela-López, A., & Bullón, P. (2020). Molecular inflammation and oxidative stress are shared mechanisms involved in both myocardial infarction and periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 55(4). <https://doi.org/10.1111/jre.12739>
- Duan, X., Hays, A., Zhou, W., Sileewa, N., Upadhyayula, S., Wang, H., & Liang, S. (2018). Porphyromonas gingivalis induces exacerbated periodontal disease during pregnancy. *Microbial Pathogenesis*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.019>
- Duarte, P. M., Tezolin, K. R., Figueiredo, L. C., Feres, M., & Bastos, M. F. (2010). Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology*, 55(2). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.10.006>
- Duranti, S., Gaiani, F., Mancabelli, L., Milani, C., Grandi, A., Bolchi, A., Santoni, A., Lugli, G. A., Ferrario, C., Mangifesta, M., Viappiani, A., Bertoni, S., Vivo, V., Serafini, F., Barbaro, M. R., Fugazza, A., Barbara, G., Gioiosa, L., Palanza, P., ... Turrone, F. (2016). Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(12). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw191>
- Ellero, N., Lanci, A., Ferlizza, E., Andreani, G., Mariella, J., Isani, G., & Castagnetti, C. (2021). Activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in amniotic fluid at parturition in mares with normal and high-risk pregnancy. *Theriogenology*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.009>
- Elson, G., Dunn-Siegrist, I., Daubeuf, B., & Pugin, J. (2007). Contribution of toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood*, 109(4). <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-032961>
- Feres, M., Figueiredo, L. C., Soares, G. M. S., & Faveri, M. (2015). Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontology 2000*, 67(1). <https://doi.org/10.1111/prd.12075>
- Feres, M., Retamal-Valdes, B., Fermiano, D., Faveri, M., Figueiredo, L. C., Mayer, M. P. A.,

- Lee, J. J., Bittinger, K., & Teles, F. (2021). Microbiome changes in young periodontitis patients treated with adjunctive metronidazole and amoxicillin. *Journal of Periodontology*, *92*(4). <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0128>
- Figuro, E., Han, Y. W., & Furuichi, Y. (2020). Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes: Mechanisms. In *Periodontology 2000* (Vol. 83, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/prd.12295>
- Fiorese, I. F. C., Gomes, J. C., dos Santos, B. C. C., Wachter, F., Piana, E. A., Brancalhão, R. M. C., Grassioli, S., Nassar, C. A., & Nassar, P. O. (2021). Effects of the Association of Periodontitis and Type 1 Diabetes Mellitus Induced on Periodontal Tissues and the Duodenal Mucosa of Wistar Rats. *Inflammation*, *44*(2). <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01369-9>
- Fischer, R. G., Lira Junior, R., Retamal-Valdes, B., de Figueiredo, L. C., Malheiros, Z., Stewart, B., & Feres, M. (2020). Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. *Brazilian Oral Research*, *34*. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2020.VOL34.0026>
- Fuhler, G. M. (2020). The immune system and microbiome in pregnancy. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vols. 44–45). <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2020.101671>
- G. Caton, J., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., S. Kornman, K., L. Mealey, B., Papapanou, P. N., Sanz, M., & S. Tonetti, M. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, *45*. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
- Galeno, J. G., França, L. F. de C., da Silva, F. R. P., Alves, E. H. P., Di Lenardo, D., Nascimento, H. M. S., Cardoso Guimarães Vasconcelos, A. C., Carneiro Gomes, P. R., Dias de Souza Filho, M., Caetano, V. da S., de Oliveira, A. P., de Alencar, M. V. O. B., Barbosa, A. L. dos R., Medeiros, J. V. R., Fahimipou, F., Barros, S. P., Alves Diniz, I. M., & Vasconcelos, D. F. P. (2021). Renal alterations caused by ligature-induced periodontitis persist after ligature removal in rats. *Journal of Periodontal Research*, *56*(2). <https://doi.org/10.1111/jre.12822>
- Gerlach, R. F., Demacq, C., Jung, K., & Tanus-Santos, J. E. (2007). Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clinical Biochemistry*, *40*(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.10.007>

- Gerlach, R. F., Uzuelli, J. A., Souza-Tarla, C. D., & Tanus-Santos, J. E. (2005). Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Analytical Biochemistry*, *344*(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.038>
- Graziani, F., Gennai, S., Solini, A., & Petrini, M. (2018). A systematic review and meta-analysis of epidemiologic observational evidence on the effect of periodontitis on diabetes An update of the EFP-AAP review. In *Journal of Clinical Periodontology* (Vol. 45, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/jcpe.12837>
- Guo, Z., Liu, X. M., Zhang, Q. X., Shen, Z., Tian, F. W., Zhang, H., Sun, Z. H., Zhang, H. P., & Chen, W. (2011). Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: A meta-analysis of randomised controlled trials. In *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* (Vol. 21, Issue 11).  
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2011.04.008>
- Gurav, A. N. (2014). The implication of periodontitis in vascular endothelial dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*, *44*(10). <https://doi.org/10.1111/eci.12322>
- Gürsoy, M., Gürsoy, U. K., Sorsa, T., Pajukanta, R., & Könönen, E. (2013). High Salivary Estrogen and Risk of Developing Pregnancy Gingivitis. *Journal of Periodontology*, *84*(9). <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120512>
- Haas, A. N., Furlaneto, F., Gaio, E. J., Gomes, S. C., Palioto, D. B., Castilho, R. M., Sanz, M., & Messora, M. R. (2021). New tendencies in non-surgical periodontal therapy. *Brazilian Oral Research*, *35*(Supplement 2). <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0095>
- Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, *5*(1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1994.tb00020.x>
- Hasegawa-Nakamura, K., Tateishi, F., Nakamura, T., Nakajima, Y., Kawamata, K., Douchi, T., Hatae, M., & Noguchi, K. (2011). The possible mechanism of preterm birth associated with periodontopathic *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, *46*(4). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01366.x>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *11*(8).

- <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hirohata, N., Komine-Aizawa, S., Tamura, M., Ochiai, K., Sugitani, M., & Hayakawa, S. (2017). Porphyromonas gingivalis Suppresses Trophoblast Invasion by Soluble Factors . *Journal of Periodontology*, 88(12). <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170193>
- Ho, S. N., Acharya, A., Sidharthan, S., Li, K. Y., Leung, W. K., McGrath, C., & Pelekos, G. (2020). A Systematic Review and Meta-analysis of Clinical, Immunological, and Microbiological Shift in Periodontitis After Nonsurgical Periodontal Therapy With Adjunctive Use of Probiotics. In *Journal of Evidence-Based Dental Practice* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2020.101397>
- Hoare, A., Wang, H., Meethil, A., Abusleme, L., Hong, B. Y., Moutsopoulos, N. M., Marsh, P. D., Hajishengallis, G., & Diaz, P. I. (2021). A cross-species interaction with a symbiotic commensal enables cell-density-dependent growth and in vivo virulence of an oral pathogen. *ISME Journal*, 15(5). <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00865-y>
- Hojo, K., Tamura, A., Mizoguchi, C., Kato, D., Ohshima, T., & Maeda, N. (2008). Predominant bacteria recovered from a periodontitis site in a hamster model raised by silk-ligature with Porphyromonas gingivalis infection. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(5). <https://doi.org/10.1271/bbb.70653>
- Holtfreter, B., Empen, K., Gläser, S., Lorbeer, R., Völzke, H., Ewert, R., Kocher, T., & Dörr, M. (2013). Periodontitis is associated with endothelial dysfunction in a general population: A cross-sectional study. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084603>
- Huang, B., Dai, Q., & Huang, S. G. (2018). Expression of Toll-like receptor 4 on mast cells in gingival tissues of human chronic periodontitis. *Molecular Medicine Reports*, 17(5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8648>
- Humphrey, L. L., Fu, R., Buckley, D. I., Freeman, M., & Helfand, M. (2008). Periodontal disease and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *Journal of General Internal Medicine*, 23(12). <https://doi.org/10.1007/s11606-008-0787-6>
- Hyde, E. R., Andrade, F., Vaksman, Z., Parthasarathy, K., Jiang, H., Parthasarathy, D. K., Torregrossa, A. C., Tribble, G., Kaplan, H. B., Petrosino, J. F., & Bryan, N. S. (2014). Metagenomic analysis of nitrate-reducing bacteria in the oral cavity: Implications for nitric oxide homeostasis. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088645>
- Invernici, M. M., Furlaneto, F. A. C., Salvador, S. L., Ouwehand, A. C., Salminen, S., Mantziari, A., Vinderola, G., Ervolino, E., Santana, S. I., Silva, P. H. F., & Messoria, M.

- R. (2020). Bifidobacterium animalis subsp lactis HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. *PLoS ONE*, 15(9 September 2020).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238425>
- Invernici, M. M., Salvador, S. L., Silva, P. H. F., Soares, M. S. M., Casarin, R., Palioto, D. B., Souza, S. L. S., Taba, M., Novaes, A. B., Furlaneto, F. A. C., & Messoria, M. R. (2018). Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(10).  
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12995>
- Isaka, K., Usuda, S., Ito, H., Sagawa, Y., Nakamura, H., Nishi, H., Suzuki, Y., Li, Y. F., & Takayama, M. (2003). Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta*, 24(1). <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0867>
- Ishikawa, K. H., Mita, D., Kawamoto, D., Nicoli, J. R., Albuquerque-Souza, E., Lorenzetti Simionato, M. R., & Mayer, M. P. A. (2020). Probiotics alter biofilm formation and the transcription of Porphyromonas gingivalis virulence-associated genes. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1805553>
- Jakubczyk, D., Leszczyńska, K., & Górska, S. (2020). The effectiveness of probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease (Ibd)— a critical review. *Nutrients*, 12(7).  
<https://doi.org/10.3390/nu12071973>
- Jang, H., Patoine, A., Wu, T. T., Castillo, D. A., & Xiao, J. (2021). Oral microflora and pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 11(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-96495-1>
- Javed, N. H., Alsahly, M. B., & Khubchandani, J. (2016). Oral Feeding of Probiotic Bifidobacterium infantis: Colonic Morphological Changes in Rat Model of TNBS-Induced Colitis. *Scientifica*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9572596>
- Jepsen, S., Deschner, J., Braun, A., Schwarz, F., & Eberhard, J. (2011). Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontology 2000*, 55(1).  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00382.x>
- Jia, L., Tu, Y., Jia, X., Du, Q., Zheng, X., Yuan, Q., Zheng, L., Zhou, X., & Xu, X. (2021). Probiotics ameliorate alveolar bone loss by regulating gut microbiota. *Cell Proliferation*, 54(7). <https://doi.org/10.1111/cpr.13075>
- Kamińska, J., Dymicka-Piekarska, V., Tomaszewska, J., Matowicka-Karna, J., & Koper-Lenkiewicz, O. M. (2020). Diagnostic utility of protein to creatinine ratio (P/C ratio) in spot urine sample within routine clinical practice. In *Critical Reviews in Clinical*

- Laboratory Sciences* (Vol. 57, Issue 5). <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1723487>
- Karthikeyan, V. J., Lane, D. A., Beevers, D. G., Lip, G. Y. H., & Blann, A. D. (2013). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in hypertension-related pregnancy complications. In *Journal of Human Hypertension* (Vol. 27, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/jhh.2012.8>
- Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. L., & Marcenes, W. (2014). Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. In *Journal of Dental Research* (Vol. 93). <https://doi.org/10.1177/0022034514537828>
- Khalesi, S., Sun, J., Buys, N., & Jayasinghe, R. (2014). Effect of probiotics on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. In *Hypertension* (Vol. 64, Issue 4). <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03469>
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., & Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. In *Periodontology 2000* (Vol. 42, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x>
- Kotz, J., Chegini, N., Shiverick, K. T., & Lamont, R. J. (2009). Localization of *P. gingivalis* in Preterm Delivery Placenta. *Journal of Dental Research*, 88(6). <https://doi.org/10.1177/0022034509338032>
- Krüger, M. S. da M., Casarin, R. P., Pinto, G. dos S., Pappen, F. G., Camargo, M. B. J., Correa, F. O. B., & Romano, A. R. (2019). Maternal periodontal disease and adverse perinatal outcomes: is there an association? A hospital-based case-control study. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 32(20). <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1464554>
- Kunnen, A., van Pampus, M. G., Aarnoudse, J. G., van der Schans, C. P., Abbas, F., & Faas, M. M. (2014). The effect of porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on pregnancy in the rat. *Oral Diseases*. <https://doi.org/10.1111/odi.12177>
- Kwon, T. H., Lamster, I. B., & Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. In *International Dental Journal* (Vol. 71, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/idj.12630>
- Lamont, R. J., & Hajishengallis, G. (2015). Polymicrobial synergy and dysbiosis in

- inflammatory disease. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 21, Issue 3).  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.004>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- León, R., Silva, N., Ovalle, A., Chaparro, A., Ahumada, A., Gajardo, M., Martínez, M., & Gamonal, J. (2007). Detection of Porphyromonas gingivalis in the Amniotic Fluid in Pregnant Women With a Diagnosis of Threatened Premature Labor. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060368>
- Lin, D., Moss, K., Beck, J. D., Hefti, A., & Offenbacher, S. (2007). Persistently High Levels of Periodontal Pathogens Associated With Preterm Pregnancy Outcome. *Journal of Periodontology*, 78(5). <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060201>
- Lira, R., & Figueredo, C. M. (2016). Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions? In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 35). <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i35.7963>
- Lisboa, M. R. P., Gondim, D. V., Ervolino, E., Vale, M. L., Frota, N. P. R., Nunes, N. L. T., Mariguela, V. C., Taba, M., Messoria, M. R., & Furlaneto, F. A. C. (2015). Effects of Electroacupuncture on Experimental Periodontitis in Rats. *Journal of Periodontology*, 86(6). <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140630>
- Liu, N., Cao, Y., & Zhu, G. (2017). Expression of matrix metalloproteinases-2, -9 and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in gingiva in periodontal health and disease. *Archives of Oral Biology*, 75.  
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.12.009>
- Luoto, R., Laitinen, K., Nermes, M., & Isolauri, E. (2010). Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: A double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition*, 103(12). <https://doi.org/10.1017/S0007114509993898>
- Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A., & Offenbacher, S. (2013). Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: Pathogenic mechanisms. In *Journal of Clinical Periodontology* (Vol. 40, Issue SUPPL. 14). <https://doi.org/10.1111/jcpe.12082>
- Maekawa, T., & Hajishengallis, G. (2014). Topical treatment with probiotic Lactobacillus brevis CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *Journal of Periodontal Research*, 49(6). <https://doi.org/10.1111/jre.12164>
- Marcaccini, A. M., Meschiari, C. A., Zuardi, L. R., De Sousa, T. S., Taba, M., Teofilo, J. M., Jacob-Ferreira, A. L. B., Tanus-Santos, J. E., Novaes, A. B., & Gerlach, R. F. (2010).

- Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(2).  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01512.x>
- Marcotte, H., & Lavoie, M. C. (1998). Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1).  
<https://doi.org/10.1128/mubr.62.1.71-109.1998>
- Mata, K., Nobre, A. V. V., Felix Silva, P. H., Oliezer, R. S., Fernandes, C., Amaral, J., Ramos, J., Constante Gabriel Del-Arco, M., Messoria, M. R., Tanus-Santos, J. E., Gerlach, R. F., & Salvador, S. L. (2021). A new mixed model of periodontitis-induced preeclampsia: A pilot study. *Journal of Periodontal Research*, 56(4).  
<https://doi.org/10.1111/jre.12869>
- Matera, G., Muto, V., Vinci, M., Zicca, E., Abdollahi-Roodsaz, S., Van De Veerdonk, F. L., Kullberg, B. J., Liberto, M. C., Van Der Meer, J. W. M., Focà, A., Netea, M. G., & Joosten, L. A. B. (2009). Receptor recognition of and immune intracellular pathways for *Veillonella parvula* lipopolysaccharide. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(12).  
<https://doi.org/10.1128/CVI.00310-09>
- Mattaraia, V. G. de M., & Moura, A. S. A. M. T. (2012). Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. *Ciência Rural*, 42(8).  
<https://doi.org/10.1590/s0103-84782012000800026>
- Messoria, M., Santana, S., Souza, S., Novaes-Jr, A., Taba-Jr, M., Palioto, D., & Furlaneto, F. (2019). Evaluation of the effects of probiotics on the treatment of peri-implant mucositis – A preliminary randomized controlled trial. *Clinical Oral Implants Research*, 30(S19).  
[https://doi.org/10.1111/clr.186\\_13509](https://doi.org/10.1111/clr.186_13509)
- Messoria, Michel R., Oliveira, L. F. F., Foureaux, R. C., Taba, M., Zangerônimo, M. G., Furlaneto, F. A. C., & Pereira, L. J. (2013). Probiotic Therapy Reduces Periodontal Tissue Destruction and Improves the Intestinal Morphology in Rats With Ligature-Induced Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 84(12).  
<https://doi.org/10.1902/jop.2013.120644>
- Messoria, Michel R., Pereira, L. J., Foureaux, R., Oliveira, L. F. F., Sordi, C. G., Alves, A. J. N., Napimoga, M. H., Nagata, M. J. H., Ervolino, E., & Furlaneto, F. A. C. (2016). Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.02.014>
- Messoria, Michel Reis, Silva, P. H. F., Maia, L. P., Salvador, S., Ouwehand, A. C., &



- Furlaneto, F. (2021). Probiotics and Prebiotic in Oral Health. In *Probiotics and Prebiotics in Foods*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819662-5.00015-x>
- Mishra, B., Kizaki, K., Koshi, K., Ushizawa, K., Takahashi, T., Hosoe, M., Sato, T., Ito, A., & Hashizume, K. (2010). Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-60>
- Montagnana, M., Lippi, G., Albiero, A., Scevarolli, S., Salvagno, G. L., Franchi, M., & Guidi, G. C. (2009). Evaluation of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in physiologic and pre-eclamptic pregnancy. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(2). <https://doi.org/10.1002/jcla.20295>
- Moore, S., Ide, M., Coward, P. Y., Randhawa, M., Borkowska, E., Baylis, R., & Wilson, R. F. (2004). A prospective study to investigate the relationship between periodontal disease and adverse pregnancy outcome. *British Dental Journal*, 197(5). <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4811620>
- Mori, Y., Yoshimura, A., Ukai, T., Lien, E., Espevik, T., & Hara, Y. (2003). Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(1). <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.2003.180109.x>
- Nobre, Á. V. V., Pólvara, T. L. S., Silva, L. R. M., Teles, V. de O., Villafuerte, K. V., da Motta, R. J. G., Fortes, J. H. P., Silva, G. A., Ranieri, A. L. P., de Macedo, L. D., Morejon, K. M. L., da Fonseca, B. A. L., Tirapelli, C., Saraiva, M. C. P., Taba, M., Lourenço, A. G., & Motta, A. C. F. (2019). Effects of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological profile and oral colonization of *Candida* spp in HIV-infected patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 90(2). <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0197>
- Ohlsson, C., Engdahl, C., Fak, F., Andersson, A., Windahl, S. H., Farman, H. H., Movérare-Skrtic, S., Islander, U., & Sjögren, K. (2014). Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092368>
- Oliveira, L. F. F., Salvador, S. L., Silva, P. H. F., Furlaneto, F. A. C., Figueiredo, L., Casarin, R., Ervolino, E., Palioto, D. B., Souza, S. L. S., Taba, M., Novaes, A. B., & Messoria, M. R. (2017). Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 88(2).

