



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

**Efeitos da terapia probiótica na periodontite experimental em  
ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em  
gordura.**

**GISELLE APARECIDA DA SILVA**

**PG.PERIO**  
FORP-USP

**RIBEIRÃO PRETO**

**2021**

**GISELLE APARECIDA DA SILVA**

**Efeitos da terapia probiótica na periodontite experimental em ratos  
com síndrome metabólica induzida por dieta rica em gordura.**

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

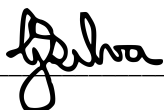
Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Michel Reis Messorá

**RIBEIRÃO PRETO**

**2021**

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.



---

**Giselle Aparecida da Silva**

---

**Prof. Dr. Michel Reis Messoria**

### **Catálogo da Publicação**

**Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.**

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

Silva, Giselle Aparecida.

Efeitos da terapia probiótica na periodontite experimental em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em gordura / Giselle Aparecida da Silva; Orientador Michel Reis Messoria. - Ribeirão Preto, 2021.

134f.: il. 30 cm

Dissertação (Mestrado)—Universidade de São Paulo, 2021.

1. Doença Periodontal.
2. Síndrome Metabólica.
3. Ratos.
4. Probiótico.

**SILVA, G. A. Efeitos da terapia probiótica na periodontite experimental em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em gordura:** Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

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

**Banca Examinadora**

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

---

DEDICATÓRIA

## **Dedico**

### **A Deus,**

Meu protetor, aquele que sempre me ajuda, fonte inesgotável de esperança e amor. Agradeço pela oportunidade constante de aprendizado e evolução; por sempre guiar meu coração e meus passos; por se manifestar tantas vezes por meio de pessoas e feitos incríveis que coloca em meu caminho, sempre me mostrando que seus planos são melhores que os meus e que tudo ocorre da maneira correta e no tempo certo. Obrigada por estar sempre comigo.

### **Aos meus amados pais Gilmar e Vania,**

Agradeço todos os dias pelo privilégio de ter pais tão incríveis, são seres iluminados que Deus colocou em minha vida. Meus primeiros professores e melhores amigos, me ensinaram, através do exemplo, que o amor, a bondade e a educação são a base de tudo, e que com trabalho e muita dedicação podemos deixar nossa marca no mundo. Me faltam palavras para expressar o quanto sou grata por se dedicarem com tanto amor à nossa família, por abdicarem de tantas coisas para que eu pudesse trilhar meus caminhos e realizar meus sonhos. Obrigada por serem sempre meu porto seguro, ombro amigo, exemplo retilíneo e fonte infinita de amor e compreensão. Tudo que tenho e sou é graças a vocês!

### **Ao meu esposo Marco Aurélio,**

Começamos e finalizamos essa jornada juntos e, sem dúvidas, seu companheirismo e amor tornou tudo isso possível e muito mais leve. Muito obrigada por todo o apoio que sempre me deu, por estar presente em cada momento, por acreditar em mim e me impulsionar quando eu mais precisava. Tenha a certeza de que suas palavras e toda a sua dedicação e amor em tudo que faz foram muitas vezes a inspiração que eu precisava para continuar firme em meus propósitos. Obrigada por dividir comigo essa trajetória com tanto carinho, juntos vamos mais longe!

**Ao meu irmão Gilmar Jr, minha cunhada Bruna e minha afilhada Helena,**

Vocês que vibraram comigo a cada etapa finalizada e que encurtaram quilômetros de distância para que sempre estivéssemos juntos, sou eternamente grata. Obrigada por todos os conselhos, a amizade e os momentos de diversão que vivemos juntos. Vocês são fonte de inspiração que levo sempre comigo, me sinto abençoada por tê-los em minha vida. Obrigada por tudo!

---

## AGRADECIMENTOS



## Agradeco

Ao meu orientador **Prof. Dr. Michel Reis Messor**a, por confiar em mim e acreditar no meu potencial desde 2013, quando fui sua orientada de iniciao cientfica. Sou muito grata por todas as oportunidades que tem me dado desde ento. Obrigada por me ouvir, apoiar, aconselhar e incentivar quando tudo parecia estar incerto. Muito do que sei e do meu fascnio pela Periodontia se deve aos seus ensinamentos e sua dedicao, que s3o inspiraao para mim desde a graduao.

Aos Professores do Programa de P3s-graduao em Periodontia da FORP -USP, **Dr. Arthur Bel3m Novaes J3nior**, **Dr. S3rgio Lu3s Scombatti de Souza**, **Dr. Mario Taba Jr**, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo do curso de graduao e agora de mestrado, que foram muito al3m da Odontologia. Agradeo tamb3m por todas as experi3ncias trocadas, oportunidades e por sempre me incentivarem. 3s Profas. **Dra Daniela Bazan Pallioto Bulle** e **Dra. Fl3via Ap. Chaves Furlaneto**, agradeo especialmente por todos os conselhos, pelas oportunidades de trabalhar em conjunto e principalmente por serem fonte de inspiraao como mulheres brilhantes na ci3ncia, na doc3ncia e na vida.

Ao **Prof. Dr. S3rgio Salvador** por toda a generosidade e at3ncia que sempre me recebeu em seu laborat3rio, al3m de todos os ensinamentos transmitidos desde a 3poca da graduao. Sua colaborao foi fundamental para esse trabalho e principalmente para a minha formaao.

Ao **Prof. Dr. Jos3 Eduardo Tanus dos Santos** por toda sua colaborao nesse trabalho e por nos receber de portas abertas em seu laborat3rio. Estendo meus agradecimentos 3 T3cnica **Sandra Conde Tella** e 3 doutoranda **Graziele C. Ferreira** que me ajudaram t3o gentilmente desde o primeiro momento.