- <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160217>
- Oliveira, R. R. D. S., Fermiano, D., Feres, M., Figueiredo, L. C., Teles, F. R. F., Soares, G. M. S., & Faveri, M. (2016). Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. *Journal of Dental Research*, 95(6). <https://doi.org/10.1177/0022034516634619>
- Orefice, R. (2021). Immunology and the immunological response in pregnancy. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 76). <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.07.013>
- Ouwehand, A. C., Invernici, M. M., Furlaneto, F. A. C., & Messori, M. R. (2018). Effectiveness of Multistrain Versus Single-strain Probiotics Current Status and Recommendations for the Future. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 52. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001052>
- Palioto, D. B., Finoti, L. S., Kinane, D. F., & Benakanakere, M. (2019). Epigenetic and inflammatory events in experimental periodontitis following systemic microbial challenge. *Journal of Clinical Periodontology*. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13151>
- Palmerini, C. A., Palombari, R., Perito, S., & Arienti, G. (2003). NO synthesis in human saliva. In *Free Radical Research* (Vol. 37, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/1071576021000028398>
- Papapanou, P. N., & Kornman, K. S. (2020). Periodontitis Classification. In *Journal of the American Dental Association* (Vol. 151, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2020.01.018>
- Pignatelli, P., Fabietti, G., Ricci, A., Piattelli, A., & Curia, M. C. (2020). How periodontal disease and presence of nitric oxide reducing oral bacteria can affect blood pressure. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 20). <https://doi.org/10.3390/ijms21207538>
- Pólvora, T. L. S., Nobre, Á. V. V., Tirapelli, C., Taba, M., Macedo, L. D. de, Santana, R. C., Pozzetto, B., Lourenço, A. G., & Motta, A. C. F. (2018). Relationship between human immunodeficiency virus (HIV-1) infection and chronic periodontitis. In *Expert Review of Clinical Immunology* (Vol. 14, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1459571>
- Puertas, A., Magan-Fernandez, A., Blanc, V., Revelles, L., O'Valle, F., Pozo, E., León, R., & Mesa, F. (2018). Association of periodontitis with preterm birth and low birth weight: a comprehensive review. In *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 31, Issue 5). <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1293023>
- Qiu, Q., Yang, M., Tsang, B. K., & Gruslin, A. (2004). EGF-induced trophoblast secretion of

- MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction*, 128(3). <https://doi.org/10.1530/rep.1.00234>
- Ramos Peña, D. E., Santos, E. de S., Bezerra, R. dos S., Nobre, Á. V. V., Pólvora, T. L. S., da Fonseca, B. A. L., Pozzetto, B., Lourenço, A. G., do Nascimento, C., & Motta, A. C. F. (2022). Non-surgical periodontal debridement affects subgingival bacterial diversity in patients with HIV-1 and periodontitis. *Journal of Periodontology*, 93(10). <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0466>
- Ratliff, B. B., Abdulmahdi, W., Pawar, R., & Wolin, M. S. (2016). Oxidant mechanisms in renal injury and disease. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 25, Issue 3). <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6665>
- Ricoldi, M. S. T., Furlaneto, F. A. C., Oliveira, L. F. F., Teixeira, G. C., Pischiotini, J. P., Moreira, A. L. G., Ervolino, E., De Oliveira, M. N., Bogsan, C. S. B., Salvador, S. L., & Messori, M. R. (2017). Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179946>
- Roggia, C., Gao, Y., Cenci, S., Weitzmann, M. N., Toraldo, G., Isaia, G., & Pacifici, R. (2001). Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: A key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.251534698>
- Rogosa, M. (1964). THE GENUS VEILLONELLA I. *Journal of Bacteriology*, 87(1). <https://doi.org/10.1128/jb.87.1.162-170.1964>
- Saigal, S., & Doyle, L. W. (2008). An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. In *The Lancet* (Vol. 371, Issue 9608). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60136-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60136-1)
- Samreen, Ahmad, I., Malak, H. A., & Abulreesh, H. H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. In *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
- Sasaki, N., Katagiri, S., Komazaki, R., Watanabe, K., Maekawa, S., Shiba, T., Udagawa, S., Takeuchi, Y., Ohtsu, A., Kohda, T., Tohara, H., Miyasaka, N., Hirota, T., Tamari, M., & Izumi, Y. (2018). Endotoxemia by *Porphyromonas gingivalis* injection aggravates nonalcoholic fatty liver disease, disrupts glucose/lipid metabolism, and alters gut microbiota in mice. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02470>

- Satish Kumar, C. S. V., Kondal Reddy, K., Boobalan, G., Gopala Reddy, A., Sudha Rani Chowdhary, C. H., Vinoth, A., Jayakanth, K., & Srinivasa Rao, G. (2017). Immunomodulatory effects of *Bifidobacterium bifidum* 231 on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Research in Veterinary Science*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.10.010>
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J., & Takayanagi, H. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal of Experimental Medicine*, 203(12). <https://doi.org/10.1084/jem.20061775>
- Schlagenhauf, U., Jakob, L., Eigenthaler, M., Segerer, S., Jockel-Schneider, Y., & Rehn, M. (2016). Regular consumption of *Lactobacillus reuteri*-containing lozenges reduces pregnancy gingivitis: an RCT. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(11). <https://doi.org/10.1111/jcpe.12606>
- Silva, G. A., Moreira, A. L. G., Silva, P. H. F., Salvador, S. L., Casarin, R. C. V., Vicente, R. M., Ferreira, G. C., Tanus-Santos, J. E., Furlaneto, F. A. C., & Messoria, M. R. (2022). The use of probiotics can reduce the severity of experimental periodontitis in rats with metabolic syndrome: An immunoenzymatic and microtomographic study. *Journal of Periodontology*, 93(2). <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0285>
- Silva, P. H. F., Oliveira, L. F. F., Cardoso, R. S., Ricoldi, M. S. T., Figueiredo, L. C., Salvador, S. L., Palioto, D. B., Furlaneto, F. A. C., & Messoria, M. R. (2019). The impact of predatory bacteria on experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*, 90(9). <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0485>
- Singer, R. E., Moss, K., Kim, S. J., Beck, J. D., & Offenbacher, S. (2015). Oxidative stress and IgG antibody modify periodontitis-CRP association. *Journal of Dental Research*, 94(12). <https://doi.org/10.1177/0022034515602693>
- Smith, A. J., Benjamin, N., Weetman, D. A., Mackenzie, D., & MacFarlane, T. W. (1999). The microbial generation of nitric oxide in the human oral cavity. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(1). <https://doi.org/10.1080/089106099435880>
- Soares, G. M. S., Mendes, J. A. V., Silva, M. P., Favari, M., Teles, R., Socransky, S. S., Wang, X., Figueiredo, L. C., & Feres, M. (2014). Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: A secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical trial. *Journal of Clinical*

- Periodontology*, 41(4). <https://doi.org/10.1111/jcpe.12217>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2). <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>
- Srinivas, S. K., Sammel, M. D., Stamilio, D. M., Clothier, B., Jeffcoat, M. K., Parry, S., Macones, G. A., Elovitz, M. A., & Metlay, J. (2009). Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: is there an association? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(5). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.03.003>
- Stefańska, K., Zieliński, M., Zamkowska, D., Adamski, P., Jassem-Bobowicz, J., Piekarska, K., Jankowiak, M., Leszczyńska, K., Świątkowska-Stodulska, R., Preis, K., Trzonkowski, P., & Marek-Trzonkowska, N. (2020). Comparisons of dipstick test, urine protein-to-creatinine ratio, and total protein measurement for the diagnosis of preeclampsia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijerph17124195>
- Swati, P., Thomas, B., Vahab, S. A., Kapaettu, S., & Kushtagi, P. (2012). Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(3). <https://doi.org/10.1007/s00404-011-2012-9>
- Sykes, L., MacIntyre, D. A., Yap, X. J., Teoh, T. G., & Bennett, P. R. (2012). The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/967629>
- Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. In *International Immunology* (Vol. 17, Issue 1). <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>
- Tamashiro, N. S., Duarte, P. M., Miranda, T. S., Maciel, S. S., Figueiredo, L. C., Favari, M., & Feres, M. (2016). Amoxicillin Plus Metronidazole Therapy for Patients with Periodontitis and Type 2 Diabetes: A 2-year Randomized Controlled Trial. *Journal of Dental Research*, 95(7). <https://doi.org/10.1177/0022034516639274>
- Teshome, A., & Yitayeh, A. (2016). Relationship between periodontal disease and preterm low birth weight: Systematic review. In *Pan African Medical Journal* (Vol. 24). <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.24.215.8727>
- Teughels, W., Feres, M., Oud, V., Martín, C., Matesanz, P., & Herrera, D. (2020). Adjunctive effect of systemic antimicrobials in periodontitis therapy: A systematic review and meta-analysis. In *Journal of Clinical Periodontology* (Vol. 47, Issue S22). <https://doi.org/10.1111/jcpe.13264>

- Teughels, W., Loozen, G., & Quirynen, M. (2011). Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *Journal of Clinical Periodontology*, 38(SUPPL. 11). <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01665.x>
- Tomofuji, T., Ekuni, D., Yamanaka, R., Kusano, H., Azuma, T., Sanbe, T., Tamaki, N., Yamamoto, T., Watanabe, T., Miyauchi, M., & Takata, T. (2007). Chronic Administration of Lipopolysaccharide and Proteases Induces Periodontal Inflammation and Hepatic Steatosis in Rats. *Journal of Periodontology*, 78(10). <https://doi.org/10.1902/jop.2007.070056>
- Udagawa, S., Katagiri, S., Maekawa, S., Takeuchi, Y., Komazaki, R., Ohtsu, A., Sasaki, N., Shiba, T., Watanabe, K., Ishihara, K., Sato, N., Miyasaka, N., & Izumi, Y. (2018). Effect of Porphyromonas gingivalis infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight. *Acta Odontologica Scandinavica*, 76(6). <https://doi.org/10.1080/00016357.2018.1426876>
- van Nieuwenhoven, A. L. V., Heineman, M. J., & Faas, M. M. (2003). The immunology of successful pregnancy. In *Human Reproduction Update* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg026>
- Vanderpool, C., Yan, F., & Polk, D. B. (2008). Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. In *Inflammatory Bowel Diseases* (Vol. 14, Issue 11). <https://doi.org/10.1002/ibd.20525>
- Vanhatalo, A., Blackwell, J. R., L'Heureux, J. E., Williams, D. W., Smith, A., van der Giezen, M., Winyard, P. G., Kelly, J., & Jones, A. M. (2018). Nitrate-responsive oral microbiome modulates nitric oxide homeostasis and blood pressure in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.078>
- Vanterpool, S. F., Been, J. V., Houben, M. L., Nikkels, P. G. J., De Krijger, R. R., Zimmermann, L. J. I., Kramer, B. W., Progulske-Fox, A., & Reyes, L. (2016). Porphyromonas gingivalis within placental villous mesenchyme and umbilical cord stroma is associated with adverse pregnancy outcome. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146157>
- Vasconcelos, D. F. P., Pereira da Silva, F. R., Pinto, M. e S. C., Santana, L. de A. B., Souza, I. G., Miranda de Souza, L. K., Oliveira, N. C. M., Ventura, C. A., Novaes, P. D., Barbosa, A. L. dos R., Medeiros, J.-V. R., Mikolasevic, I., Mani, A., & Soares de Oliveira, J. (2017). Decrease of Pericytes is Associated With Liver Disease Caused by Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *Journal of Periodontology*, 88(2).

- <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160392>
- Veerappan, G. R., Betteridge, J., & Young, P. E. (2012). Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports, 14*(4).  
<https://doi.org/10.1007/s11894-012-0265-5>
- Vest, A. R., & Cho, L. S. (2014). Hypertension in pregnancy. NICE clinical guideline 107. *Current Atherosclerosis Reports, 16*(3).
- Vitali, B., Cruciani, F., Baldassarre, M. E., Capursi, T., Spisni, E., Valerii, M. C., Candela, M., Turroni, S., & Brigidi, P. (2012). Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: Outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion. *BMC Microbiology, 12*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-236>
- Vittekk, J., Hernandez, M. R., Wenk, E. J., Rappaport, S. C., & Southren, A. L. (1982). Specific estrogen receptors in human gingiva. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 54*(3). <https://doi.org/10.1210/jcem-54-3-608>
- Waller, P. A., Gopal, P. K., Leyer, G. J., Ouwehand, A. C., Reifer, C., Stewart, M. E., & Miller, L. E. (2011). Dose-response effect of Bifidobacterium lactis HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. *Scandinavian Journal of Gastroenterology, 46*(9). <https://doi.org/10.3109/00365521.2011.584895>
- Wei, B. J., Chen, Y. J., Yu, L., & Wu, B. (2013). Periodontal Disease and Risk of Preeclampsia: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE, 8*(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070901>
- Weichert, S., Schrotten, H., & Adam, R. (2012). The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. *Pediatric Infectious Disease Journal, 31*(8). <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182620e52>
- Williams, R. C., & Offenbacher, S. (2000). Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. In *Periodontology 2000* (Vol. 23).  
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2230101.x>
- Wu, M., Chen, S. W., & Jiang, S. Y. (2015). Relationship between gingival inflammation and pregnancy. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2015).  
<https://doi.org/10.1155/2015/623427>
- Yang, S., Li, W., Challis, J. R. G., Reid, G., Kim, S. O., & Bocking, A. D. (2014). Probiotic Lactobacillus rhamnosus GR-1 supernatant prevents lipopolysaccharide-induced preterm birth and reduces inflammation in pregnant CD-1 mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, 211*(1). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.01.029>
- Yoshida, S., Hatasa, M., Ohsugi, Y., Tsuchiya, Y., Liu, A., Niimi, H., Morita, K., Shimohira,

- T., Sasaki, N., Maekawa, S., Shiba, T., Hirota, T., Okano, T., Hirose, A., Ibi, R., Noritake, K., Tomiga, Y., Nitta, H., Suzuki, T., ... Katagiri, S. (2022). Porphyromonas gingivalis Administration Induces Gestational Obesity, Alters Gene Expression in the Liver and Brown Adipose Tissue in Pregnant Mice, and Causes Underweight in Fetuses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.745117>
- Zhang, X., Qi, C., & Lin, J. (2010). Enhanced expressions of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and-9 and vascular endothelial growth factors (VEGF) and increased microvascular density in the endometrial hyperplasia of women with anovulatory dysfunctional uterine bleeding. *Fertility and Sterility*, 93(7). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.142>
- Zhao, D., Zhang, S., Chen, X., Liu, W., Sun, N., Guo, Y., Dong, Y., Mo, A., & Yuan, Q. (2014). Evaluation of Periodontitis and Bone Loss in Patients Undergoing Hemodialysis. *Journal of Periodontology*, 85(11). <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140119>
- Zheng, H. J., Guo, J., Wang, Q., Wang, L., Wang, Y., Zhang, F., Huang, W. J., Zhang, W., Liu, W. J., & Wang, Y. (2021). Probiotics, prebiotics, and synbiotics for the improvement of metabolic profiles in patients with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 61, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1740645>
- Zhou, P., Li, X., Huang, I. H., & Qi, F. (2017). Veillonella catalase protects the growth of Fusobacterium nucleatum in microaerophilic and Streptococcus gordonii-resident environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01079-17>
- Zhou, P., Li, X., & Qi, F. (2016). Identification and characterization of a haem biosynthesis locus in Veillonella. *Microbiology (United Kingdom)*, 162(10). <https://doi.org/10.1099/mic.0.000366>
- Zhurakivska, K., Troiano, G., Caponio, V. C. A., Dioguardi, M., Laino, L., Maffione, A. B., & Muzio, L. Lo. (2019). Do changes in oral microbiota correlate with plasma nitrite response? A systematic review. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 10, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01029>



## ANEXO A: DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO CEUA



### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO


Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Comissão de Ética no Uso de Animais

#### DECLARAÇÃO

DECLARAMOS, atendendo a requerimento, e de acordo com os registros desta Comissão, que o Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "**Impacto da terapia com Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 em ratas prenhes com periodontite experimental**", sob responsabilidade do Prof. Dr. Michel Reis Messora, foi submetido para apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP/USP em 31/10/2018 – Processo nº 2018.1.800.58.8, tendo sido aprovado em 28/01/2019, com término previsto para 27/01/2021.

Ribeirão Preto, 18 de maio de 2020.



**Ana Aparecida Ferreira do Nascimento**  
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais

## ANEXO B: ARTIGO PUBLICADO



Received: 28 October 2020 | Revised: 26 January 2021 | Accepted: 14 February 2021

DOI: 10.1111/jre.12869

ORIGINAL ARTICLE

JOURNAL OF  
PERIODONTAL RESEARCH | WILEY

## A new mixed model of periodontitis-induced preeclampsia: A pilot study

Karina Mata<sup>1,2</sup> | Atila Vinícius Vitor Nobre<sup>3</sup> | Pedro Henrique Felix Silva<sup>3</sup> |  
Rene Seabra Oliezer<sup>1</sup> | Cleverson Fernandes<sup>2,4</sup> | Jefferson Amaral<sup>5</sup> | Junia Ramos<sup>1</sup> |  
Marina Constante Gabriel Del-Arco<sup>6</sup> | Michel Reis Messorá<sup>3</sup> |  
José Eduardo Tanus-Santos<sup>5</sup> | Raquel Fernanda Gerlach<sup>1</sup> | Sergio Luiz Salvador<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic and Oral Biology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup>University of Rio Verde, UniRV, Formosa, GO, Brazil

<sup>3</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, Ribeirao Preto Dental School, University of Sao Paulo-USP, Ribeirao Preto, SP, Brazil

<sup>4</sup>Department of Pathology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil

<sup>5</sup>Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil

<sup>6</sup>Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo-USP, Ribeirao Preto, SP, Brazil

### Correspondence

Sergio Luiz Salvador, Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo-USP, Ribeirao Preto, SP, Brazil.  
Email: slsdssalv@usp.br

### Funding information

FAPESP (14/23888-0) and CNPq (313029/2018-4).