A **Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer** por me receber tão atenciosamente em seu laboratório e toda a colaboração na análise microbiológica deste trabalho. Estendo meus agradecimentos à sua equipe, à **Dra. Karin Hitomi Ishikawa** e à **Dra. Dione Kawamoto** que me transmitiram diversos conhecimentos e me auxiliaram em todas as etapas da análise microbiológica tão gentilmente.

Ao **Prof. Dr. Renato C. V. Casarin** por sua colaboração na análise imunoenzimática deste trabalho.

A **Profa. Dra. Selma Siéssere** por ser minha primeira orientadora de iniciação científica e me apresentar a esse universo tão encantador. Agradeço também ao Técnico **Luiz Gustavo de Souza** por me auxiliar e ensinar tanto desde a época da iniciação científica até o mestrado, sempre prestativo e pronto para ajudar.

A **Técnica Marina Del Arco** por toda a ajuda, dedicação, amizade, paciência e ensinamentos muito além do laboratório. Você sempre foi tão gentil e solícita que estar no laboratório e cultivar o probiótico era uma das minhas partes favoritas do experimento.

Aos **Técnicos Milla S. T. Ricoldi, Adriana Almeida, Fabíola Singaretti e Roger Fernandes** agradeço pela disponibilidade em me ajudar e ensinar sempre que precisei, o auxílio de vocês foi fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários do Biotério I da FORP/USP, **Edson C. R. dos Santos** e **Antonio Massaro** por serem tão prestativos e me ajudarem em vários momentos. Em especial agradeço ao veterinário **Raphael M. Vicente** por todo o empenho e colaboração, foram tantos os momentos de auxílio e trabalho que nos tornamos amigos nessa jornada.

As secretárias **Aparecida Dulce Negretti**, **Carla Daniela Lima da Silva** e especialmente a **Maria Isabel Simonetti** por toda a disponibilidade em me ajudar, ouvir e orientar sempre que precisei.

A todos os funcionários da **FORP/USP**, especialmente a **Daniela Steter**, **China**, **Serginho**, **Karina** e **Dra Rose** por todo o carinho, ensinamentos e dedicação.

A todos os amigos de pós-graduação, em especial a **Pedro Félix**, **Cristhiam Hernandez**, **Natacha Malu**, **Átila Nobre**, **Lucia Moitrel**, **Uislen Cadore**, **Marília Reis**, **Valessa Carvalho**, **Letícia Duffles**, **Luiz Fernando Oliveira** e **André Moreira**, por serem muitas vezes meus professores e compartilharem comigo os momentos desafiadores da pós-graduação. Nada se faz sozinho e a conclusão desse trabalho se deve à ajuda de vocês, desde o momento de ouvir, aconselhar até os momentos intermináveis de experimento e eutanásia dos animais.

Ao **Luiz Fernando** agradeço especialmente por também me acompanhar desde a iniciação científica, por todas as conversas e me ensinar tantas coisas, desde o manejo de animais até a indução de doença periodontal e outras etapas experimentais tão importantes, sua ajuda foi fundamental na minha trajetória até aqui.

Ao **Pedro**, em especial, agradeço por todos os momentos que me ouviu e aconselhou, por todos os ensinamentos e troca de experiências. Agradeço principalmente por toda a ajuda e dedicação incansáveis a esse trabalho, por viajar comigo até São Paulo para realizarmos as análises microbiológicas sem medir esforços, você foi imprescindível em todas as etapas desse trabalho.

Ao **André**, agradeço primeiramente pelos ensinamentos transmitidos quando era meu monitor na época de graduação e por me incentivar à fazer iniciação científica

em Periodontia naquela época. Se hoje sou periodontista e ingressei em um mestrado, grande parte disso se deve a você. Sou grata a Deus por cruzar nossos caminhos novamente na pós-graduação, onde tivemos a oportunidade de trabalharem juntos. Juntos conseguimos finalizar esse trabalho, que foi árduo mas se tornou mais leve com a sua ajuda. Obrigada por toda a paciência, pela amizade, por me ouvir tantas vezes e por me ensinar a calma no meio da minha agitação.

As minhas amigas de longa data **Ana Luisa N. Marques, Daniela Tavares, Mariana Figueiredo e Jannayna Bianchi**, que considero irmãs do coração, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, me apoiando, vibrando por mim e tornando essa jornada muito mais leve e divertida.

As minhas amigas **Ariel Mançanares, Daniela Verardi, Jéssica Coelho, Júlia Martins e Marina Paulini**. Vocês são presentes que a FORP/USP me deu desde a graduação e vou levar para sempre comigo. Obrigada por tudo que vivemos até aqui, a amizade de vocês é fundamental em minha vida. Tenho muito orgulho desse grupo de profissionais incríveis que nos tornamos, o exemplo e apoio de vocês me incentivam a persistir em meus sonhos.

Aos meus **familiares**, que sempre estiveram presentes me apoiando e vibrando a cada conquista. Agradeço também por compreenderem minhas ausências em momentos em que precisei me dedicar ao mestrado.

Aos meus **pacientes**, por me proporcionarem tanto aprendizado e toda a compreensão nesse processo.

Aos **alunos de graduação**, por toda a convivência e por despertarem em mim tanto carinho pela docência

Aos **animais** utilizados durante essa e tantas outras pesquisas, possibilitando o avanço da ciência, impactando diretamente em nossas vidas.

A **Universidade de São Paulo**, que me possibilitou cursar a graduação e duas pós-graduações com excelência e uma gama enorme de oportunidades. Em especial à **FORP/USP** que foi minha casa durante quase 8 anos, lugar onde conheci pessoas sensacionais e vivi momentos incríveis que sempre vou guardar com carinho em meu coração. Também agradeço ao **HRAC/USP (Centrinho)**, onde aprendi muito mais que Periodontia, conheci grandes exemplos e fiz muitos amigos. Quando se conhece o Centrinho de perto, fica fácil entender o amor de tantos alunos, profissionais e pacientes por essa instituição.

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

---

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho inicial.”

(Albert Einstein)

---

RESUMO



## RESUMO

### **SILVA, G. A. Efeitos da terapia probiótica na periodontite experimental em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em gordura.**

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O conceito de modular a microbiota intestinal por meio do uso de bactérias específicas para melhorar o metabolismo do hospedeiro ganhou considerável interesse nos últimos anos. Alguns estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que a utilização de probióticos (PROB) pode ser uma promissora alternativa terapêutica/preventiva para a síndrome metabólica (SM) e para a doença periodontal (DP). Ambas as condições estão intimamente associadas e afetam milhares de pessoas em todo o mundo. Até o presente momento, nenhum estudo avaliou o impacto da terapia probiótica na associação SM-DP. O propósito deste estudo foi avaliar potenciais efeitos do agente probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) no desenvolvimento da periodontite experimental associada ou não às comorbidades da SM em ratos *Wistar Hannover*. 96 ratos machos *Wistar Hannover* foram aleatoriamente divididos de acordo com o protocolo alimentar recebido: ração hipercalórica rica em gordura para indução da SM e ração comum, (Grupos Controle – C). Os grupos foram ainda subdivididos de acordo com a presença ou não de DP (induzida por ligaduras) e administração ou não de terapia probiótica, constituindo as seguintes situações: i) Grupo C (ratos alimentados com dieta padrão, n = 12); ii) Grupo CP (ratos alimentados com dieta padrão que receberam administração de PROB - n = 12); iii) DP (ratos alimentados com dieta padrão e com DP - n = 12); iv) Grupo DPP (ratos alimentados com dieta padrão, com DP e que receberam administração de PROB - n = 12); v) Grupo SM (ratos alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura, n = 12); vi) Grupo SMP (ratos alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura e que receberam administração de PROB, n = 12); vii) Grupo SMDP (ratos alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura e com DP, n = 12); viii) Grupo SMDPP (ratos alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura e com DP, que receberam terapia PROB, n = 12). A SM foi induzida por meio do consumo de ração hipercalórica (60% gordura). O consumo da dieta hipercalórica foi iniciado 8 semanas antes da terapia probiótica e permaneceu até o dia da eutanásia dos animais. Na 14<sup>a</sup>. semana do estudo, a DP foi induzida por meio da colocação de ligaduras nos primeiros molares inferiores de cada animal durante 14 dias. A cepa probiótica *B. lactis* HN019 foi adicionada diariamente à água dos animais durante 8 semanas, na dosagem de 10<sup>10</sup> Unidades Formadoras de Colônias. Todos os animais foram submetidos à eutanásia 16 semanas após o início do experimento. Foram avaliados: Parâmetros metabólicos (glicemia, insulina, resistência à insulina, perfil lipídico, ácidos graxos e tolerância à glicose) e antropométricos (índice de massa corporal, circunferência abdominal e peso); Pressão arterial (aferida por método invasivo no momento da eutanásia); Níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido gengival por meio de imunoenaios enzimáticos (ELISA e Luminex®); Atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo, catalase (CAT) e mieloperoxidase (MPO), por meio de testes ELISA; Nível ósseo alveolar (NOA), volume ósseo (VO) e porosidade óssea (PO) por meio de microtomografia computadorizada; Análise histológica descritiva das hemimandíbulas; Análise microbiológica intestinal (qRT-PCR). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (p<0,05). Os grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP apresentaram aumento significativo de peso final, IMC e circunferência abdominal quando comparados ao grupo C (p<0,05). O grupo SM apresentou, ainda, aumento nos parâmetros de glicemia, HOMA-IR, colesterol total, triglicerídeos e ácidos graxos quando comparado ao grupo C (p<0,05). A terapia probiótica foi capaz de atenuar a dislipidemia presente nos animais com SM, uma vez que os níveis séricos de colesterol total do grupo SMDPP foram

estatisticamente menores quando comparados àqueles do grupo SMDP. Da mesma forma, SMDPP e SMP apresentaram menores taxas de triglicérides quando comparados aos grupos SMDP e SM, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Os dados da análise microtomográfica demonstraram o impacto de PROB na redução da severidade da DP e os efeitos da SM no agravamento da DP. Os grupos SMDP e SMDPP apresentaram NOA significativamente ( $p < 0,05$ ) maior que àqueles dos grupos DP e DPP, respectivamente. O grupo SMDP apresentou menor VO e maior PO quando comparado aos grupos DP ( $p < 0,05$ ). Os grupos SMDPP e DPP apresentaram menor NOA e menor PO quando comparados aos grupos SMDP e DP, respectivamente ( $p < 0,05$ ). A análise imunoenzimática demonstrou maiores níveis de IL-1 $\beta$  e maior razão RANKL/OPG no grupo SMDP quando comparado ao grupo SMDPP ( $p < 0,05$ ). O grupo DPP apresentou menores níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 quando comparado ao grupo DP ( $p < 0,05$ ). Além disso, o grupo SMDP apresentou maior razão RANK-L/-OPG quando comparado ao grupo DP, assim como menor concentração de TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ). Os animais dos grupos DP e DPP apresentaram níveis reduzidos de CAT quando comparados ao grupo C ( $p < 0,05$ ). Quando a DP foi associada à SM, houve redução significativa de CAT em comparação aos animais apenas com SM ( $p < 0,05$ ). Para MPO, uma tendência de redução foi observada nas comparações dos grupos DPP e DP, SMP e SM; e SMDPP e SMDP. os valores de MPO no presente estudo foram significativamente superiores nos grupos DP e SM quando comparados ao grupo C ( $p < 0,05$ ). A análise microbiológica revelou maior alteração na proporção de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* para o grupo SMP quando comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ). O grupo SM apresentou maior redução de *Lactobacilos* e *Bifidobacterium* ao longo do experimento quando comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ). O uso de PROB promoveu maior redução de *Bacteroidetes* no grupo SMDPP quando comparado ao grupo SMDP ( $p < 0,05$ ). Dentro das limitações do presente estudo, é possível concluir que *B. lactis* HN019 reduziu a severidade da DP e modulou parâmetros imunoinflamatórios nos tecidos periodontais em ratos com ou sem SM. Além disso, *B. lactis* HN019 atenuou parâmetros de dislipidemia em ratos com SM.