### Abstract

**Objectives/Background:** Recent studies have shown that periodontal disease is strongly related to gestational complications such as preeclampsia (PE). PE is responsible for 42% of maternal deaths worldwide and kills approximately 76 000 women a year. In addition, children born under PE conditions are at increased risk of hospitalization due to metabolic disorders, epilepsy, and other complications. Numerous reviews and clinical studies on PE have been published, but the mechanisms underlying the relationship between periodontal disease and PE and the way periodontopathogens alter vascular response in pregnant women remain unclear.

**Methods:** This study aims to verify whether periodontal disease induces PE by using the association of two periodontitis (PD) models: ligature and oral *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) W83 inoculation in *Wistar* rats. At gestational day 5, the ligature was placed on each mandibular first molar, which was followed by daily oral *P. gingivalis* inoculation for 15 days. At gestational day 19, urine was collected, and invasive arterial pressure was measured. The animals were euthanized, and plasma and tissues were collected.

**Results:** After 15 days of the association of ligature and *P. gingivalis* inoculation, the animals presented the characteristic symptoms of PE: altered blood pressure, proteinuria, and change in litter size (number of pups) and pup weight when compared to the control group ( $p < .005$ ). The PE animals also presented greater bone porosity, trabecular separation, and reduced bone volume in the hemimandibles, as well as altered inflammatory response. The level of cytokine IL-6 was higher in the PE group than in the control group ( $p < .005$ ).

**Conclusion:** The association of two PD models effectively induced PE. To our knowledge, this is the first study on the oral use of *P. gingivalis* for PE induction. Our results support the importance of PD as a possible cause for PE development, opening an

Karina Mata and Atila Vinícius Vitor Nobre contributed equally.

Raquel Fernanda Gerlach and Sergio Luiz Salvador supervisors contributed equally.

© 2021 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

important new avenue to study cause and consequence relationships in inflammation and PE due to exposure to periodontal infection.

#### KEYWORDS

cytokines, hypertension, periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, preeclampsia

## 1 | INTRODUCTION

Preeclampsia (PE) is a hypertensive disorder that is specific to pregnancy. It involves multiple systems and progresses rapidly. PE affects between 2% and 8% of pregnancies and results in high mortality worldwide.<sup>1</sup> The World Health Organization (WHO) estimates that PE causes 76 000 maternal deaths annually. In addition, in the United States, the estimated cost of PE is more than US\$ 2.1 billion (for both mother and newborns) in the first year after delivery.<sup>2</sup> PE is characterized by increased blood pressure that may be associated with proteinuria or not, and it usually occurs after 20 weeks of pregnancy.<sup>3</sup> The immunoinflammatory mechanisms underlying the pathogenesis of PE remain unclear. Subgingival bacteria from periodontal pockets have been hypothesized to trigger a systemic inflammatory response, increasing the risk of adverse pregnancy outcomes in pregnant women.<sup>4</sup>

Periodontitis (PD) is the sixth most prevalent disease in the world. It affects 11% of the world population and is more prevalent in older patients.<sup>5,6</sup> PD is a chronic infectious-inflammatory condition that is characterized by dysbiosis of the oral microbiota by specific periodontopathogens, to culminate in destruction of the tissues supporting the teeth, which can cause tooth loss.<sup>7,8</sup> Several studies have investigated the occurrence of periodontal disease during pregnancy, and widely varied prevalence (11%–100%) has been found.<sup>9,10</sup> Pregnant women with periodontal disease are at higher risk of adverse pregnancy outcomes,<sup>11</sup> including PE,<sup>12,13</sup> preterm delivery,<sup>14,15</sup> and low birth weight (LBW).<sup>16</sup> However, studies have failed to confirm these associations.<sup>17,18</sup>

Systematic reviews have tried to clarify the association between periodontal disease and adverse pregnancy outcomes. Nevertheless, these reviews have important discrepancies in their conclusions, which may reflect the apparently contrasting findings of individual studies. Given the morbidity and very serious consequences of PE, reaching more consistent conclusions is essential.<sup>19,20</sup>

Compelling evidence exists for the potential relationships between periodontal disease and gestational complications such as PE.<sup>4,21</sup> According to Reyes et al.<sup>22</sup> (2017), studies are needed to define how *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) contributes to adverse pregnancy outcomes. Although it has been established that this bacterium functions as a key pathogen that induces dysbiosis of the oral microbiota, the impact of this effect on systemic diseases,<sup>23,24</sup> particularly on adverse pregnancy outcomes, requires further investigation.<sup>7</sup> Studies have shown that periodontopathogens can reach the maternal-fetal interface, and have suggested the participation of these bacteria, especially *P. gingivalis* in the

pathogenesis of PE.<sup>25–27</sup> Other investigators have reported that pregnant rats developed adverse pregnancy outcomes after dorsal inoculation with *P. gingivalis*, such as altered gestational pattern, changed fetal development<sup>28</sup> and PE after administration of lipopolysaccharides (LPS).<sup>29</sup> The LPS model revealed increased blood pressure, restricted placental and fetal growth, and higher fetal resorption, but proteinuria and inflammation were absent.<sup>29</sup> So far, no animal model has mimicked PE induction by periodontal infection.

For a complex disease mechanism to be studied in detail, an animal model that closely resembles the clinical condition must be established. Thus, this study tests whether association of ligatures with daily oral *P. gingivalis* inoculation in pregnant rats would be sufficient to induce PE, and details the periodontal disease, the maternal inflammatory condition, and the fetal outcomes.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Sample population and sample size calculation

This study was conducted in accordance with the ethical principles of animal experimentation, and the protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at the Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, SP, Brazil (protocol 2017.1.333.58.0). The authors followed the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines.<sup>30</sup>

A sample calculation was performed to determine the sample size; the Periodontal Disease variables were taken into account. A sample of eight animals per group was required to provide 80% power, to enable recognition of significant differences between the groups, with a 95% confidence interval. On the basis of a study by Messora et al.,<sup>31</sup> the primary variable was the mean alveolar bone volume (BV) that was present in the bifurcation area.

Forty female Wistar Hannover Specific-Pathogen-Free (SPF) rats were maintained on *ad libitum* standard rat chow and tap water under a 12:12 h light-dark cycle, at a controlled temperature of (23 ± 2°C). The mating protocol was carried out when the females of all the groups had reached eight weeks of age. The protocol was conducted in a dark environment; the temporary polygamous system (two females for each male)<sup>32</sup> was applied. To confirm pregnancy, a vaginal lavage was performed to observe the presence of spermatozoa by light microscopy. The presence of vaginal plug, as indicative of successful copulation, was considered day 1 of pregnancy.<sup>33</sup> After pregnancy was confirmed, the animals were randomly allocated into the following groups (n = 8).

1. *Control group (Control)*: pregnant rats that did not receive any intervention;
2. *Carboxymethylcellulose group (Carbox)*: pregnant rats that received daily oral inoculation with carboxymethylcellulose;
3. *P. gingivalis group (Pg)*: pregnant rats that received only oral inoculation with *P. gingivalis*;
4. *Ligature group (Ligature)*: pregnant rats that received only cotton ligature;
5. *PE group (PE)*: pregnant rats with periodontitis induced by placing a cotton ligature and daily oral inoculation with *P. gingivalis*;

At gestational day 5, ligature was placed in both mandibular first molars (MFM). Thereafter, the PE group was submitted to oral inoculation of 1 ml of *P. gingivalis* for 15 consecutive days, once a day. The Carbox and *P. gingivalis* groups received only carboxymethylcellulose or oral inoculation with *P. gingivalis*, once a day, respectively. The ligature group received ligatures, and there were no other interventions. The control group did not receive ligatures or oral inoculation with *P. gingivalis*.

## 2.2 | Periodontitis induction protocols

### 2.2.1 | Ligature

At gestational day 5, the animals were anesthetized with intraperitoneal injection of xylazine (10 mg/kg of body weight) and ketamine (80 mg/kg body of weight). A cotton ligature was placed around both MFM of the animals, as described previously.<sup>34</sup> The presence of ligatures was checked periodically.

### 2.2.2 | *Porphyromonas gingivalis* W83 inoculation

*P. gingivalis* (W83) was obtained from frozen stocks and cultured on Brain Heart Infusion (BHI) agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood, hemin (0.5 mg/ml), and menadione (1 mg/ml) for 7 days at 37°C under anaerobic condition (BDGasPak™ EZ container systems, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). The colonies were transferred to BHI broth added with hemin (0.5 mg/ml) and menadione (1 mg/ml) and incubated for 16 h. The cultures were centrifuged at 8000 × g/10 min; the cells were resuspended in reduced transport fluid (RTF) adjusted to optical density (OD) of 1.0 at 600 nm and diluted 1:10 in the same fluid, to reach 1 × 10<sup>9</sup> Colony-forming units (CFU)/ml.<sup>35</sup> The periodontal disease induction protocol consisted in oral inoculation with 10<sup>9</sup> CFU of *P. gingivalis* in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) plus 2% of carboxymethylcellulose. This suspension was directly applied in the oral cavity (via gavage) once a day for 15 days. Inoculation was initiated at gestational day 5 and continued until gestational day 19.

### 2.2.3 | Proteinuria

At gestational day 19, the animals were euthanized, and urine was collected directly from the bladder and stored in previously sterilized tubes. A random sample was used to quantify proteins in urine. The SENSIPROT Test (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brazil) was employed, and the protocol was carried out by following the manufacturer's recommendations. The result of proteinuria is expressed in milligrams per deciliter (mg/dl).

### 2.2.4 | Hemodynamic assessment of animals

The hemodynamic changes induced by the different treatments were monitored in real time. Briefly, before euthanasia at gestational day 19, a polyethylene catheter (P50) was inserted into the femoral artery of the animals (which had been previously anesthetized with 2% isoflurane). The catheter was then externalized by the back for real-time monitoring of blood pressure. The catheter was coupled to a pressure transducer, which was connected to a data acquisition system model PowerLab 4/35 and LabChart Pro (ADInstruments Pty). This approach allowed to assess the changes in blood pressure produced by different treatments in real time.

### 2.2.5 | Euthanasia and collection

At gestational day 19, after the in vivo hemodynamic features were measured, the animals were euthanized with a final solution of xylazine (30 mg/kg of body weight) and ketamine (240 mg/kg of body weight). Blood was collected by abdominal aorta puncture<sup>36</sup> and stored at -80°C in a freezer for further immunoenzymatic assay. Next, an incision was made in the abdominal region, to remove the biological materials.<sup>37</sup> Pups and placenta were weighed to evaluate the effects of the treatments/infection. Subsequently, the samples were rapidly excised and washed with 0.9% ice-cold saline solution (4°C). Then, the samples were frozen and stored at -80°C.

### 2.2.6 | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The blood that was collected by abdominal aorta puncture was placed in a 10 ml vacuum tube containing heparin (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company). The tube was immediately centrifuged at 5000 rotations per minute. After centrifugation, the acellular plasma top layer was separated from the lower layer of red blood cells. The top layer was pipetted and stored in DNase- and RNase-free tubes and frozen at -80°C. The ELISA protocols were followed according to the manufacturer's recommendations (ELISA beta kit IL-1 rat ab 100768; ELISA kit IL-6 rat ab 100772; Abcam).



### 2.3 | Microtomographic analyses

Non-demineralized specimens were scanned with a cone-beam microtomographic (micro-CT) system. The X-ray generator was operated at an accelerated potential of 60 kilovolt (kV) with a beam current of 165 microampere ( $\mu\text{A}$ ) and an exposure time of 650 ms per projection. The images were produced with a voxel size of  $6 \times 6 \times 6 \mu\text{m}$ . For volumetric measurements in all the images of the coronal dataset, a volume of interest (VOI-prismatic section) was outlined from the apexes of all the roots of M1 up to the roof of the furcation of M1, with the root surfaces being touched<sup>38</sup>; appropriate software was used. The following parameters were analyzed: (1) BV: percentage of VOI filled with bone tissue; (2) bone porosity (BP): percentage of porosities present in the bone tissue within the VOI; (3) trabecular number (Tb.N): number ( $\text{mm}^{-1}$ ) of bone trabeculae present within the VOI; and (4) trabecular separation (Tb. Sp): total of spaces (mm) present among the bone trabeculae within the VOI. Rendered reconstructions of the microtomographic sections were also obtained for all the groups; appropriate software was employed.

### 2.4 | Statistical analyses

The homoscedasticity and normality of the data were verified (Shapiro-Wilk test). The significance level of 5% was accepted. The significance of the differences between the groups was assessed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test

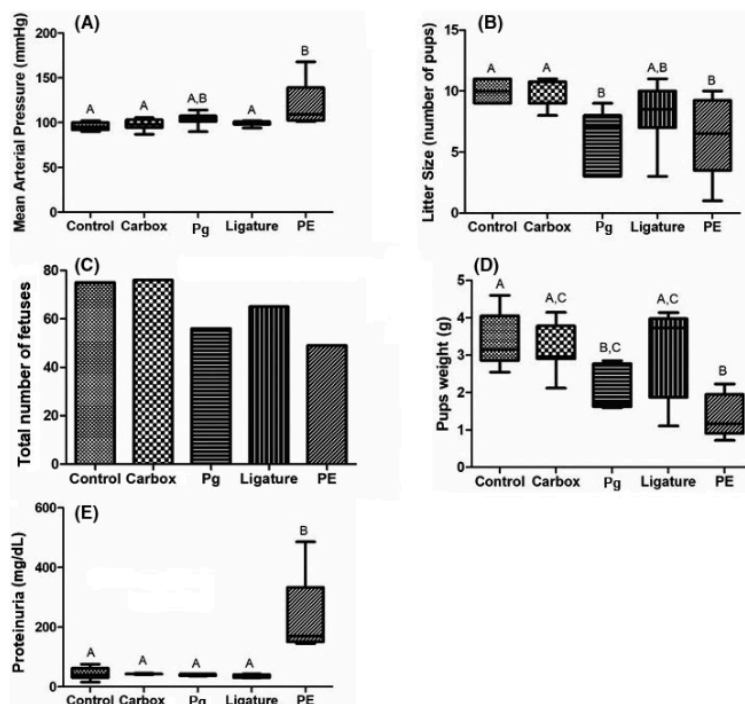
( $p < .05$ ). The graphs show median, interquartile values, and maximum and minimum values in all the groups. Different letters mean statistical differences ( $p < .05$ ).

## 3 | RESULTS

The females of all the groups arrived at the animal facility four weeks before they got pregnant, and they were allowed to adapt to the environment and to the team that was responsible for the study. The experiment started four days after they had mated. Before and during the experiment, all the females were healthy, except for the visible change in size seen in the animals belonging to the PE group.

### 3.1 | Maternal and pup measurements

All the parameters that are considered important to assess PE changed. Maternal blood pressure increased in the PE group compared to the control group ( $118.4 \pm 27.9 \text{ mmHg}$  vs.  $95.8 \pm 4.3 \text{ mmHg}$ , respectively; Figure 1A). Regarding the fetuses, that is, litter size, total number of pups and pup weight changed significantly and were smaller in the PE group compared to the control group ( $6.1 \pm 3.1$  vs.  $10 \pm 0.7$ ;  $49$  vs.  $75$ ;  $1.3 \pm 0.5 \text{ g}$  vs.  $3.2 \pm 0.7 \text{ g}$ , respectively, Figure 1B, 1C, and 1D). Protein excretion in urine also changed: proteinuria increased fivefold in the PE group compared to the control group ( $233.9 \pm 133.2 \text{ mg/dl}$  vs.  $44.2 \pm 20.3 \text{ mg/dl}$ , respectively; Figure 1E).



**FIGURE 1** Preeclampsia parameters: (A) Mean of the arterial pressure in millimeters of Mercury (mmHg). (B) Litter size (Mean of the number of pups). (C) Total number of fetuses: Control = 75; Carbox = 76; Pg = 56; Ligature = 65; and PE = 49. (D) Pups weight in grams (g). (E) Proteinuria levels in milligrams per deciliter (mg/dl). Representative boxplots for all groups. Different letters show significant differences between groups (ANOVA, Tukey,  $p < .05$ )

All these changes were statistically significant ( $p < .05$ ). Figure 2 illustrates changes in pup size.

### 3.2 | Immunological analysis

Pg and PE groups showed high levels of serum IL-6. There was a statistically significant increase in the PE group compared to the control group. As for serum levels of IL-1, there was no statistically significant difference between groups (Figure 3A and 3B).

### 3.3 | Micro-CT analysis

For BV analysis, the PE group showed significantly reduced values compared to the control group ( $53.4 \pm 17.5\%$  vs.  $95.2 \pm 1.4\%$ , respectively,  $p < .05$ ; Figure 4A). Considering the bone microarchitecture in the furcation area, the PE group presented greater BP ( $46.1 \pm 17.5\%$  vs.  $4.7 \pm 1.4\%$ , respectively,  $p < .05$ ; Figure 4B) and Tb. Sp ( $16.8 \pm 5.2$  mm vs.  $6.5 \pm 0.7$  mm, respectively,  $p < .05$ ; Figure 4B and 4E) compared to the control group. The groups did not differ in terms of Tb.N, but Tb. Th was smaller in the PE group compared to the control group ( $23.2 \pm 5.3$  mm vs.  $43.6 \pm 4.2$  mm, respectively,  $p < .05$ ; Figure 4C and 4D).

Figure 5 contains three-dimensional rendered reconstructions of the microtomographic sections of all the groups.