**Palavras-chave:** Doença Periodontal; Síndrome Metabólica; Ratos; Probióticos;  
*Bifidobacterium*

---

ABSTRACT

## ABSTRACT

**SILVA, G. A. Effects of probiotic therapy on experimental periodontitis in rats with metabolic syndrome induced by a high-fat diet.** Dissertation (Master Degree) – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The concept of modulating the intestinal microbiota through the use of specific bacteria to improve the host's metabolism gained considerable interest in recent years. Some preclinical and clinical studies showed that the use of probiotics (PROB) can be a promising therapeutic/preventive alternative for metabolic syndrome (MS) and periodontal disease (PD). These conditions are closely linked and affect thousands of people around the world. To date, no study has assessed the impact of probiotic therapy on the MS-PD association. The aim of this study was to evaluate potential effects of the probiotic agent *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) in the development of experimental periodontitis associated or not with the comorbidities of MS in Wistar Hannover rats. 96 male Wistar Hannover rats were randomly divided according to the received food protocol: high-fat high-calorie ration for the induction of MS and common ration (C - control groups). The groups were subdivided according to the presence or absence of PD (ligature-induced) and the administration or not of probiotic therapy: i) C group (rats fed with a standard diet, n = 12); ii) CP group (rats fed with a standard diet and that received PROB - n = 12); iii) PD (rats fed with a standard diet and with PD - n = 12); iv); PDP group (rats fed with a standard diet, with PD and that received PROB - n = 12); v) MS group (rats fed a high-fat high-calorie diet, n = 12); vi) MSP group (rats fed with a high-fat high-calorie diet and that received PROB administration, n = 12); vii) MSPD group (rats fed with a high-fat high-calorie diet and with PD, n = 12); viii) MSPDP group (rats fed with a high-fat high-calorie diet with PD and that received PROB therapy, n = 12). MS was induced through the consumption of high calorie ration (60% fat). The consumption of the high calorie diet started 8 weeks before the probiotic therapy and remained until the day the animals were euthanized. On the 14th week of the study, PD was induced by placing ligatures on the lower first molars of each animal for 14 days. The probiotic strain *B. lactis* HN019 was added daily to the water of the animals for 8 weeks, in the dosage of  $10^{10}$  Colony Forming Units. All animals were euthanized 16 weeks after the beginning of the experiment. Metabolic (blood glucose, insulin, insulin resistance, lipid profile, fatty acids, and glucose tolerance) and anthropometric parameters (body mass index (BMI), abdominal circumference and weight); Blood pressure (measured by invasive method at the time of euthanasia); Levels of pro and anti-inflammatory cytokines in the gingival tissue using enzymatic immunoassays (ELISA and Luminex®); Activity of enzymes involved in oxidative stress, catalase (CAT) and myeloperoxidase (MPO), using ELISA tests; Alveolar bone level (ABL), bone volume (BV) and bone porosity (BP) using computerized microtomography; Descriptive histological analysis of hemimandible; Intestinal microbiological analysis (qRT-PCR), were evaluated. The data were statistically analyzed ( $p < 0.05$ ). The MS, MSP, MSPD, and MSPDP groups showed a significant increase in final weight, BMI, and abdominal circumference when compared to group C ( $p < 0.05$ ). The MS group also showed an increase in the blood glucose, HOMA-IR, total cholesterol, triglycerides, and fatty acids parameters when compared to group C ( $p < 0.05$ ). Probiotic therapy was able to attenuate the dyslipidemia present in animals with MS since the serum levels of total cholesterol in the MSPDP group were statistically lower when compared to those in the MSPD group. Likewise, MSPDP and MSP showed lower triglyceride rates when compared to the MSPD and MS groups, respectively ( $p < 0.05$ ). The data from the microtomographic analysis demonstrated the impact of PROB in reducing the severity of PD and the effects of MS in worsening PD. The MSPD and MSPDP groups showed a significantly higher ABL ( $p < 0.05$ ) than those of the PD and PDP groups, respectively. The MSPD group showed lower BV and higher BP when compared to the PD groups ( $p < 0.05$ ). The MSPDP and PDP groups showed lower ABL and lower BP when compared to the MSPD and PD groups, respectively ( $p < 0.05$ ). The immunoenzymatic analysis showed higher levels of IL-1 $\beta$  and a higher RANKL / OPG ratio in the MSPD group when compared to the MSPDP group ( $p < 0.05$ ). The PDP

group showed lower levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 when compared to the PD group ( $p < 0.05$ ). Besides, the MSPD group showed a higher RANK-L / OPG ratio when compared to the PD group, as well as a lower concentration of TGF- $\beta$  ( $p < 0.05$ ). The animals in the PD and PDP groups showed reduced levels of CAT when compared to group C ( $p < 0.05$ ). When PD was associated with MS, there was a significant reduction in CAT compared to animals with MS alone ( $p < 0.05$ ). For MPO, a downward trend was observed in the comparisons of the PDP and PD, MSP and MS groups; and MSPDP and MSPD. The MPO values in the present study were significantly higher in the PD and MS groups when compared to C group ( $p < 0.05$ ). The microbiological analysis revealed a greater change in the proportion of Firmicutes and Bacteroidetes for the SMP group when compared to group C ( $p < 0.05$ ). The SM group showed a greater reduction in *Lactobacilos* and *Bifidobacterium* throughout the experiment when compared to group C ( $p < 0.05$ ). The use of PROB promoted a greater reduction of Bacteroidetes in the MSPDP group when compared to the MSPD group ( $p < 0.05$ ). Considering the limitations of the present study, it is possible to conclude that *B. lactis* HN019 reduced the severity of PD and modulated immunoinflammatory parameters in the periodontal tissues in rats with or without MS. Furthermore *B. lactis* HN019 attenuated dyslipidemia in rats with MS.