## 4 | DISCUSSION

The present study shows that an association between PD and PE caused increased blood pressure, proteinuria, fetal alteration, alveolar bone loss, and systemic inflammatory profile alteration. We

associated two models of PD induction (ligature + oral *P. gingivalis* inoculation). These protocols are widely employed to induce periodontal disease.<sup>39-41</sup> Additionally, recent studies have used this association and suggested that the systemic inflammation elicited by *P. gingivalis* inoculation may modify the gut mucosal immune system, thereby potentiating periodontal disease damages such as alveolar bone loss and increasing the inflammatory response.<sup>40-42</sup>

Strong evidence suggests that maternal periodontal disease is associated with the risk of adverse pregnancy outcomes.<sup>4,21,43</sup> This association is supported by the finding that dysbiosis of oral microbiota observed during periodontal infection stimulates the immune-inflammatory response via local increase in pro-inflammatory mediators like interleukin (IL)-1 $\beta$ , prostaglandin E2, IL-6, and tumoral necrosis factor (TNF)- $\alpha$ .<sup>24,44</sup> The inflamed periodontal tissues, a characteristic of PD, act as the "focus of infection" and facilitate the spread of inflammatory molecules and microorganisms in the systemic circulation.<sup>7</sup> Together with pathogens, the entry of these chemical mediators triggers an acute inflammatory response, which can reach the vascular endothelium and promote endothelial lesions, exacerbating systemic conditions.<sup>24,45</sup> Our results showed that the association of ligature with infection by *P. gingivalis* induced an increase in serum levels of IL-6 in the PE group. In addition, the disease induction model used promoted many important aspects that correlated well with the PE seen in humans, which indicated that this association in pregnant rats may eventually (after careful reproduction by several groups) be considered a useful model for study PE.

In addition to the local and systemic manifestations presented by PE group, it was observed that the groups Pg and PE showed a reduction litter size and smaller pups. The mean of number of pups per group in the PE group was 6.1, while this number was 7 in the Pg group, compared to the control group that had an average of 9.3. The total number of fetuses in the PE group was 49, followed by 56 in the Pg group, while the control group totaled 75 fetuses. Reduction

FIGURE 2 Changes in fetal morphology in all groups

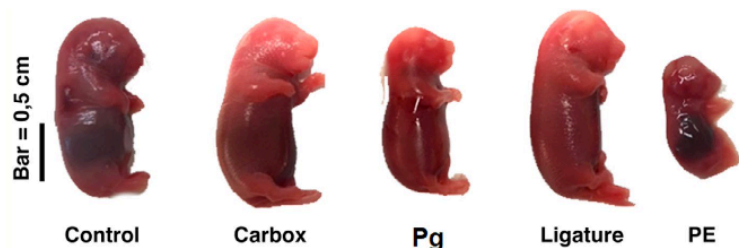
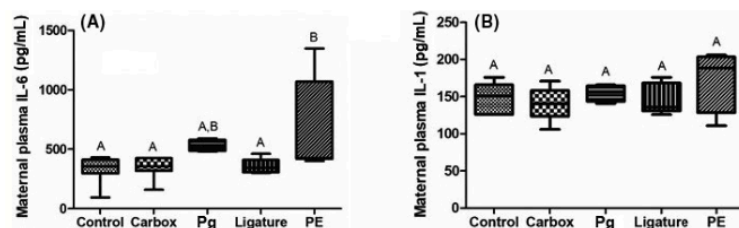


FIGURE 3 Immunological parameters. (A) Interleukin (IL)-6 levels in picograms per milliliter (pg/ml) in plasma. (B) IL-1 levels in pg/ml in plasma. Representative boxplots for all groups. Different letters show significant differences between groups (ANOVA, Tukey,  $p < .05$ )



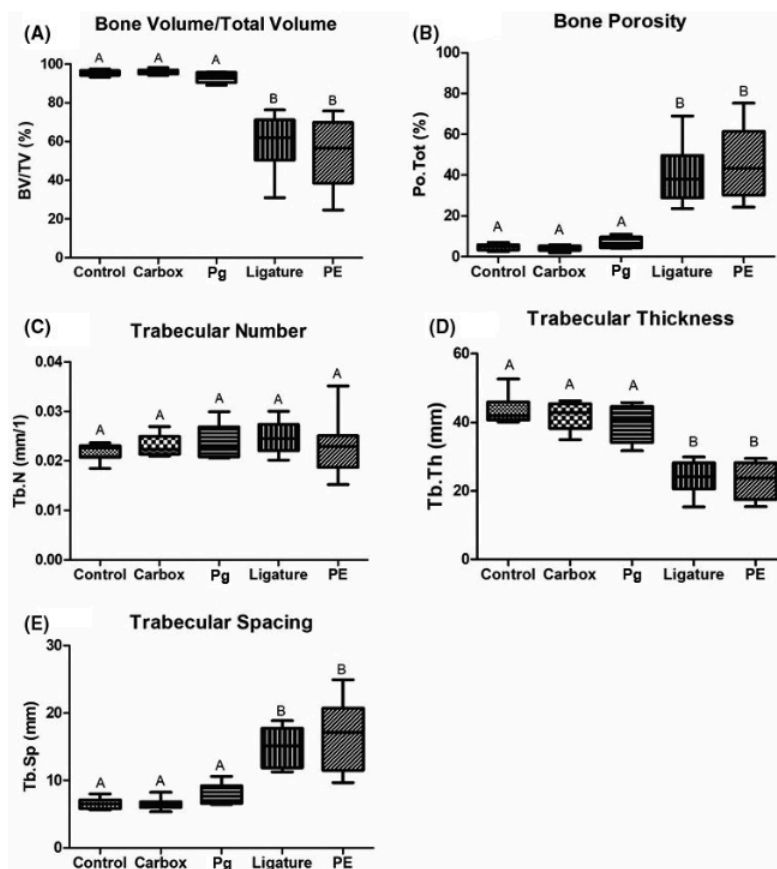


FIGURE 4 Microtomographic parameters. (A) Bone volume (BV) and total volume (TV) levels. (B) Bone porosity (Po. Tot). (C) Number of bone trabeculae (Tb.N). (D) Trabecular thickness (Tb. Th) in millimeters (mm). (E) Trabecular spacing (Tb. Sp) in mm. Representative boxplots of all groups. Different letters show significant differences between groups (ANOVA, Tukey,  $p < .05$ )

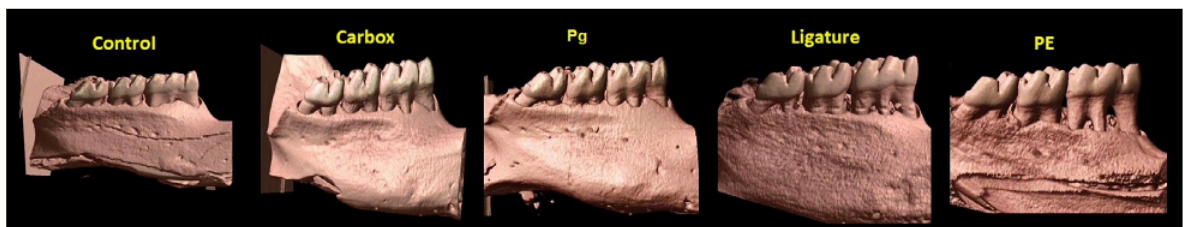


FIGURE 5 Three-dimensional reconstructions of the microtomographic sections of all groups (Buccal view). Pixel size = 7.96 mm

in litter size and smaller pups appear to be adverse results possibly caused by infection by *P. gingivalis*. Fetal growth restriction (FGR) and PE are distinct events, considered common pregnancy complications, frequent causes of perinatal morbidity and mortality and common causes of premature births. Nardoza et al. (2017)<sup>46</sup> reported a strong association between PE and FGR due to abnormal trophoblast invasion; furthermore, all hypertensive diseases of pregnancy increase the incidence of FGR by two to three times as a result of reduced uteroplacental perfusion.

Animal models are of great importance for the study of pathologies. The current animal models of PE have limitations, and their association with PD remains poorly understood.<sup>25</sup> Numerous models of

PE induction in animals exist: spontaneous animal models of PE, surgically induced models of PE, pharmacologically/substance-induced models of PE, and genetically modified models of PE.<sup>47</sup> PE can also be modeled by infusion of LPS into animals. LPS injection into the animals raises blood pressure and prompts the following changes compared to normal pregnancy: proteinuria, decreased fetal weight, hypoxia, and placental ischemia associated with increased levels of interferon (IFN)- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM)-1.<sup>48,49</sup> Nevertheless, so far, no study using specific periodontal pathogens has been able to elicit, in animals, all the four conditions that characterize PE, namely increased blood pressure, proteinuria, alteration in the number and pups weight, and changes in



the systemic inflammatory profile. Therefore, we decided to test the association of ligature and *P. gingivalis* inoculation.

The Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) model in rats is widely applied to induce PE.<sup>50</sup> This model consists of placing silver clips around the abdominal aorta above the iliac bifurcation.<sup>51,52</sup> The right and left uterine arcades are also cut to compensate blood flow to placenta through an adaptive increase in ovarian flow. These procedures reduce uterine blood flow in pregnant rats by ~40%.<sup>53</sup> Compared to the results obtained with the RUPP model,<sup>51</sup> our results revealed increased blood pressure, which resembled increased blood pressure found by Llinás et al. (2002),<sup>54</sup> who demonstrated higher mean arterial pressure in test pregnant rats compared to control rats ( $125 \pm 3$  mmHg vs.  $100 \pm 2$  mmHg, respectively).

The RUPP model in rats elicits important aspects that are evident in PE. However, this method has limitations, including placental ischemia induced in mid-pregnancy and not in early pregnancy, which prevents the model from being employed to study early mechanisms.<sup>50</sup> Another important limitation is reduced blood flow to other organs, such as heart, kidneys, and intestines, which could impair cardiac, renal, and intestinal functions.<sup>53,55</sup> In addition, the RUPP model requires extremely specific conditions, like clipping of both lower abdominal aorta and uterine arteries at gestational day 14 in ~250-g female rats.<sup>56</sup> Moreover, RUPP does not always promote increased blood pressure in all species, or even within the same species.<sup>53</sup>

A study that used LPS injection to induce PE<sup>48</sup> reported abnormally high protein excretion in the urine when the LPS group and control group were compared ( $5.56 \pm 1.22$  mg vs.  $2.92 \pm 0.54$  mg,  $p < .05$ ). Additionally, fetal weight decreased in the LPS group compared to the control group ( $2.79 \pm 0.36$  g vs.  $3.34 \pm 0.38$  g,  $p < .05$ ), and serum cytokines levels increased in the LPS group compared to the control group (IL-1 $\beta$ :  $59.37 \pm 3.03$  pg/ml vs.  $37.91 \pm 2.78$  pg/ml, respectively; IL-6:  $91.86 \pm 5.24$  pg/ml vs.  $61.79 \pm 3.07$  pg/ml, respectively). Our results agreed with these data. We observed a fivefold increase in proteinuria levels when we compared the PE and control groups ( $233.9 \pm 133.2$  mg/dl vs.  $44.2 \pm 20.3$  mg/dl, respectively). In addition, when we compared the PE and control groups, we verified decreased fetal weight ( $3.3 \pm 0.7$  g vs.  $1.3 \pm 0.5$  g, respectively) and a twofold increase in serum IL-6 levels ( $697.6 \pm 395.3$  pg/ml vs.  $332.3 \pm 108.1$  pg/ml, respectively). Furthermore, the Pg group also showed an increase in serum IL-6 levels. These data demonstrate the change in the systemic inflammatory profile caused by infection by *P. gingivalis*.<sup>57</sup> Kunen et al. (2014)<sup>29</sup> also used the *P. gingivalis* and LPS model to induce PE in rats, but they observed limitations in this methodology. They verified that infusion of LPS and *P. gingivalis* increased maternal blood pressure, decreased placental weight, and slightly increased the amount of fetal resorption. However, protein excretion in urine remained unaltered, and there was no sign of placental or renal inflammation. Furthermore, there was no evidence of an altered systemic inflammatory response.

The association of two PD models to induce PE employed herein was effective and showed all the characteristic signs of PE. However, this pilot study has some limitations. The fact that blood pressure

monitoring was performed in just one day, makes it impossible to obtain the moment when hypertension developed during pregnancy in the PE group. One of the measures of PE severity is hypertension diagnosed early. That comes from the fact that the earlier the hypertensive condition appears in pregnancy, more severe is the disease.<sup>1</sup> The hemodynamic assessment in real time (invasive method) was chosen because it is a very reliable diagnosis method.<sup>58</sup> This method avoids environmental interferences and restriction stress. Certainly, multiple blood pressure measurements would bring more reliability to the measurements, however, to have multiple arterial pressure measurement, a permanent catheter would have to be inserted into an arterial line, which would very likely cause transient bacteremia events that could not be accepted as an additional variable in the present study.

Another limitation is the absence of an analysis of the placenta or pups to confirm the infection of the fetus-placental unit by periodontopathic microorganism (*P. gingivalis* W83) utilized in this experimental model of PE. Studies in the literature have indicated the presence of periodontopathogens in placenta of women with PE. The association between PD and PE suggests a change in the local and systemic inflammatory profile and the possible participation of periodontal inflammation in the pathogenesis of PE.<sup>25-27</sup> In addition, an interesting point is that infection by *P. gingivalis* W83 alone was not sufficient for PD establishment (characterized by alveolar bone loss), but it did induce systemic pathological changes. The Pg group showed subtle increase in blood pressure, decrease in litter size, fetal weight and increase in serum IL-6 levels. It is known that *P. gingivalis* has mechanisms that affect the host's innate immune response, activating the release of pro-inflammatory cytokines, while it also induces neutrophil and macrophage dysfunction.<sup>57</sup> Such findings are in line with the systemic changes observed in the Pg group. However, other factors may have influenced the lack of periodontal disease development in this group, including the number of inoculations, the rat lineage of the rats used, the bacterial strain used, and the short trial period (limited by pregnancy). These data corroborate those of Molon et al. (2014)<sup>59</sup> who also observed that mice that received only the inoculation of *P. gingivalis* or the combination of *P. gingivalis* with *Fusobacterium nucleatum*<sup>60</sup> did not develop characteristics of periodontal disease under the conditions studied by those authors.

This pilot study has been the first study that tested the association of physical trauma together with microbial challenge as a new model of PE induction. Obviously, this model needs to be improved so that it can be really considered useful for researchers aiming to study the mechanisms involved in the development of PE. Although our blood pressure results were not as high as the results achieved with the RUPP model, blood pressure increased in the PE group compared to the control group. Adjusting the doses and frequency of *P. gingivalis* inoculation could further increase blood pressure in this group. Periodically monitoring blood pressure can also provide valuable data for PE research. Using other periodontopathogens or health-associated species can also be an interesting alternative for future studies in order to elucidate possible mechanisms involved.



On the other hand, under certain circumstances, considering a model that better mimics certain conditions (such as the very exposure to periodontopathogenic bacteria and the challenges that this exposure imposes to an organism) might be relevant, even though such model might not elicit the very high increase in blood pressure seen in pregnant rats studies with the RUPP model.

In conclusion, this article has presented a possible new model of PE in rats. This model resulted from a pilot experiment that associated two models of induction of periodontal diseases. In the setting of this initial study, the pregnant rats developed all the essential aspects of PE: increased blood pressure, proteinuria, and altered fetal development.

#### CONFLICTS OF INTEREST

None to disclose.

#### ORCID

Atila Vinicius Vitor Nobre  <https://orcid.org/0000-0002-5416-3994>

Pedro Henrique Felix Silva  <https://orcid.org/0000-0002-7583-7046>

Rene Seabra Oliezer  <https://orcid.org/0000-0003-0608-0235>

Marina Constante Gabriel Del-Arco  <https://orcid.org/0000-0002-5080-0060>

Michel Reis Messora  <https://orcid.org/0000-0001-8485-9645>

José Eduardo Tanus-Santos  <https://orcid.org/0000-0002-9945-9633>

Raquel Fernanda Gerlach  <https://orcid.org/0000-0002-7031-2128>

Sergio Luiz Salvador  <https://orcid.org/0000-0002-4867-7294>

#### REFERENCES

1. ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2019.
2. Ma'ayeh M, Rood KM, Kniss D, Costantine MM. Novel Interventions for the prevention of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2020;22(2):1-8.
3. Vest AR, Cho LS. Hypertension in pregnancy. NICE clinical guideline 107. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(3):395.
4. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol.* 1996;67(10 Suppl):1103-1113
5. Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, et al. Global, regional, and national levels and trends in burden of oral conditions from 1990 to 2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J Dent Res.* 2020;99(4):362-373.
6. Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Clin Periodontol.* 2018; 45:5130-5148.
7. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med.* 2015;21(3):172-183.
8. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;89:S173-S182.
9. Ifesanya J, Ifesanya A, Asuzu M, Oke G. Determinants of good oral hygiene among pregnant women in ibadan, south-western Nigeria. *Ann Ibadan Postgrad Med.* 2011;8(2):95-100.
10. Contreras A, Herrera JA, Soto JE, Arce RM, Jaramillo A, Botero JE. Periodontitis is associated with preeclampsia in pregnant women. *J Periodontol.* 2006;77(2):182-188.
11. Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Clin Periodontol.* 2013;40:S170-S180.
12. Kunnen A, Blaauw J, Van Doormaal JJ, et al. Women with a recent history of early-onset pre-eclampsia have a worse periodontal condition. *J Clin Periodontol.* 2007;34(3):202-207.
13. Siqueira FM, Cota LOM, Costa JE, Haddad JPA, Lana ÂMQ, Costa FO. Maternal periodontitis as a potential risk variable for pre-eclampsia: a case-control study. *J Periodontol.* 2008;79(2):207-215.
14. Puertas A, Magan-Fernandez A, Blanc V, et al. Association of periodontitis with preterm birth and low birth weight: a comprehensive review. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.* 2018;31(5):597-602.
15. Vinturache AE, Gyamfi-Bannerman C, Hwang J, Mysorekar IU, Jacobsson B. Maternal microbiome - a pathway to preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016;21(2):94-99.
16. Moliterno LFM, Monteiro B, Da Silva Figueredo CM, Fischer RG. Association between periodontitis and low birth weight: a case-control study. *J Clin Periodontol.* 2005;32(8):886-890.
17. Moore S, Ide M, Coward PY, et al. A prospective study to investigate the relationship between periodontal disease and adverse pregnancy outcome. *Br Dent J.* 2004;197(5):251-258.
18. Gomes-Filho IS, Da Cruz SS, Rezende EJC, et al. Periodontal status as predictor of prematurity and low birth weight. *J Public Health Dent.* 2006;66(4):295-298.
19. Daalderop LA, Wieland BV, Tomsin K, et al. Periodontal disease and pregnancy outcomes: overview of systematic reviews. *JDR Clinical and Translational Research.* 2018;3(1):10-27.
20. Corbella S, Taschieri S, Del Fabbro M, Francetti L, Weinstein R, Ferrazzi E. Adverse pregnancy outcomes and periodontitis: a systematic review and meta-analysis exploring potential association. *Quintessence Int (Berl).* 2016;47(3):193-204.
21. Boggess KA, Lief S, Murtha AP, Moss K, Beck J, Offenbacher S. Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003;101(2):227-231.
22. Reyes L, Phillips P, Wolfe B, et al. Porphyromonas gingivalis and adverse pregnancy outcome. *J Oral Microbiol.* 2017;9(1):1374153.
23. Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA. Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease. *J Dent Res.* 2012;91(9):816-820.
24. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30-44.
25. Chaparro A, Blanlot C, Ramirez V, et al. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola and toll-like receptor 2 are associated with hypertensive disorders in placental tissue: a case-control study. *J Periodontol Res.* 2013;48(6):802-809.
26. Barak S, Oettinger-Barak O, Machtei EE, Sprecher H, Ohel G. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. *J Periodontol.* 2007;78(4):670-676.
27. Swati P, Thomas B, Vahab SA, Kapaettu S, Kushtagi P. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(3):613-619.
28. Michelin MCAN, Teixeira SRL, Ando-Sugimoto ES, Lucas SRR, Mayer MPA. Porphyromonas gingivalis infection at different gestation periods on fetus development and cytokines profile. *Oral Dis.* 2012;18(7):648-654.
29. Kunnen A, van Pampus MG, Aarnoudse JG, van der Schans CP, Abbas F, Faas MM. The effect of porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on pregnancy in the rat. *Oral Dis.* 2014;20(6):591-601.
30. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the arrive guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412.
31. Messora MR, Pereira LJ, Foureaux R, et al. Favourable effects of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis on experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2016;66:108-119.