**Keywords:** Periodontal disease; Metabolic syndrome; Rats; Probiotics; *Bifidobacterium*

---

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Delineamento experimental.....	63
<b>Figura 2 -</b>	Posicionamento em mesa operatória e instalação de fio de seda ao redor dos primeiros molares inferiores nos animais dos grupos com DP.....	65
<b>Figura 3 -</b>	Placas de Petri contendo MRS Agar e semeadas com <i>B. lactis</i> HN019 após incubação em anaerobiose.....	66
<b>Figura 4 -</b>	Médias e desvios-padrão do ganho de peso para os grupos: A) C; B) CP; C) DP; D) DPP; E) SM; F) SMP; G) SMDP e H) SMDPP com comparações entre os tempos experimentais. *diferença significativa intragrupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	76
<b>Figura 5 -</b>	Médias e desvios-padrão dos valores de delta de ganho de peso para os grupos experimentais: A) Delta entre a semana 8 e baseline; B) Delta entre a semana 16 e a semana 8; C) Delta entre a semana 16 e baseline. Letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	76
<b>Figura 6 -</b>	Médias e desvios-padrão da circunferência abdominal para os grupos: A) C; B) CP; C) DP; D) DPP; E) SM; F) SMP; G) SMDP e H) SMDPP com comparações entre os tempos experimentais. CA = circunferência abdominal *diferença significativa intragrupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	77
<b>Figura 7 -</b>	Médias e desvios-padrão dos valores de delta de circunferência abdominal para os grupos experimentais: A) Delta entre a semana 8 e baseline; B) Delta entre a semana 16 e a semana 8; C) Delta entre a semana 16 e baseline. Letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	78

<b>Figura 8 -</b>	Médias e desvios-padrão do ganho de peso para os grupos: A) C; B) CP; C) DP; D) DPP; E) SM; F) SMP; G) SMDP e H) SMDPP com comparações entre os tempos experimentais. IMC= índice de massa corporal. * diferença significativa intragrupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	79
<b>Figura 9 -</b>	Médias e desvios-padrão do delta do Índice de Massa Corporal para os grupos experimentais. A) Delta entre a semana 8 e baseline; B) Delta entre a semana 16 e a semana 8; C) Delta entre a semana 16 e o baseline. Letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	80
<b>Figura 10 -</b>	Médias e desvios-padrão da pressão arterial para os grupos experimentais com comparações entre os grupos. A) Pressão arterial sistólica; B) Pressão arterial média. *diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	81
<b>Figura 11 -</b>	Médias e desvios-padrão para o perfil lipídico nos grupos experimentais com comparações entre os grupos. A) Colesterol total; B) LDL; C) HDL; D) Triglicerídeos e E) Ácidos graxos. O símbolo * e letras iguais representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	82
<b>Figura 12 -</b>	Médias e desvios-padrão de glicemia em jejum para os grupos experimentais na 16ª semana. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	83
<b>Figura 13 -</b>	Médias dos níveis glicêmicos em mg/dL dos diferentes grupos distribuídos ao longo do tempo em minutos (A); Médias e desvios-padrão da AUC para os grupos experimentais, com comparações entre os grupos (B). *diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	84
<b>Figura 14 -</b>	Médias e desvios-padrão de insulina para os grupos experimentais na 16ª semana. * representa diferença estatística entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	85



<b>Figura 15 -</b>	Médias e desvios-padrão para o HORMA-IR com comparações entres os grupos experimentais. O símbolo * e letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	86
<b>Figura 16 -</b>	Animal normosistêmico (representativo para os grupos C, CP, DP e DPP) e animal com SM (representativo para os grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP) na 16ª semana de experimento.....	88
<b>Figura 17 -</b>	Médias e desvios-padrão das medidas obtidas na análise microtomográfica para todos os grupos experimentais. A) NOA; B) VO; C) PO. NOA = nível ósseo alveolar; VO = volume ósseo na região de bifurcação em relação ao volume total da região; PO = porosidade óssea. O símbolo * e letras iguais representam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey $p < 0,05$ ).....	90
<b>Figura 18 -</b>	Reconstrução 3D das imagens obtidas na Micro-CT. A) C; B) CP; C) DP e D) DPP. Vista da face vestibular (imagens à esquerda) e Vista da superfície interna - corte sagital (imagens à direita). CTVox® (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do pixel = 7,96 $\mu\text{m}$ .....	91
<b>Figura 19 -</b>	Reconstrução 3D das imagens obtidas na Micro-CT. A) SM; B) SMP; C) SMDP e D) SMDPP. Vista da face vestibular (imagens à esquerda) e Vista da superfície interna - corte sagital (imagens à direita). CTVox® (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do pixel = 7,96 $\mu\text{m}$ .....	92
<b>Figura 20 -</b>	Imagens histológicas da região de bifurcação do 1º molar inferior, com aumento de 20x (A-H) e 40x (A1-H1), dos grupos C (A, A1), CP (B, B1), DP (C, C1), DPP (D, D1), SM (E, E1), SMP (F, F1), SMDP (G, G1) e SMDPP (H, H1).....	94
<b>Figura 21 -</b>	Imagens histológicas da região interproximal entre 1º e 2º molares inferiores, com aumento de 40x dos grupos: C (A), CP (B), DP (C), DPP (DP), SM (E), SMP (F), SMDP (G) e SMDPP (H).....	95