32. de Moura Mattaraia VG, Moura ASAMT. Produtividade de ratos wistar em diferentes sistemas de acasalamento. *Cienc Rural*. 2012;42(8):1490-1496.
33. Duan X, Hays A, Zhou W, et al. Porphyromonas gingivalis induces exacerbated periodontal disease during pregnancy. *Microb Pathog*. 2018;124:145-151.
34. Messora MR, Oliveira LFF, Foureaux RC, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2013;84(12):1818-1826.
35. Prates TP, Taira TM, Holanda MC, et al. NOD2 contributes to porphyromonas gingivalis-induced bone resorption. *J Dent Res*. 2014;93(11):1155-1162.
36. Mata KM, Prudente PS, Rocha FS, et al. Combining two potential causes of metalloproteinase secretion causes abdominal aortic aneurysms in rats: a new experimental model. *Int J Exp Pathol*. 2011;92(1):26-39.
37. Mata KM, Fernandes CR, Tefé-Silva C, Floriano EM, Gerlach RF, Ramos SG. Response to the "letter regarding Interference of doxycycline pretreatment in a model of abdominal aortic aneurysms". *Cardiovascular Pathology*. 2015;24(4):260-261.
38. Furlaneto FAC, Nunes NLT, Oliveira Filho IL, et al. Effects of Locally Administered Tiludronic Acid on Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol*. 2014;85(9):1291-1301.
39. Meulman T, Peruzzo DC, Stipp RN, et al. Effects of locally administered tiludronic acid on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2011;46(5):629-636.
40. Palioto DB, Finoti LS, Kinane DF, Benakanakere M. Epigenetic and inflammatory events in experimental periodontitis following systemic microbial challenge. *J Clin Periodontol*. 2019;46(8):819-829.
41. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013;394(1-2):49-54.
42. Hajishengallis G, Hajishengallis E, Kajikawa T, et al. Complement inhibition in pre-clinical models of periodontitis and prospects for clinical application. *Semin Immunol*. 2016;28(3):285-291.
43. León R, Silva N, Ovalle A, et al. Detection of Porphyromonas gingivalis in the Amniotic Fluid in Pregnant Women With a Diagnosis of Threatened Premature Labor. *J Periodontol*. 2007;78(7):1249-1255.
44. Komine-Aizawa S, Aizawa S, Hayakawa S. Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;83(1):175-188.
45. Falcao A, Bullón P. A review of the influence of periodontal treatment in systemic diseases. *Periodontol 2000*. 2019;79(1):117-128.
46. Nardoza LMM, Caetano ACR, Zamarian ACP, et al. Fetal growth restriction: current knowledge. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(5):1061-1077.
47. Erlandsson L, Nääv Å, Hennessy A, et al. Inventory of novel animal models addressing etiology of preeclampsia in the development of new therapeutic/intervention opportunities. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):402-410.
48. Wang LL, Yu Y, Guan HB, Qiao C. Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of preeclampsia. *Reprod Sci*. 2016;23(8):1058-1070.
49. Robb KP, Cotechini T, Allaire C, Sperou A, Graham CH. Inflammation-induced fetal growth restriction in rats is associated with increased placental HIF-1 $\alpha$  accumulation. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175805.
50. Marshall SA, Hannan NJ, Jelinic M, Nguyen TPH, Girling JE, Parry LJ. Animal models of preeclampsia: translational failings and why. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2018;314(4):R499-R508.
51. Li W, Mata KM, Mazzuca MQ, Khalil RA. Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy. *Biochem Pharmacol*. 2014;89(3):370-385.
52. Mazzuca MQ, Li W, Reslan OM, Yu P, Mata KM, Khalil RA. Downregulation of microvascular endothelial type B endothelin receptor is a central vascular mechanism in hypertensive pregnancy. *Hypertension*. 2014;64(3):632-643.
53. Li J, LaMarca B, Reckelhoff JF. A model of preeclampsia in rats: The reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2012;303(1):H1-H8.
54. Llinás MT, Alexander BT, Seedeck M, Abram SR, Crell A, Granger JP. Enhanced thromboxane synthesis during chronic reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Am J Hypertens*. 2002;15(9):793-797.
55. Sholook MM, Gilbert JS, Sedeek MH, Huang M, Hester RL, Granger JP. Systemic hemodynamic and regional blood flow changes in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2007;293(4):H2080-H2084.
56. Ojeda NB, Grigore D, Alexander BT. Intrauterine growth restriction: fetal programming of hypertension and kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2008;15(2):101-106.
57. Chopra A, Radhakrishnan R, Sharma M. Porphyromonas gingivalis and adverse pregnancy outcomes: a review on its intricate pathogenic mechanisms. *Crit Rev Microbiol*. 2020;46(2):213-236.
58. Parasuraman S, Raveendran R. Measurement of invasive blood pressure in rats. *J Pharmacol Pharmacother*. 2012;3(2):172.
59. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol*. 2014;85(3):465-477.
60. 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. *Clin Oral Investig*. 2016;20(6):1203-1216.

**How to cite this article:** Mata K, Nobre AV, Felix Silva PH, et al. A new mixed model of periodontitis-induced preeclampsia: A pilot study. *J Periodont Res*. 2021;00:1-9. <https://doi.org/10.1111/jre.12869>

**ANEXO C** – Artigo submetido ao *Journal of Clinical Periodontology*

**Title:** Probiotic consumption reduces local and systemic harms of experimental periodontitis in pregnant rats

Nobre AVV<sup>1</sup>, Silva PHF<sup>1</sup>, Del-Arco MCG<sup>2</sup>, Gerlach RF<sup>3</sup>, Oliezer RS<sup>3</sup>, Tanus-Santos JE<sup>4</sup>, Figueiredo LC<sup>5</sup>, Evangelista JSAM<sup>6</sup>, Furlaneto FAC<sup>1</sup>, Messoria MR<sup>1</sup>, Salvador SL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, Ribeirao Preto Dental School, University of São Paulo-USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Science, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo-USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Basic and Oral Biology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirao Preto, SP 14049-900, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, Sao Paulo, Brazil

<sup>6</sup>Faculty of Veterinary, State University of Ceara, 60714-903, Fortaleza, Ceara, Brazil

**Corresponding author:**

Dr. Sergio L. Salvador

Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Science, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo-USP, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

Phone: +55 – 16 – 3315-4167; e-mail address: [sldssalv@usp.br](mailto:sldssalv@usp.br)

**Running title:** Probiotics cause benefits in pregnant rats with periodontitis

**Word count:** 3.500

**Number of references:** 50

**Number of figures:** 07

**Conflicts of interest:** None to disclose

**Sources of funding:** CAPES

**Keywords:** periodontitis, probiotics, *Porphyromonas gingivalis*, pregnancy

**Abstract**

**Aim:** To investigate the effects of systemic administration of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) in pregnant rats with experimental periodontitis (EP).

**Materials and methods:** Forty-eight pregnant rats were divided into four different groups (n=12): Control (C), Probiotic (PROB), Periodontitis (PD) and Periodontitis + Probiotic (PD-PROB). PROB was administered systemically, added daily to the animals' water for 40 days. EP was induced by placing a silk ligature on the 4th gestational day and oral gavage of *Porphyromonas gingivalis* for 15 days. On the 19th gestational day, the animals were weighed and euthanized, and biologic materials were collected for analyses. Data were statistically analyzed ( $p<0.05$ ).

**Results:** EP increased bacterial diversity in the oral microbiota. PD-PROB group showed lower values of Bowman's capsule diameter and circumference and glomerular diameter and circumference, compared with the PD group ( $p<0.05$ ). Greater bone volume (BV) in the furcation region, number and thickness of bone trabeculae, and lower bone porosity and separation among trabeculae ( $p<0.05$ ) could also be observed in the PD-PROB group in relation to the PD group.

**Conclusions:** Probiotic consumption promotes local and systemic benefits in pregnant rats with EP, mainly by protective effect against ABL and kidney damage.

## 1. Introduction

Periodontitis (PD) is an infectious-inflammatory periodontal disease associated with alteration of the natural balance of the subgingival microbiota, favoring the overgrowth of periodontopathic gram-negative anaerobic fastidious species (Lamont & Hajishengalis, 2015; Caton et al., 2018). The knowledge about the effects of PD on systemic health gave rise to the term Periodontal Medicine (Williams & Offenbacher, 2000; Beck et al., 2019). This branch of Periodontics studies the relationship between periodontal diseases and systemic diseases, including diabetes mellitus (DM), cardiovascular diseases and adverse pregnancy outcomes (APO) (Bobetsis et al., 2020).

The relationship between PD and APO has been widely explored in the literature. Premature birth (PP), low birth weight (LBW) and preeclampsia (PE) are the main gestational complications associated with PD, through different mechanisms of action (Conde-Agudelo et al., 2008; Daalderop et al., 2018). The etiology of APO is multifactorial, but it is known that maternal infection and inflammation directly affect the neonatal outcome. Periodontal infection can result in the spread of microorganisms and their toxic by-products into the systemic circulation and allow for metastatic infection in the fetal-placental unit (Madianos et al., 2013; Krüger et al., 2019). Thus, advances in science about the pathophysiology of APOs indicate the prevention of infections and maternal metabolic disorders as strategies for eradication (Conde-Agudelo et al., 2008; Madianos et al., 2013).

The “gold-standard” treatment for PD consists of mechanical debridement of the biofilm and subgingival calculus, through scaling and root planing (SRP) of the surfaces affected by PD, associated with effective control of the supragingival biofilm, but this therapy alone is not always able to reverse the clinical situation, especially in diseases in advanced stages and degrees (Cobb & Sottosanti, 2021). The use of probiotic bacteria appears as an adjuvant therapeutic approach to SRP, since they have immunomodulatory capacity of the host's inflammatory response, in addition to modifying the oral and intestinal microbiota (Furlaneto et al., 2022). Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization describes probiotics as “live microorganisms that, which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” (Hill et al., 2014). Several studies have described the potential benefits of probiotics in systemic health, such as control of total cholesterol and low-density lipoprotein levels, and regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system, and in medical disorders, such as gastrointestinal diseases, metabolic syndrome, and irritable bowel syndrome (Broekaert & Walker, 2006; Guo et al., 2011; Barreto et al., 2014; Khalesi et al., 2014). As for the use of probiotics in pregnancy, it was reported that

dietary intervention with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) reduced the incidence of gestational diabetes in humans (Luoto et al., 2010). Clinical and preclinical studies have shown therapeutic benefits of probiotics in the prevention of PP, by controlling systemic and intrauterine inflammation and by modulating the maternal vaginal microbiota (Vitali et al., 2012; Yang et al., 2014).

The relationship between APO and PD remains controversial in the literature. This may be due to the presence of confounding factors in clinical studies, such as the non-exclusion of systemic conditions considered to modify PD in pregnant women, as well as the various methodologies used to assess PD, study design, sample size, and heterogeneity of the study population (Chambrone et al., 2011; Wei et al., 2013). Only one study reported the impact of probiotic therapy on gingivitis associated with pregnancy (Schlagenhauf et al., 2016). To the best of our knowledge, there are no studies investigating the impact of probiotic therapy on the association between PD and pregnancy. Thus, the objectives of the present study are to evaluate the effects of PD in pregnancy of rats and if the probiotic therapy with *B. lactis* HN019 can promote benefits in this interface.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Animals and sample size calculation

This study was carried out respecting the ethical principles of animal experimentation and following the guidelines of the ARRIVE Guidelines (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments). All procedures were reviewed and approved by the Ethics Committee on Animals Experimentation at the School of Dentistry of Ribeirao Preto - University of Sao Paulo FORP/USP (protocol 2018.1.800.58.8).

The calculation of the sample size was performed according to a previous study (Oliveira et al., 2017). Considering that some animals could not develop PD due to the loss of the ligature and the possibility of some rats not becoming pregnant, four animals were added as a safety margin, totaling twelve animals per group.

### 2.2 Experimental design and groups

Forty-eight female and 24 male *Sprague-Dawley* rats SPF strain (free of specific pathogens) were used, from the Central Animal Facility at USP Ribeirao Preto, aged between 7 and 8 weeks. The room was acclimatized at a temperature of  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  and with 12/12-hour light-dark cycles. They were fed with a selected solid diet and water *ad libitum*. The mating protocol was performed when all females reached 10 weeks of age, in a dark environment, using the harem system, that is, 2 females for 1 male (Mattaraia & Moura, 2012). For confirmation of the pregnancy, vaginal lavage was performed to observe sperm using optical microscopy (Duan et al., 2018). The experimental design is depicted in Figure 1.

Female pregnant rats were randomly allocated into one of the following groups (n=12): **C** (control, without PD); **PROB** (control + probiotic); **PD** (induced PD); and **PD-PROB** (induced PD + probiotic).

### 2.3 Periodontitis induction

PD was induced using a combination of two techniques: the placement of silk ligature and the oral gavage of *Porphyromonas gingivalis* W83 to ensure the local and systemic effect of the disease. The PD induction protocol began with the systemic administration of Bactrim<sup>®</sup> - sulfamethoxazole 200 mg and trimethoprim 40 mg (Roche<sup>®</sup>, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, RJ) for 7 days (once a day) for indigenous microbiota depletion, followed by 3 days of wash-out. Each tablet was macerated, diluted in 1 mL of distilled water, and inoculated via gavage in the animals that received the infection protocol.



Animals that did not receive the infection protocol (C and PROB groups) received gavage of 1 mL of distilled water as a sham procedure.

### 2.3.1 Ligature

At gestational day 4, the animals were anesthetized with intraperitoneal injection of xylazine (10 mg/kg of body weight) and ketamine (80 mg/kg body of weight). A silk ligature was placed around mandibular first molars (MFM) of the animals, as previously described (Oliveira et al., 2017).

### 2.3.2 *Porphyromonas gingivalis* W83 inoculation

Oral gavage of *P. gingivalis* W83 in the PD and PD-PROB groups started on the gestational day 4 and continued for 15 days, as previously described (Mata et al., 2021). Animals that did not receive the infection received 2% carboxymethylcellulose in gavage on the same days and times.

## 2.4 Preparation of probiotic cultures and administration to the animals

*B. lactis* HN019 was prepared and cultured according to the protocol described previously (Oliveira et al., 2017). In the PROB and PD-PROB groups, the probiotic was added daily to the animals' water in the proportion of  $1 \times 10^{11}$  colony forming units (CFU) from arrival at the vivarium until the end of the experiment. Daily consumption of water was in mean 47.5 mL per animal.

## 2.5 Euthanasia and sample collection

At gestational day 19, the animals were weighed and anesthetized by inhalation of 2% isoflurane and euthanasia was performed by administering a xylazine and ketamine overdose. Urine was collected directly from the bladder for biochemical analysis. In groups C and PROB, subgingival biofilm samples were collected using sterilized microbrushes. In the PD and PD-PROB groups, the biofilm was collected along with the ligatures placed around the MFMs. All samples were instantly placed in sterile microtubes containing 150 mL of buffered solution (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7.6). Microtubes were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for microbiological analysis. Subsequently, an incision was made in the abdominal region to remove the pups, placentas and kidneys. Pups and placentas were carefully removed from the uterus, washed with ice-cold ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 0.9% saline. The right hemi-mandibles were used for microtomographic analysis.



## **2.6 Maternal, fetal and placental parameters**

Maternal weight (MW), pups weight (PW), pups number per mother (PN), and placental weight were analyzed and measured using a high-precision scale. Length and weight were expressed in centimeters (cm) and grams (g), respectively.

## **2.7 Microcomputed tomography (Micro-CT) analysis of the mandibles**

Non-demineralized specimens were scanned by a cone beam micro-CT system (Skyscan 1174, Bruker, Kontich, Belgium). The x-ray generator was operated with an acceleration potential of 60 kV, current of 165  $\mu$ A and exposure time of 650 ms per projection. Images were produced with a voxel size of 6x6x6  $\mu$ m. Volumetric measurements were performed as described by Oliveira et al., (2017). In MFM, the parameters analyzed were: 1) bone volume (BV) in the area of interest (VOI); 2) bone porosity (BP); 3) trabecular thickness (Tb.Th); 4) trabecular number (Tb.N) and 5) trabecular separation (Tb.Sp).

## **2.8 Microbiological analysis of oral microbiota**

Counts of 40 bacterial species were performed in each sample of the oral microbiota, using the checkerboard DNA–DNA hybridization technique (Socransky et al., 1994) as previously described (Oliveira et al., 2017).

## **2.9 Biochemical analysis**

After euthanasia, urine was collected directly from the bladder and stored in sterilized tubes. A random sample was used to quantify proteins and creatinine (CR) in urine. The colorimetric Bioclin Test (Bioprot U/LCR, Belo Horizonte, MG, Brazil) was employed, following the manufacturer's recommendations. The red pyrogallol method was used to quantify proteinuria (PR), and the modified Jaffé method for urine CR. The results of PR and CR were expressed in milligrams per deciliter (mg/dL).

### **2.10 Histopathology and histomorphometry analyses of the kidneys**

The sagittal half of the right kidney was fixed in a 10% buffered solution and processed as previously described (França et al., 2017). Serial sections 5  $\mu\text{m}$  thick were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histomorphometric evaluation was performed according to a previous study (Imafidon et al., 2016) by a blinded examiner (PHFS) using Image J software (Rasband, WS, USA). The parameters assessed were as follows the diameter and area of the glomerulus, the circumference of the glomerulus and Bowman's capsule ( $\mu\text{m}^2$ ). Histopathological analysis was performed by a specialist in veterinary histology (JSAME) blinded to the experimental groups and evaluated parameters were degree of inflammation, cellularity pattern, intratubular inflammatory infiltrate content and renal tissue structure.

### **3. Statistical analyses**

Normality and homoscedasticity of the data were verified. The significance level was set at 5%. The significance of differences among groups for microtomographic, histomorphometric, biochemical parameters was assessed by analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey test. Regarding the microbiological data, the total DNA probe count for each species and the proportions of each species in relation to the total DNA count of the 40 bacterial species evaluated were computed for each animal and then averaged within the experimental groups. Significance of differences between groups was determined using Kruskal-Wallis test followed by post hoc Dunn test.

## **4. Results**

### **4.1 Maternal, pups and placental measurements**

Figure 2 (A, B, C and D) shows the medians and interquartile deviations for MW, PW, PN and PW, respectively. PD group showed a significant reduction in MW compared with PROB group ( $p < 0.05$ ). Regarding PW, PD group showed pups with lower weight compared with PROB group ( $p < 0.05$ ). PROB group showed the highest PN ( $p < 0.05$ ). There was no difference in placental weight between groups. Figures 2E and 2F depict representative images of the size of the pups and placentas, respectively, among groups.

#### 4.2 Microcomputed tomography (Micro-CT) analysis of mandibles

In the microtomographic analysis, the PD group showed greater alveolar bone destruction compared with the PD-PROB group and the other groups ( $p < 0.05$ ). Reduced BV (Figure 3A), Tb.Th (Figure 3C) and Tb.N (Figure 3D) were observed in the VOI of the PD group compared with other groups ( $p < 0.05$ ). In addition, greater BP (Figure 3B) and Tb.Sp (Figure 3E) was observed in PD group compared with other groups ( $p < 0.05$ ).

Representative images of the three-dimensional rendered reconstructions of the microtomographic sections of the hemi-mandible of the animals of all groups can be observed in Figure 3F.

#### 4.3 Microbiological analysis of oral microbiota

It was possible to detect bacteria in samples of oral microbiota of all groups. Figure 4 (A, B, C and D) shows the percentages of DNA probe counts of bacterial like species of Socransky's complexes. We can observe that there was a statistical difference between bacterial species of all complexes.

#### 4.4 Biochemical analysis

Protein excretion in urine was significantly higher in the PD group compared with C and PROB groups ( $p < 0.05$ ) (Figure 5A). In addition, there was a statistically significant increase in urine CR excretion in the PD group compared with C group (Figure 5B). The PD group showed a statistically significant increase in the urine PR/CR ratio compared to the C group ( $p < 0.05$ ) (Figure 5C).

#### 4.5 Histopathology and histomorphometry analyses of kidneys

The PD group presented a significant increase in Bowman's capsule space (Figure 6A), Bowman's capsule circumference (Figure 6B), glomerular circumference (Figure 6C) and glomerular diameter (Figure 6D) when compared with all the other groups ( $p < 0.05$ ).

In the histopathological analysis, PD group presents significant alterations in the kidney tissue architecture, such as presence of intratubular proteinaceous material, intravascular basophilic material, intense presence of congested vessels, slight hemorrhage, and moderate interstitial edema. Moderate to intense lymphoplasmacytic inflammatory foci in the medulla. Mild fibrosis in the medullary region. PD-PROB group also presented signs of kidney damage, but less expressive when compared with the PD group (Figure 7A, B, C and D).

## 5. Discussion

The present study is the first one to evaluate the effects of probiotic therapy with *B. lactis* HN019 in pregnant rats with PD. According to our findings, a negative impact of PD on pregnant rats was observed, at both local and systemic levels, including damage to fetal development, and probiotic therapy was able to mitigate such effects. Among the negative effects of PD, we highlight alveolar bone loss (ABL), increase in the expression of PR and CR in the urine, kidney alterations, as well as reductions in MW, PW and PN. Systemic administration of *B. lactis* HN019 reduced ABL in pregnant rats with experimental PD and reduced changes in kidneys. Despite the results, it is important to emphasize that the route, frequency and dosage of probiotic administration, as well as the strain used, can impact the results.

Regarding the anatomical parameters, it was observed that PD affected MW during pregnancy. The PD and PD-PROD groups showed a significant weight reduction, compared to PROB group. In addition, PD group showed pups with lowest birth weight compared to PROB group, and PD-PROD group showed a smaller litter compared to PROB group. This finding is aligned with the study of Liang et al., (2018), who reported a significant MW reduction, PW and PN in pregnant rats infected with *P. gingivalis* ATCC 33277 associated with ligature and also with previous findings conducted of our research group (Mata et al., 2021). We can observe that the systemic administration of *B. lactis* HN019 regulated the PW, where the PD-PROD group showed pups with weight similar to C group. This can be explained by the ability of probiotics to modulate microbial communities, promoting the growth and survival of commensal species potentially beneficial to systemic health (Weichert et al., 2012). Furthermore, it has been reported that probiotics can reduce the expression of genes associated with virulence factors of *P. gingivalis* and block pathogenic mechanisms of this periodontal pathogen, interfering with its ability to colonize and subvert the host immune response (Ishikawa et al., 2020).

The PD group had the worst results in micro-CT analysis of the alveolar bone. Lower values of BV and Tb.Th in the furcation region could be observed in the PD and PD-PROD groups in relation to C and PROB groups. Lower Tb.N and higher Tb.S could be observed in the PD group in relation to other groups. Higher percentage of BP was observed in the PD and PD-PROD group, compared to the PROB group. The PD-PROD group showed intermediate BP values compared to PROB and PD groups. We can observe intermediate values of BV and Tb.Th between the PD-PROD group and the C and PD groups, indicating a protective effect of the probiotic on ABL. These findings are in line with previous studies which used the strain *B.*

*lactis* HN019 in systemically healthy or compromised rats (Oliveira et al., 2017; Cardoso et al., 2020; Silva et al., 2022). *B. lactis* HN019 has immunomodulatory potential with the ability to reduce Th1 pro-inflammatory cytokines and increase the expression of Th2 anti-inflammatory cytokines (Oliveira et al., 2023). Probiotic therapy, through the modulation of the intestinal microbiota, can promote benefits in suppressing alveolar bone loss, by different mechanisms of action (Maekawa & Hajishengallis, 2014). Among them, the modulation of the RANK-RANKL pathway, and osteoprotegerin (RANK-RANKL-OPG). Probiotic bacteria can reduce bone resorption by increasing OPG expression (Britton et al., 2014).

The microbiological findings of the present study indicated an increase in bacterial diversity in the oral microbiota of groups with disease (PD and PD-PROB groups) compared with the groups without disease (C and PROB). The PD group showed a significant increase in purple complex species (*V. parvula*, *A. odontolyticus*) compared with the other groups. *Veillonella spp* and *Actinomyces spp* are commensal microorganisms of the oral cavity. They are considered early colonizers of tooth surfaces, and essential for biofilm formation and coaggregation of late colonizers, such as gram-negative orange and red complexes. The greater ABL observed in the PD group can be explained by the high detection of *V. parvula* like species in this group. This bacterial species provides growth factor for *P. gingivalis*, and produces menadione, one of the essential nutrients for the growth of periodontal pathogens such as *P. gingivalis* (Hojo et al., 2008; Zhou et al., 2016). *V. parvula* also has two properties that allow this species to be considered a bridge to the development of potentially pathogenic oral biofilms. One is the ability to physically coaggregate with early and late colonizers (Kolenbrander et al., 2010), another is the use of lactate as the main source of carbon and energy (Rogosa, 1964). These properties allow *Veillonella* species to colonize the oral biofilm, physically attach to pioneer colonizers such as *Streptococcus* species, and use the lactic acid secreted by streptococci as a source of carbon and energy to grow, facilitating the growth of less oxygen-tolerant anaerobes (Zhou et al., 2016; Hoare et al., 2021).

The PD group had significantly higher levels of PR and urine CR compared with C group. Our findings are aligned with those of Mata et al., (2021) who reported a 5-fold increase in PR levels in pregnant rats with PD, simulating an experimental PE model. Pregnant women with PD have been reported to have higher 24h PR values and an increased risk of PE (Contreras et al., 2006). The random urine PR/CR ratio is an alternative, quick and simple method of detecting and estimating the quantitative assessment of PR that eliminates the need for daily 24h urine collection in the monitoring of kidney disease, DM, hypertension and PE (Kamińska et al., 2020). Studies have demonstrated the effectiveness of the urinary PR/CR ratio as a simple

laboratory tool to predict APO (Cheung et al., 2016; Bhadarka et al., 2018; Stefańska et al., 2020). The present study showed significantly higher levels, in mg/dL, of the PR/CR ratio in the urine of the PD group, compared with C group.

Our findings showed histological and histomorphometric changes in the kidney of the pregnant rats associated with PD, and systemic administration of *B. lactis* HN019 reduced these changes. The rats of the PD group showed a significant increase in all the parameters evaluated (Bowman's capsule space and circumference, and glomerular diameter and circumference). The PD-PROB group showed intermediate values between the PD group and the controls (C and PROB). Our results corroborate the findings of França et al., (2017) and Galeno et al., (2021) who demonstrated structural damage in the kidney of rats with ligature-induced PD. In this context, it is important to highlight a literature review with meta-analysis of RCTs which evaluated the effects of prebiotics, probiotics and synbiotics on patients with chronic kidney disease (CKD). The most used probiotics were *Bifidobacterium spp* and *Lactobacillus spp* and it was concluded that microbial therapies promoted significantly beneficial effects on systemic inflammatory markers (C-reactive protein), oxidative stress indicators (malondialdehyde, glutathione and total antioxidant capacity) and lipid profile (total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol) of patients with CKD (Zheng et al., 2021).

This study has limitations inherent in experimental studies in animals. Immunoinflammatory profile, as well as microbiological analysis involving sequencing, both in placental and periodontal tissues would be ideal to consolidate this study.

Despite these limitations, it seems that probiotics have promising potential as an adjuvant strategy in the periodontitis/pregnancy association.

## 6. Conclusions

We can conclude that experimental PD in pregnant rats causes local and systemic damage and that therapy with *B. lactis* HN019 seems to promote a protective effect on ABL and renal alterations in the PD/pregnancy association.

## References

Barreto, F. M., Colado Simão, A. N., Morimoto, H. K., Batisti Lozovoy, M. A., Dichi, I., & Helena da Silva Miglioranza, L. (2014). Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition*, 30(7–8). DOI: [10.1016/j.nut.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.12.004)

Bhadarka, N., Poddar, K., & Joshi, S. (2018). Utilization of urine protein/creatinine ratio in pregnancy for diagnosis of preeclampsia. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 7(9). DOI: <https://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20183769>

Beck, J. D., Papapanou, P. N., Philips, K. H., & Offenbacher, S. (2019). Periodontal Medicine: 100 Years of Progress. *Journal of Dental Research*, 98(10). DOI: [10.1177/0022034519846113](https://doi.org/10.1177/0022034519846113)

Bobetsis, Y. A., Graziani, F., Gürsoy, M., & Madianos, P. N. (2020). Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes. *Periodontology 2000* (Vol. 83, Issue 1). DOI: [10.1111/prd.12294](https://doi.org/10.1111/prd.12294)

Britton, R. A., Irwin, R., Quach, D., Schaefer, L., Zhang, J., Lee, T., Parameswaran, N., & McCabe, L. R. (2014). Probiotic *L. reuteri* Treatment Prevents Bone Loss in a Menopausal Ovariectomized Mouse Model. *Journal of Cellular Physiology*, 229(11). DOI: [10.1002/jcp.24636](https://doi.org/10.1002/jcp.24636)

Broekaert, I. J., & Walker, W. A. (2006). Probiotics and chronic disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3). DOI: [10.1097/00004836-200603000-00021](https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00021)

Cardoso, R. S., Messoria, M. R., Silva, P. H. F., Oliveira, L. F., Leite-Panissi, C., Salvador, S., Casarin, R., Novaes, A. B., Palioto, D. B., & Furlaneto, F. A. C. (2020). Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis. *Beneficial Microbes*, 11(1). DOI: [10.3920/BM2019.0038](https://doi.org/10.3920/BM2019.0038)

Caton, J., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K., L. Mealey, B., Papapanou, P. N., Sanz, M., & S. Tonetti, M. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45. DOI: [10.1111/jcpe.12935](https://doi.org/10.1111/jcpe.12935)

Chambrone, L., Pannuti, C. M., Guglielmetti, M. R., & Chambrone, L. A. (2011). Evidence grade associating periodontitis with preterm birth and/or low birth weight: II. A systematic review of randomized trials evaluating the effects of periodontal treatment.



*Journal of Clinical Periodontology* (Vol. 38, Issue 10). DOI: [10.1111/j.1600-051X.2011.01761.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01761.x)

Cheung, H. C., Leung, K. Y., & Choi, C. H. (2016). Diagnostic accuracy of spot urine protein-to-creatinine ratio for proteinuria and its association with adverse pregnancy outcomes in Chinese pregnant patients with pre-eclampsia. *Hong Kong Medical Journal*, 22(3). DOI: [10.12809/hkmj154659](https://doi.org/10.12809/hkmj154659)

Cobb, C. M., & Sottosanti, J. S. (2021). A re-evaluation of scaling and root planing. *Journal of Periodontology* (Vol. 92, Issue 10, pp. 1370–1378). DOI: [10.1002/JPER.20-0839](https://doi.org/10.1002/JPER.20-0839)

Conde-Agudelo, A., Villar, J., & Lindheimer, M. (2008). Maternal infection and risk of preeclampsia: Systematic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 198, Issue 1). DOI: [10.1016/j.ajog.2007.07.040](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.07.040)

Contreras, A., Herrera, J. A., Soto, J. E., Arce, R. M., Jaramillo, A., & Botero, J. E. (2006). Periodontitis Is Associated With Preeclampsia in Pregnant Women. *Journal of Periodontology*, 77(2). DOI: [10.1902/jop.2006.050020](https://doi.org/10.1902/jop.2006.050020)

Daalderop, L. A., Wieland, B. V., Tomsin, K., Reyes, L., Kramer, B. W., Vanterpool, S. F., & Been, J. V. (2018). Periodontal disease and pregnancy outcomes: Overview of systematic reviews. *JDR Clinical and Translational Research* (Vol. 3, Issue 1). DOI: [10.1177/2380084417731097](https://doi.org/10.1177/2380084417731097)

de Moura Mattaraia, V. G., & Moura, A. S. A. M. T. (2012). Produtividade de ratos wistar em diferentes sistemas de acasalamento. *Ciencia Rural*. DOI: 10.1590/S0103-84782012000800026

Duan, X., Hays, A., Zhou, W., Sileewa, N., Upadhyayula, S., Wang, H., & Liang, S. (2018). Porphyromonas gingivalis induces exacerbated periodontal disease during pregnancy. *Microbial Pathogenesis*, 124. DOI: [10.1016/j.micpath.2018.08.019](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.019)

França, L. F. C., Vasconcelos, A. C. C. G., da Silva, F. R. P., Alves, E. H. P., Carvalho, J. S., Lenardo, D. D., de Souza, L. K. M., Barbosa, A. L. R., Medeiros, J. V. R., de Oliveira, J. S., & Vasconcelos, D. F. P. (2017). Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(6). DOI: [10.1111/jcpe.12729](https://doi.org/10.1111/jcpe.12729)

Furlaneto, F., Ishikawa, K. H., Messoria, M. R., Mayer, M. P. A. (2022). Probiotics During the Therapeutic Management of Periodontitis. *Adv Exp Med Bio*. 1373. DOI: [10.1007/978-3-030-96881-6\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-96881-6_19)

Galeno, J. G., França, L. F. de C., da Silva, F. R. P., Alves, E. H. P., Di Lenardo, D., Nascimento, H. M. S., Cardoso Guimarães Vasconcelos, A. C., Carneiro Gomes, P. R., Dias

de Souza Filho, M., Caetano, V. da S., de Oliveira, A. P., de Alencar, M. V. O. B., Barbosa, A. L. dos R., Medeiros, J. V. R., Fahimipou, F., Barros, S. P., Alves Diniz, I. M., & Vasconcelos, D. F. P. (2021). Renal alterations caused by ligature-induced periodontitis persist after ligature removal in rats. *Journal of Periodontal Research*, 56(2).

DOI: [10.1111/jre.12822](https://doi.org/10.1111/jre.12822)

Guo, Z., Liu, X. M., Zhang, Q. X., Shen, Z., Tian, F. W., Zhang, H., Sun, Z. H., Zhang, H. P., & Chen, W. (2011). Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* (Vol. 21, Issue 11). DOI: [10.1016/j.numecd.2011.04.008](https://doi.org/10.1016/j.numecd.2011.04.008)

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 11, 506-514.