<b>Figura 22 -</b>	Médias e desvios-padrão da concentração sérica de Mieloperoxidase (A) e Catalase (B) para os grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. *diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ). Comparações com valores de $p < 0,1$ também foram representadas nos gráficos.....	96
<b>Figura 23 -</b>	Médias e desvios-padrão da concentração média de: A) IL-10; B) IL-1 $\beta$ ; C) IL-10/ IL-1 $\beta$ ; D) IL-6; E) MCP-1; F) RANTES; G) OPG; H) RANKL; I) RANKL/OPG; J) TNF- $\alpha$ e K) TGF- $\beta$ para todos os grupos. *diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$ ).....	98
<b>Figura 24 -</b>	Médias e desvios-padrão da razão entre Firmicutes e Bacteroidetes, presente nas fezes, para os grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. Letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (Teste t, $p < 0,05$ ).....	99
<b>Figura 25 -</b>	Médias e desvios-padrão das diferenças (delta) na contagem de bactérias entre a 16 <sup>a</sup> semana (T16) e o baseline (T0) nas fezes dos grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. A) $\Delta$ T16-T0 Lactobacilos; B) $\Delta$ T16-T0 Firmicutes; C) $\Delta$ T16-T0 Bifidobacterium; D) $\Delta$ T16-T0 Bacteroidetes. O símbolo * e letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (Teste t, $p < 0,05$ ).....	101

---

## LISTA DE TABELAS

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Composição dos protocolos alimentares que foram utilizados no experimento.....	64
<b>Tabela 2 -</b>	Sequência iniciadora 5'-3' forward (F) e reverse (R) utilizadas para quantificação de <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Lactobacilos</i> e <i>Bifidobacterium</i> por meio de qRT-PCR.....	70
<b>Tabela 3 -</b>	Principais parâmetros metabólicos e antropométricos analisados .....	87

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AGE	Produtos finais da glicação avançada
CAT	Catalase
CCI	Coefficiente de correlação intraclasse
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
cm	Centímetro
COA	Crista óssea alveolar
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DP	Doença Periodontal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Imunoensaio enzimático
EO	Estresse oxidativo
FCG	Fluido crevicular gengival
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Gramma
g/Kg	Gramma/ Kilo
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina
IL	Interleucina
JCE	Junção cimento-esmalte
Kg	Kilo
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade

LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Primeiro molar inferior
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócito-1
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama/decilitro
mg/mL	Miligrama/mililitro
Micro-CT	Microtomografia computadorizada por transmissão de raios X
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
ng	Nanograma
NIC	Nível de inserção conjuntiva
nm	Nanômetros
NOA	Nível ósseo alveolar
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
pg/mL	Picograma/mililitro
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PO	Porosidade Óssea
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RANK-L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-beta
RANTES	Células T normais expressas e secretadas, reguladas por ativação
RAR	Raspagem e alisamento radicular
RCP	Proteína C reativa
rDNA	DNA ribossomal
ROS	Espécies reativas de oxigênio

spp	Várias espécies
TE	Tris-EDTA
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
Th	<i>T-helper</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
UFC	Unidades formadoras de colônia
USP	Universidade de São Paulo
VO	Volume ósseo
VOI	Volume de interesse
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro



---

## LISTA DE SÍMBOLOS

## LISTA DE SÍMBOLOS

-	Menos
%	Por cento
°C	Graus Celsius
+	Mais
<	Menor
±	Mais ou Menos
=	Igual
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
G	Unidade de aceleração
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
M	Concentração molar
n	Tamanho da amostra
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
<i>p</i>	Probabilidade de significância
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Z	Conjunto de números inteiro
$\alpha$	Alfa
$\delta$	Delta
$\sigma$	Desvio padrão
$\beta$	Beta

---

## LISTA DE ANEXOS

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1-</b>	Certificado de aprovação da Comissão de Ética e Uso de Animais em Pesquisa.....	134
-----------------	---	-----

---

## SUMÁRIO

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>40</b>
1.1. Doença Periodontal.....	41
1.2. Síndrome Metabólica.....	44
1.3. A relação entre Doença Periodontal e Síndrome Metabólica.....	44
1.4. O impacto do tratamento periodontal na SM-DP .....	48
1.5. Probióticos e Doença Periodontal.....	49
1.6. Probióticos e Síndrome Metabólica.....	51
<b>2. Justificativa .....</b>	<b>55</b>
<b>3. Proposição .....</b>	<b>58</b>
3.1. Objetivo Geral.....	59
3.2. Objetivos Específicos .....	59
<b>4. Materiais e Métodos .....</b>	<b>60</b>
4.1. Cálculo do tamanho da amostra.....	61
4.2. Apreciação ética.....	61
4.3. Modelo experimental .....	61
4.4. Indução da síndrome metabólica com dieta hipercalórica rica em gordura.....	63
4.5. Indução da doença periodontal experimental com ligadura .....	64
4.6. Administração do agente probiótico .....	65
4.7. Eutanásia e coleta de materiais para análise .....	66
4.8. Parâmetros Antropométricos e Metabólicos.....	67
4.8.1. Pesagem, Cálculo de IMC.....	67
4.8.2. Perfil lipídico .....	67
4.8.3. Glicemia em jejum .....	67
4.8.4. Teste de Tolerância à Glicose .....	68
4.8.5. Insulina.....	68
4.8.6. Resistência à Insulina.....	68
4.9. Aferição da Pressão Arterial Média.....	68
4.10. Análise de Estresse Oxidativo.....	69
4.11. Perfil microbiológico intestinal - Coleta de fezes e qRT-PCR .....	69
4.12. Análise microtomográfica (Micro-CT) .....	70
4.13. Análise imunoenzimática .....	71
4.14. Análise Histológica .....	73

4.15.	Variáveis de resultado .....	73
4.16.	Análise estatística dos dados obtidos .....	73
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>74</b>
5.1.	Pesagem .....	75
5.2.	Circunferência abdominal .....	76
5.3.	Índice de massa corporal (IMC) .....	78
5.4.	Aferição de Pressão Arterial .....	80
5.6.	Glicemia.....	83
5.7.	Teste de Tolerância à Glicose (OGTT).....	83
5.8.	Insulina.....	85
5.9.	Resistência à Insulina (HOMA-IR) .....	85
5.10.	Resumo dos principais dados encontrados em parâmetros metabólicos.....	86
5.11.	Microtomografia computadorizada (Micro-CT) .....	88
5.12.	Análise Histológica .....	93
5.13.	Estresse Oxidativo.....	96
5.14.	Análise Imunoenzimática.....	97
5.15.	Perfil Microbiológico Intestinal (qRT-PCR).....	99
5.15.1.	<i>Razão Firmicutes/Bacteroidetes</i> .....	99
5.15.2.	<i>Lactobacilos, Firmicutes, Bifidobacterium e Bacteroidetes</i> .....	99
<b>6.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>115</b>
	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>117</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>133</b>

---

# 1. Introdução



## 1.1. Doença Periodontal

A doença periodontal (DP) se manifesta como uma resposta inflamatória exagerada do hospedeiro frente a microbiota patogênica e tem elevada complexidade quanto à sua etiologia, classificação, tratamento e manutenção (ALVEAR; MARÃ; BOTERO, 2010; STAMATOVA; MEURMAN, 2009). A DP é considerada um problema de saúde pública, agravada pela sua associação com outras doenças crônicas não transmissíveis e condições externas. De uma forma geral, a DP pode ser classificada em dois grupos distintos: gengivite e periodontite (CATON; ARMITAGE; BERGLUNDH; CHAPPLE *et al.*, 2018). A gengivite caracteriza-se pela presença de inflamação restrita ao periodonto de proteção, frequentemente reversível após a remoção do biofilme e cálculo (CATON; ARMITAGE; BERGLUNDH; CHAPPLE *et al.*, 2018). Já a periodontite parece ter etiologia multifatorial e envolve uma complexa inter-relação entre a infecção bacteriana e a resposta do hospedeiro que resulta em perda progressiva de inserção de tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar de suporte (CEKICI; KANTARCI; HASTURK; VAN DYKE, 2014). Ambas as doenças são induzidas pelo biofilme bacteriano, o qual promove alterações teciduais por meios diretos e indiretos (PAGE; KORNMAN, 1997). Ainda que ocorram manifestações como inchaço e sangramento gengivais, perda óssea visível em radiografias e bolsas periodontais facilmente detectáveis, a periodontite é considerada uma doença silenciosa.

Em 2010, a forma severa da periodontite foi considerada a sexta condição mais prevalente no mundo, afetando 10 a 15% da população mundial (KASSEBAUM; BERNABE; DAHIYA; BHANDARI *et al.*, 2014). Em 2015, 538 milhões de pessoas apresentavam periodontite severa e 276 milhões de pessoas perda total dos dentes (JIN; LAMSTER; GREENSPAN; PITTS *et al.*, 2016; KASSEBAUM; SMITH; BERNABE; FLEMING *et al.*, 2017). Ainda que exista diferenças entre os estudos, a América Latina concentra os maiores índices de prevalência da PE (20,4%) (FRENCKEN; SHARMA; STENHOUSE; GREEN *et al.*, 2017). No Brasil, uma pesquisa realizada em 2010, relatou que a prevalência de indivíduos entre 35 e 44 anos com profundidade de sondagem periodontal  $\geq 4$  mm foi de 19,4% (OPPERMANN; HAAS; ROSING; SUSIN, 2015). Já na cidade de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil), a prevalência de indivíduos com pelo menos seis dentes com nível clínico de inserção  $\geq 5$  mm foi de 62,6%. Além disso, a periodontite nesse estudo foi mais prevalente entre indivíduos do sexo masculino, indivíduos com baixo nível socioeconômico e fumantes (SUSIN; DALLA VECCHIA; OPPERMANN; HAUGEJORDEN *et al.*, 2004). Também há relatos de que prevalência da DP severa aumenta com a idade, sendo mais acentuada entre a terceira e

quarta décadas de vida (FRENCKEN; SHARMA; STENHOUSE; GREEN *et al.*, 2017). Portanto, à medida que a população envelhece, o número de pessoas afetadas por doenças periodontais aumentará ainda mais, e sua prevalência irá se concentrar em grupos mais vulneráveis (GAMONAL; BRAVO; MALHEIROS; STEWART *et al.*, 2020). Embora muitas vezes seja negligenciada, a DP e a perda de elementos dentais podem afetar diretamente a qualidade de vida dos indivíduos, uma vez que a boca (em sua integridade) é crucial para reprodução de sons, aparência, alimentação, socialização e saúde geral (CARVAJAL; VERNAL; REINERO; MALHEIROS *et al.*, 2020). Nesse cenário, a saúde pública, as Universidades e pesquisadores constituem papel fundamental no desenvolvimento de estratégias para promoção de saúde periodontal, diagnóstico precoce, tratamento efetivo e, principalmente, conscientização de pacientes e cirurgiões-dentistas sobre a importância da DP e seu impacto na saúde integral do indivíduo, na qual se inclui: qualidade de vida, saúde bucal e sistêmica.

Apesar de já ser bem estabelecido que um complexo microbiano coloniza as regiões sulculares entre a superfície do dente e a margem gengival e leva, por meios diretos e indiretos, à perda de inserção, formação de bolsa periodontal e perda óssea alveolar (PAGE; KORNMAN, 1997), a presença isolada do biofilme responde por uma pequena proporção (20%) de variações na expressão da DP (KOROMANTZOS; MAKRILAKIS; DEREKA; KATSILAMBROS *et al.*, 2011). Hajishengallis e Lamont (2012), propuseram um novo modelo de patogênese periodontal baseado nos conceitos de sinergismo e disbiose polimicrobiana. Segundo os autores, a destruição periodontal parece ser iniciada por um desequilíbrio na comunidade microbiana e não somente por periodontopatógenos específicos.