DOI: [10.1038/nrgastro.2014.66](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66)

Hoare, A., Wang, H., Meethil, A., Abusleme, L., Hong, B. Y., Moutsopoulos, N. M., Marsh, P. D., Hajishengallis, G., & Diaz, P. I. (2021). A cross-species interaction with a symbiotic commensal enables cell-density-dependent growth and in vivo virulence of an oral pathogen. *ISME Journal*, 15(5). DOI: [10.1038/s41396-020-00865-y](https://doi.org/10.1038/s41396-020-00865-y)

Hojo, K., Mizoguchi, C., Taketomo, N., Ohshima, T., Gomi, K., Arai, T., & Maeda, N. (2007). Distribution of salivary Lactobacillus and Bifidobacterium species in periodontal health and disease. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(1).

DOI: [10.1271/bbb.60420](https://doi.org/10.1271/bbb.60420)

Imafidon, E. C., Akomolafe, R. O., & Oladele, A. A. (2016). Sexually dimorphic proteinuria in Wistar rats: Relevance to clinical models. *Pathophysiology*, 23(1).

DOI: [10.1016/j.pathophys.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2016.02.001)

Ishikawa, K. H., Mita, D., Kawamoto, D., Nicoli, J. R., Albuquerque-Souza, E., Lorenzetti Simionato, M. R., & Mayer, M. P. A. (2020). Probiotics alter biofilm formation and the transcription of Porphyromonas gingivalis virulence-associated genes. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1). DOI: [10.1080/20002297.2020.1805553](https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1805553)

Kamińska, J., Dymicka-Piekarska, V., Tomaszewska, J., Matowicka-Karna, J., & Koper-Lenkiewicz, O. M. (2020). Diagnostic utility of protein to creatinine ratio (P/C ratio) in spot urine sample within routine clinical practice. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (Vol. 57, Issue 5). DOI: [10.1080/10408363.2020.1723487](https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1723487)

Khalesi, S., Sun, J., Buys, N., & Jayasinghe, R. (2014). Effect of probiotics on blood

pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials.

*Hypertension* (Vol. 64, Issue 4). DOI: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03469](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03469)

Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 7). DOI: [10.1038/nrmicro2381](https://doi.org/10.1038/nrmicro2381)

Krüger, M. S. da M., Casarin, R. P., Pinto, G. dos S., Pappen, F. G., Camargo, M. B. J., Correa, F. O. B., & Romano, A. R. (2019). Maternal periodontal disease and adverse perinatal outcomes: is there an association? A hospital-based case-control study. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 32(20). DOI: [10.1080/14767058.2018.1464554](https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1464554)

Lamont, R. J., & Hajishengallis, G. (2015). Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 21, Issue 3). DOI: [10.1016/j.molmed.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.004)

Liang, S., Ren, H., Guo, H., Xing, W., Liu, C., Ji, Y., Jiang, H., Zhang, P., & Du, M. (2018). Periodontal infection with *Porphyromonas gingivalis* induces preterm birth and lower birth weight in rats. *Molecular Oral Microbiology*, 33(4). DOI: [10.1111/omi.12227](https://doi.org/10.1111/omi.12227)

Luoto, R., Laitinen, K., Nermes, M., & Isolauri, E. (2010). Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: A double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition*, 103(12). DOI: [10.1017/S0007114509993898](https://doi.org/10.1017/S0007114509993898)

Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A., & Offenbacher, S. (2013). Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: Pathogenic mechanisms. *Journal of Clinical Periodontology* (Vol. 40, Issue SUPPL. 14). DOI: [10.1902/jop.2013.1340015](https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340015)

Maekawa, T., & Hajishengallis, G. (2014). Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *Journal of Periodontal Research*, 49(6). DOI: [10.1111/jre.12164](https://doi.org/10.1111/jre.12164)

Mata, K., Nobre, A. V. V., Felix Silva, P. H., Oliezer, R. S., Fernandes, C., Amaral, J., Ramos, J., Constante Gabriel Del-Arco, M., Messori, M. R., Tanus-Santos, J. E., Gerlach, R. F., & Salvador, S. L. (2021). A new mixed model of periodontitis-induced preeclampsia: A pilot study. *Journal of Periodontal Research*, 56(4). DOI: [10.1111/jre.12869](https://doi.org/10.1111/jre.12869)

Oliveira, L. F. F., Salvador, S. L., Silva, P. H. F., Furlaneto, F. A. C., Figueiredo, L., Casarin, R., Ervolino, E., Palioto, D. B., Souza, S. L. S., Taba, M., Novaes, A. B., & Messori, M. R. (2017). Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 88(2). DOI: [10.1902/jop.2016.160217](https://doi.org/10.1902/jop.2016.160217)

Oliveira, L. F. F., Silva, P. H. F., Salvador, S. L., Ervolino, E., Casarin, R., Figueiredo, L., Ricoldi, M. T., Souza, S. L. S., Furlaneto, F. A. C., Messoria, M. R. (2023). Probiotic consumption can modify the resilience of periodontal tissues in rats under experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*, 94(2). DOI: [10.1002/JPER.21-0555](https://doi.org/10.1002/JPER.21-0555)

Rogosa, M. (1964). THE GENUS VEILLONELLA I. *Journal of Bacteriology*, 87(1). DOI: [10.1128/jb.87.1.162-170.1964](https://doi.org/10.1128/jb.87.1.162-170.1964)

Schlagenhauf, U., Jakob, L., Eigenthaler, M., Segerer, S., Jockel-Schneider, Y., & Rehn, M. (2016). Regular consumption of Lactobacillus reuteri-containing lozenges reduces pregnancy gingivitis: an RCT. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(11). DOI: [10.1111/jcpe.12606](https://doi.org/10.1111/jcpe.12606)

Silva, G. A., Moreira, A. L. G., Silva, P. H. F., Salvador, S. L., Casarin, R. C. V., Vicente, R. M., Ferreira, G. C., Tanus-Santos, J. E., Furlaneto, F. A. C., & Messoria, M. R. (2022). The use of probiotics can reduce the severity of experimental periodontitis in rats with metabolic syndrome: An immunoenzymatic and microtomographic study. *Journal of Periodontology*, 93(2). DOI: [10.1002/JPER.21-0285](https://doi.org/10.1002/JPER.21-0285)

Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* (Vol. 38). DOI: [10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x)

Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., & Levin, A. E. (1994). "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *BioTechniques*, 17(4).

Stefańska, K., Zieliński, M., Zamkowska, D., Adamski, P., Jassem-Bobowicz, J., Piekarska, K., Jankowiak, M., Leszczyńska, K., Świątkowska-Stodulska, R., Preis, K., Trzonkowski, P., & Marek-Trzonkowska, N. (2020). Comparisons of dipstick test, urine protein-to-creatinine ratio, and total protein measurement for the diagnosis of preeclampsia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(12). DOI: [10.3390/ijerph17124195](https://doi.org/10.3390/ijerph17124195)

Vitali, B., Cruciani, F., Baldassarre, M. E., Capursi, T., Spisni, E., Valerii, M. C., Candela, M., Turrone, S., & Brigidi, P. (2012). Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: Outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion. *BMC Microbiology*, 12. DOI: [10.1186/1471-2180-12-236](https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-236)

Williams, R. C., & Offenbacher, S. (2000). Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontology 2000* (Vol. 23). DOI: [10.1034/j.1600-0757.2000.2230101.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2230101.x)

Wei, B. J., Chen, Y. J., Yu, L., & Wu, B. (2013). Periodontal Disease and Risk of Preeclampsia: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE*, 8(8).

Weichert, S., Schrotten, H., & Adam, R. (2012). The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(8). DOI: [10.1097/INF.0b013e3182620e52](https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182620e52)

Yang, S., Li, W., Challis, J. R. G., Reid, G., Kim, S. O., & Bocking, A. D. (2014). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 supernatant prevents lipopolysaccharide-induced preterm birth and reduces inflammation in pregnant CD-1 mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 211(1). DOI: [10.1016/j.ajog.2014.01.029](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.01.029)

Zheng, H. J., Guo, J., Wang, Q., Wang, L., Wang, Y., Zhang, F., Huang, W. J., Zhang, W., Liu, W. J., & Wang, Y. (2021). Probiotics, prebiotics, and synbiotics for the improvement of metabolic profiles in patients with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 61, Issue 4). DOI: [10.1080/10408398.2020.1740645](https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1740645)

Zhou, P., Li, X., Huang, I. H., & Qi, F. (2017). *Veillonella* catalase protects the growth of *Fusobacterium nucleatum* in microaerophilic and *Streptococcus gordonii*-resident environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19). DOI: [10.1128/AEM.01079-17](https://doi.org/10.1128/AEM.01079-17)

## Figure legends

**Figure 1.** Experimental design

**Figure 2.** Anatomical parameters. (A) Maternal weight before euthanasia. (B) Pups weight. (C) Number of pups per rat. (D) Placental weight. (E) Representative images of the pups of each experimental group. (F) Representative images of the placentas of each experimental group. Different letters mean statistical difference ( $p < 0.05$ )

**Figure 3.** Microtomographic parameters. (A) Bone volume. (B) Bone porosity. (C) Trabecular thickness. (D) Trabecular number. (E) Trabecular separation. (F) Three-dimensional rendered reconstructions of the microtomographic sections of the hemi-mandible of the animals of each groups. Different letters mean statistical difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4.** Microbiological parameters. Means of the total count ( $\times 10^5$ ) of 40 bacterial species present in the biofilms of the animals in the experimental groups. (A) C group; (B) PROB group; (C) DP group; (D) PD-PROB group. \* means statistical difference when compared to C group; # means statistical difference when compared to the PROB group;  $\Delta$  means statistical difference when compared to the PD group.

**Figure 5.** Biochemical parameters. (A) Proteinuria. (B) Creatinine in the urine. (C) Urine proteinuria/creatinine ratio. Different letters mean statistical difference ( $p < 0.05$ ).

**Figura 6.** Kidney histomorphometric parameters. (A) Bowman's capsule space. (B) Circumference of Bowman's capsule. (C) Glomerular circumference. (D) Glomerular diameter. Different letters mean statistical difference ( $p < 0.05$ ).

**Figura 7.** Representative photomicrographs of the sagittal section of the kidney. (A) C group. (B) PROB group. (C) DP group; (D) PD-PROB group. \* means Bowman's capsule space; G stands for glomerulus; black arrow indicates congested vessels. Staining: hematoxylin & eosin. Original magnification: 10x.

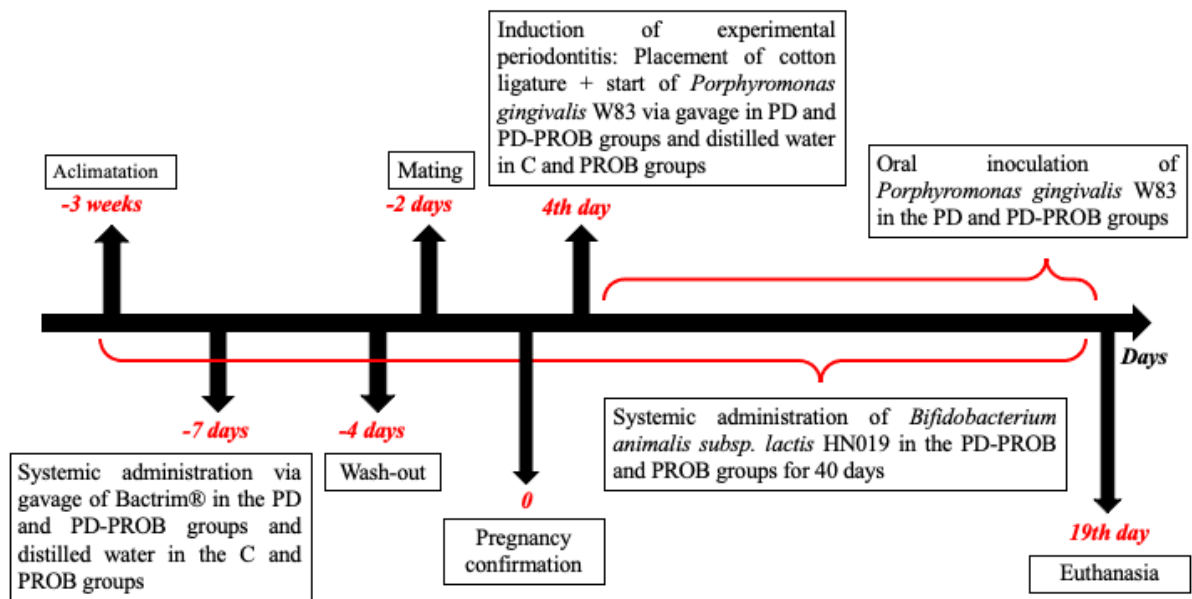
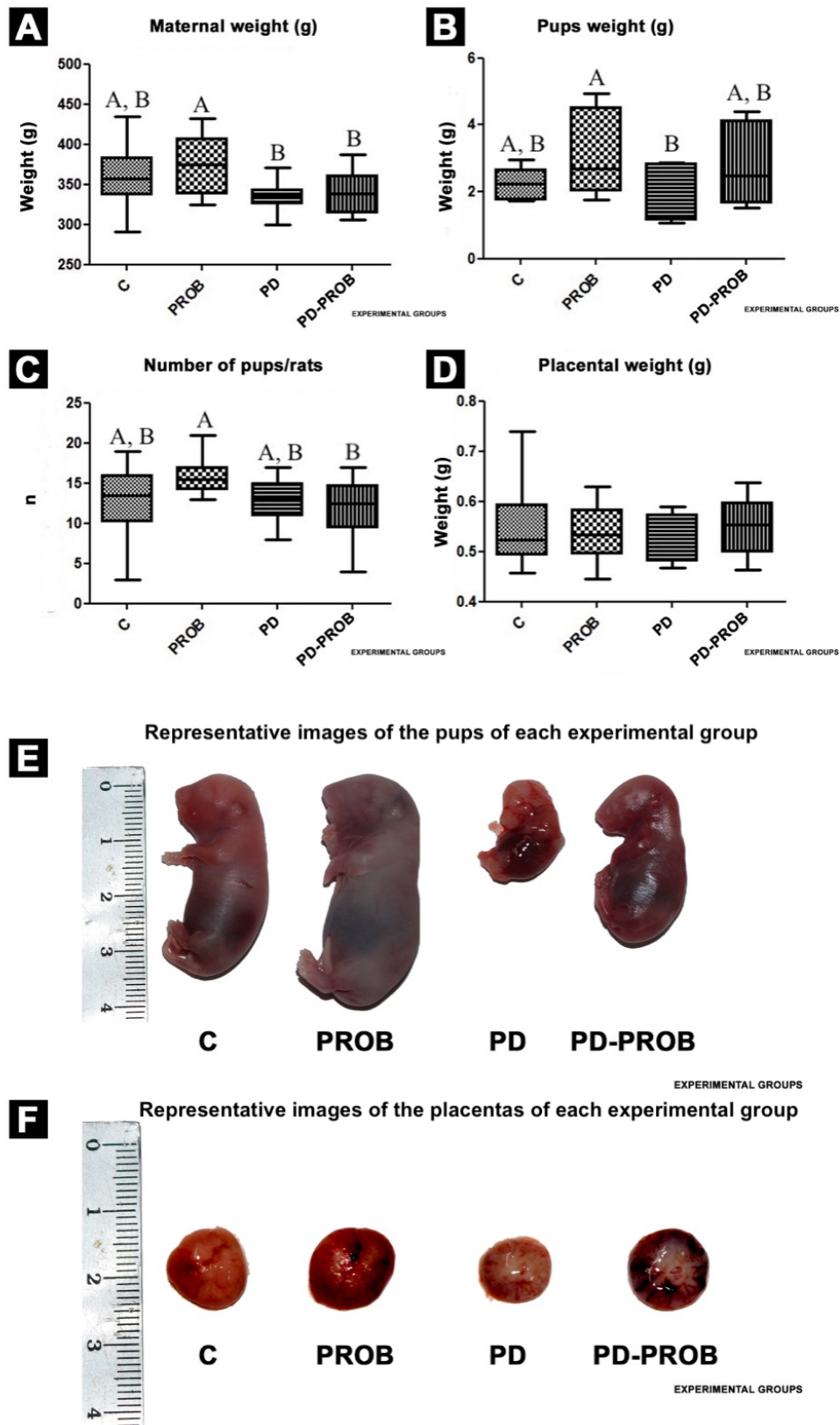
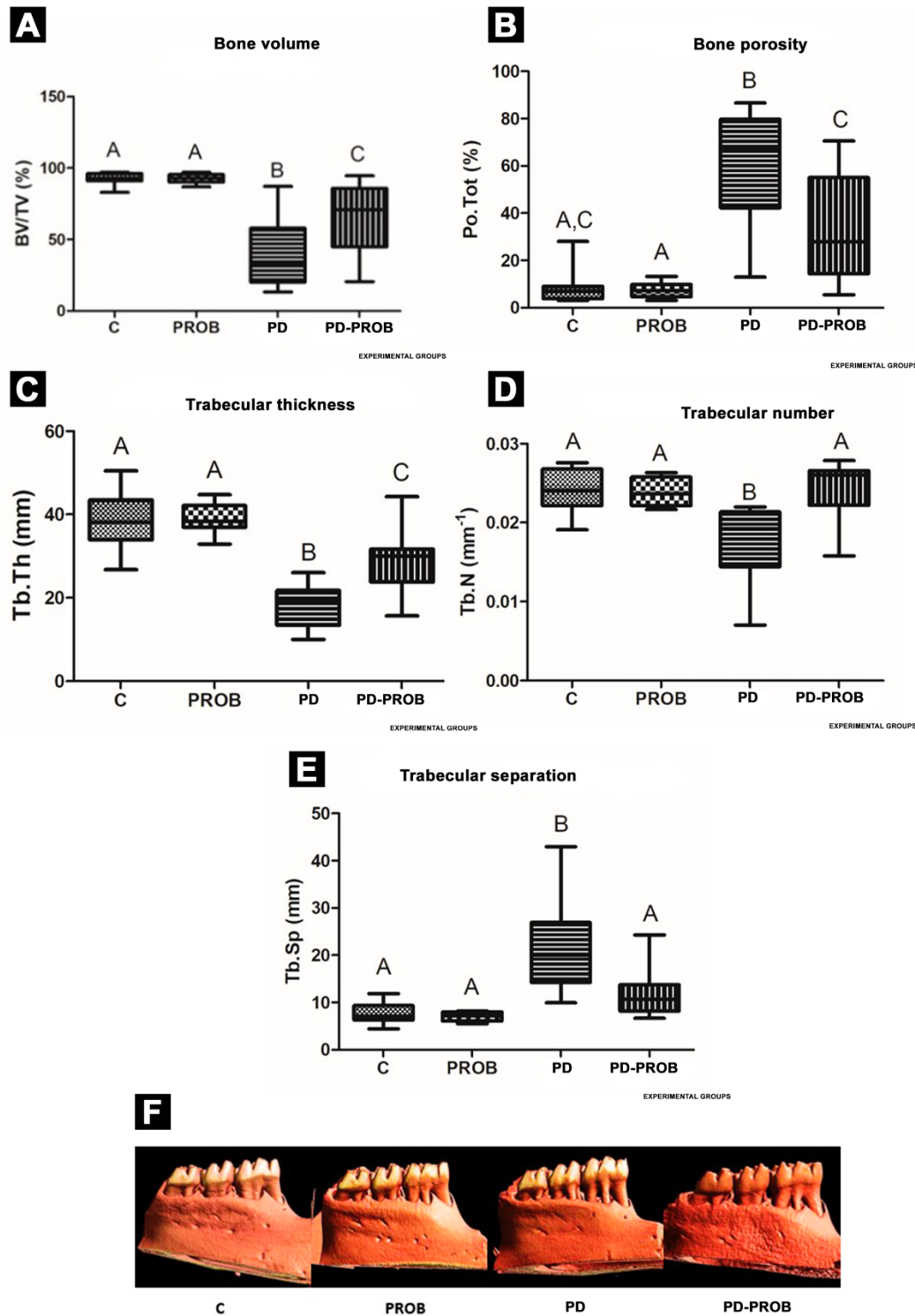


Figure 1. Experimental design

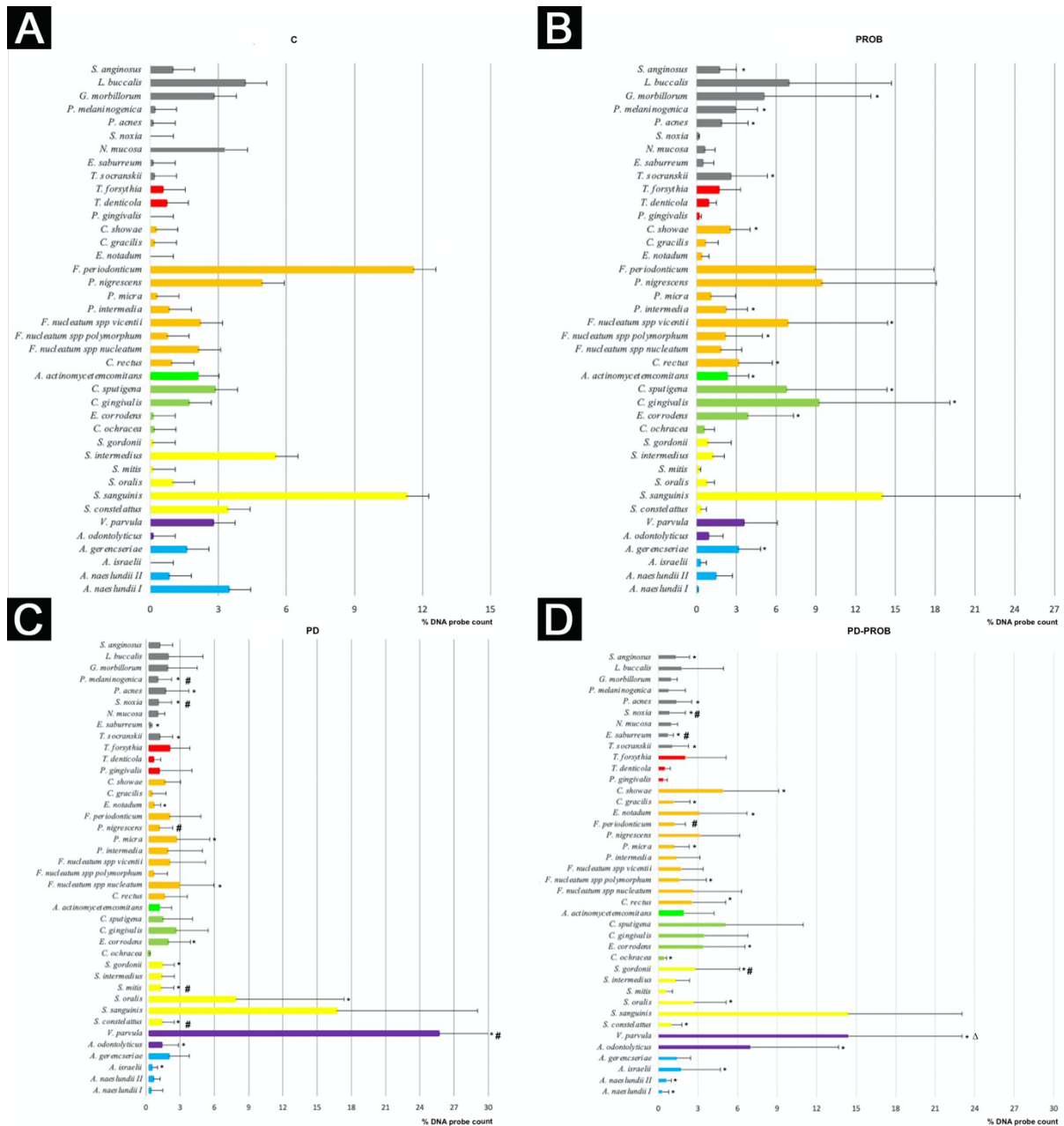


**Figure 2.** Anatomical parameters. (A) Maternal weight before euthanasia. (B) Pups weight. (C) Number of pups per rat. (D) Placental weight. (E) Representative images of the pups of each experimental group. (F) Representative images of the placentas of each experimental group. Different letters mean statistical difference ( $p < 0.05$ )

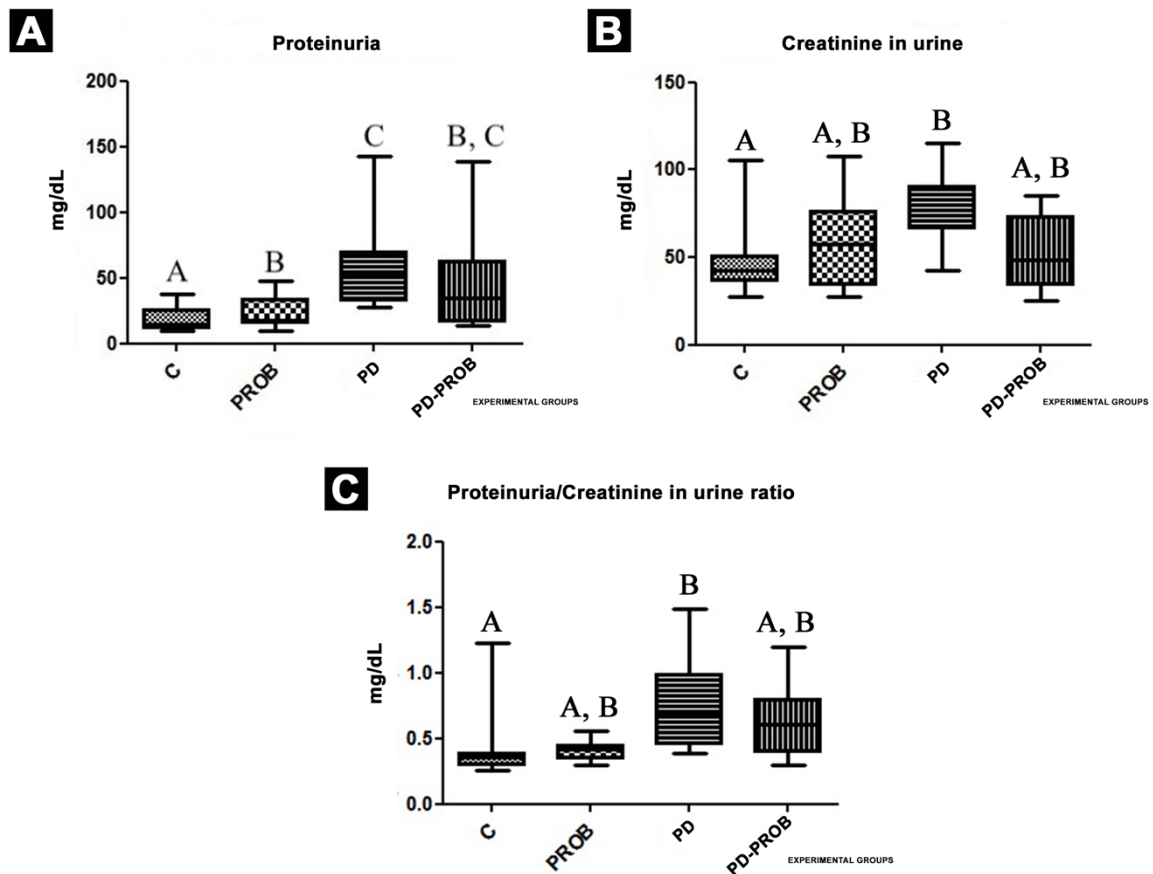




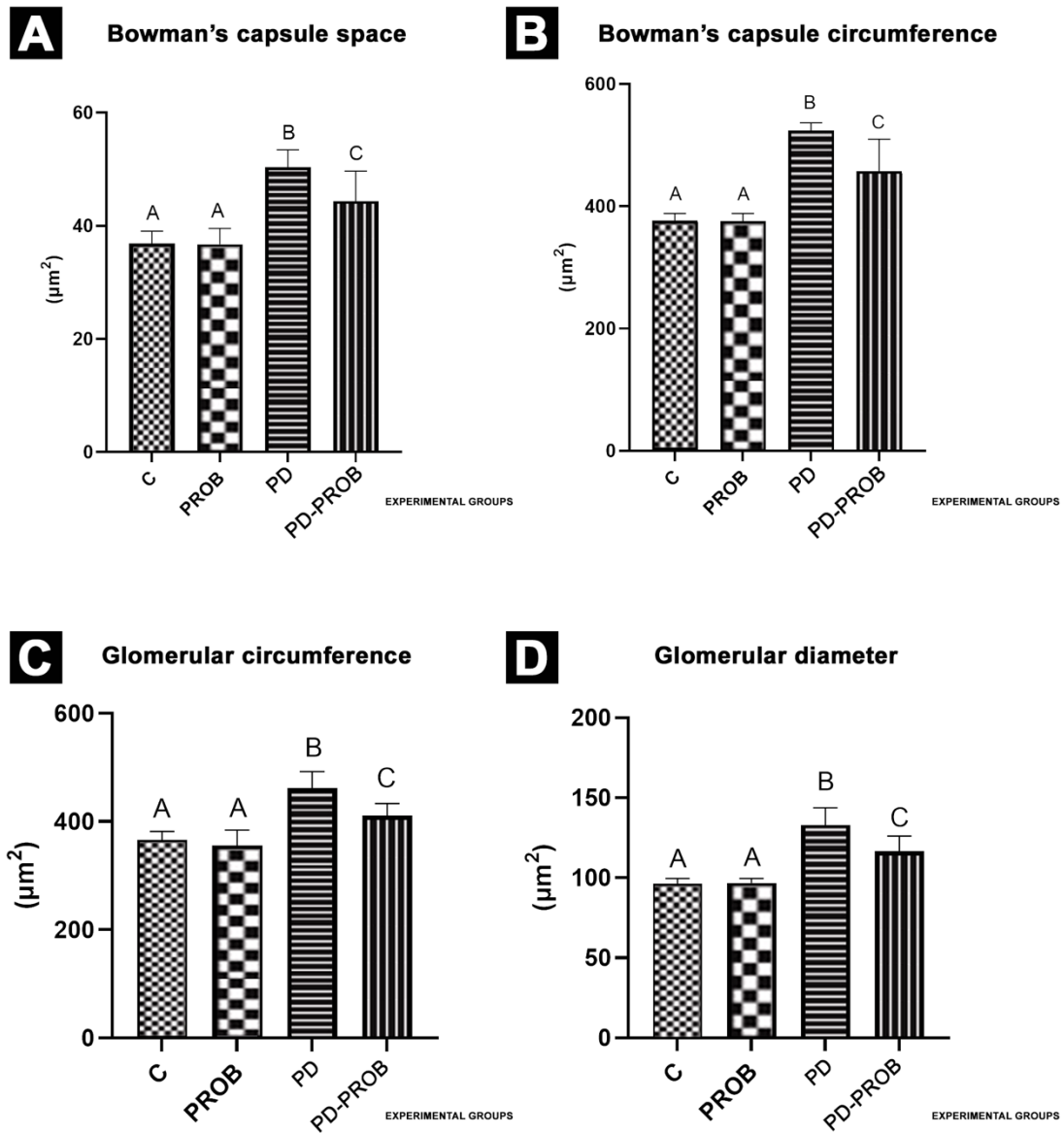
**Figure 3.** Microtomographic parameters. (A) Bone volume. (B) Bone porosity. (C) Trabecular thickness. (D) Trabecular number. (E) Trabecular separation. (F) Three-dimensional rendered reconstructions of the microtomographic sections of the hemi-mandible of the animals of each group. Different letters mean statistical difference ( $p < 0.05$ ). Means of the total count ( $\times 10^5$ ) of 40 bacterial species present in the biofilms of the animals in the experimental groups. (A) C group; (B) PROB group; (C) DP group; (D) PD-PROB group. \* means statistical difference when compared to C group; # means statistical difference when compared to the PROB group;  $\Delta$  means statistical difference when compared to the PD group.



**Figure 4.** Microbiological parameters. Means of the total count ( $\times 10^5$ ) of 40 bacterial species present in the biofilms of the animals in the experimental groups. (A) C group; (B) PROB group; (C) DP group; (D) PD-PROB group. \* means statistical difference when compared to C group; # means statistical difference when compared to the PROB group;  $\Delta$  means statistical difference when compared to the PD group.

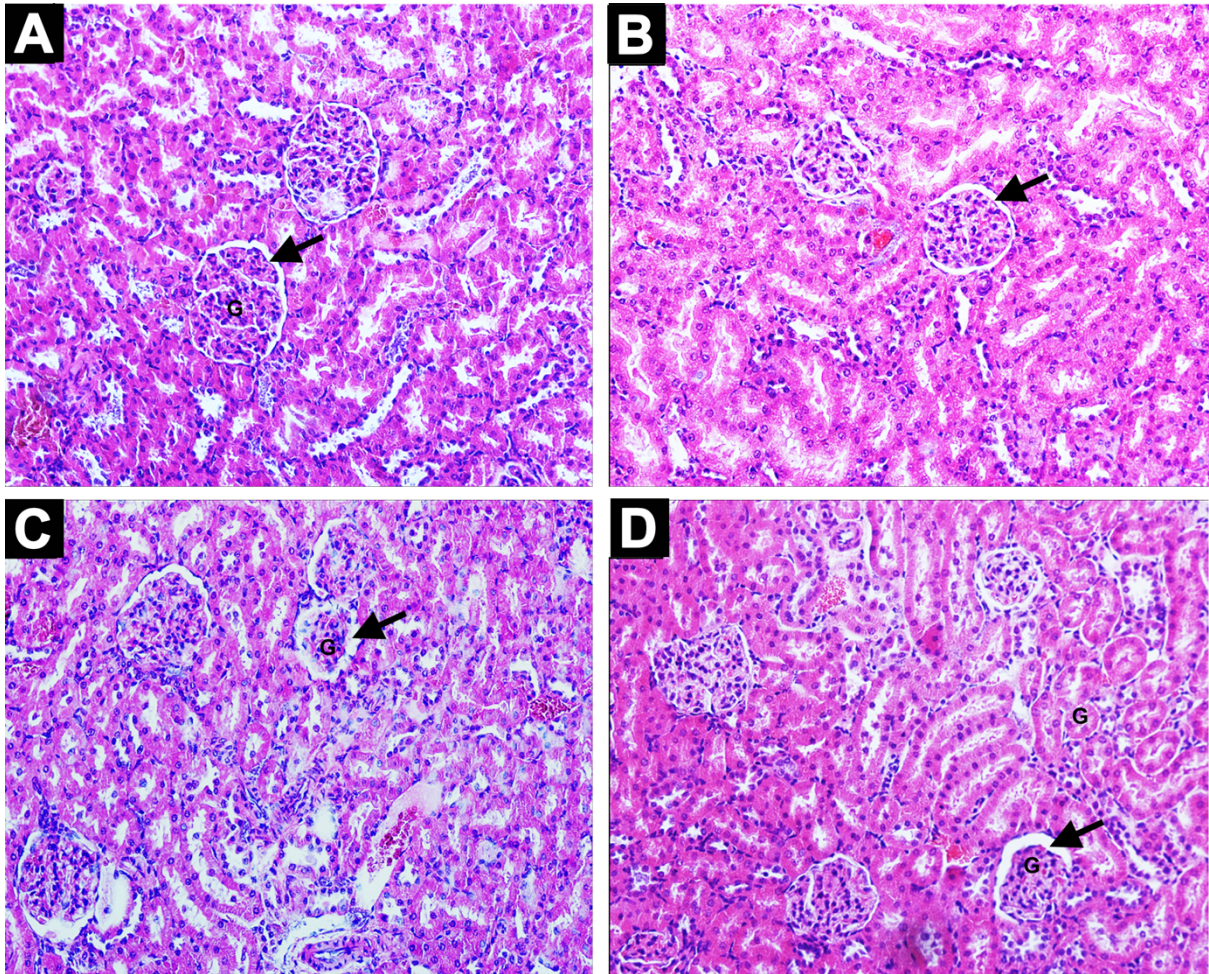


**Figure 5.** Biochemical parameters. (A) Proteinuria. (B) Creatinine in the urine. (C) Urine proteinuria/creatinine ratio. Different letters mean statistical difference ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Kidney histomorphometric parameters. (A) Bowman's capsule space. (B) Circumference of Bowman's capsule. (C) Glomerular circumference. (D) Glomerular diameter. Different letters mean statistical difference ( $p < 0.05$ ).





**Figura 7.** Representative photomicrographs of the sagittal section of the kidney. (A) C group. (B) PROB group. (C) DP group; (D) PD-PROB group. \* means Bowman's capsule space; G stands for glomerulus; black arrow indicates congested vessels. Staining: hematoxylin & eosin. Original magnification: 10x.