Já foi demonstrado que alterações na comunidade microbiana (disbiose) do biofilme dentário estão associadas a mudanças no estado clínico dos tecidos do hospedeiro (KUMAR; LEYS; BRYK; MARTINEZ *et al.*, 2006). Desse modo, a estabilidade da composição microbiana do biofilme parece ser um bom preditor da saúde periodontal. Além disso, o sistema de defesa imune inato do hospedeiro é altamente ativo em tecidos saudáveis e o desequilíbrio na expressão de mediadores inflamatórios contribui de forma significativa para a destruição dos tecidos periodontais (CHAMPAGNE; BUCHANAN; REDDY; PREISSER *et al.*, 2003; DARVEAU, 2010; LARSSON, 2017; PAGE; KORNMAN, 1997; VAN DYKE; BARTOLD; REYNOLDS, 2020). A magnitude desta resposta imunoinflamatória, em nível celular e molecular, também é ditada pelas características genéticas e epigenéticas do hospedeiro associadas às várias exposições sistêmicas/ambientais, dentre elas tabagismo, estresse, obesidade e hiperglicemia (ALBANDAR; SUSIN; HUGHES, 2018; GAMONAL; BRAVO;

MALHEIROS; STEWART *et al.*, 2020; GENCO; SANZ, 2020; LARSSON, 2017). Uma alteração no padrão epigenético, por exemplo, pode contribuir para as diferenças individuais na expressão gênica local associada à inflamação e suscetibilidade à doença (LARSSON, 2017).

Notoriamente, as duas condições citadas acima (disbiose e resposta imune ou inflamação) que levam à destruição progressiva dos tecidos de suporte ao redor do dente não parecem ocorrer de forma isolada, sendo, praticamente, coexistentes. Entretanto, ainda não está claro qual das duas é a pioneira e de fato desencadeia todo o processo. Mesmo com todo o avanço técnico e científico nos estudos de microbiologia e imunologia, ainda existem muitas questões a serem investigadas e respondidas acerca da patogênese da DP (VAN DYKE; BARTOLD; REYNOLDS, 2020). De qualquer forma, é totalmente razoável pensar que o controle direto inflamação pode ser uma estratégia para controle da DP.

Em situação de homeostase, é comum identificar neutrófilos no tecido gengival sem sinais clínicos de inflamação como sangramento ou edema. Essa inflamação de baixo grau também é conhecida como estado de “vigilância”. Nessa situação, o periodonto expressa citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular que estão intimamente envolvidas na manutenção da estabilidade dos tecidos periodontais (DARVEAU, 2010). As camadas mais externas do epitélio gengival, quando expostas às bactérias, são capazes de produzir interleucina (IL)-8 e  $\beta$ -defensinas e muitas outras citocinas comumente associadas à inflamação, tais como IL-1 $\beta$ , Fator de necrose tumoral (TNF) e prostaglandina E2 (PGE2) (DARVEAU, 2010; LU; SAMARANAYAKE; DARVEAU; JIN, 2005).

Na grande maioria dos pacientes, quando não há controle adequado de higiene bucal e, conseqüentemente, acúmulo de biofilme bacteriano, ocorre uma inflamação de caráter destrutivo que leva à perda local de colágeno. Essa situação ainda pode ser reversível após a remoção do desafio bacteriano e conseqüente resolução da inflamação. O que exatamente desencadeia a evolução desse quadro reversível (gingivite) para a periodontite ainda não está muito bem esclarecido (VAN DYKE; BARTOLD; REYNOLDS, 2020). Existem evidências de que a resposta imune adquirida que pode ser destrutiva ou reparadora em diferentes circunstâncias e de que a mudança para uma microbiota disbiótica ocorre devido a um ambiente de inflamação persistente (VAN DYKE; BARTOLD; REYNOLDS, 2020). Nesse contexto, tem sido sugerido que o processo inflamatório poderia atuar como um elo entre doenças bucais, como a DP, e doenças sistêmicas, tais como doenças cardiovasculares ateroscleróticas, *diabetes mellitus* (DM), obesidade, hipertensão, síndrome metabólica (SM) entre outras (FRIEDEWALD; KORNMAN; BECK; GENCO *et al.*, 2009; JEPSEN; SUVAN;

DESCHNER, 2020; SANZ; MARCO DEL CASTILLO; JEPSEN; GONZALEZ-JUANATEY *et al.*, 2020).

## 1.2. Síndrome Metabólica

A SM é uma doença amplamente prevalente e multifatorial, caracterizada por um espectro de anormalidades metabólicas interconectadas, que aumentam diretamente o risco de doenças cardiovasculares (DCV), DM tipo 2 (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005), além de contribuir, em grande parte, para a morbidade e mortalidade globais devido às suas principais comorbidades (GRUNDY; CLEEMAN; DANIELS; DONATO *et al.*, 2005; YUSUF; REDDY; OUNPUU; ANAND, 2001). A prevalência da SM aumentou nas últimas décadas, com percentual estimado em 34,7% nos EUA em 2011-2012. Em adultos, com idade  $\geq 60$  anos, a prevalência relatada foi de 46,7% em comparação com 18,3% na faixa etária de 20-39 anos (AGUILAR; BHUKET; TORRES; LIU *et al.*, 2015).

Diferentes critérios de diagnóstico da SM já foram propostos por organizações da saúde (Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III), 2001; GRUNDY; CLEEMAN; DANIELS; DONATO *et al.*, 2005). Contudo, todos os critérios apontam as seguintes condições: obesidade, dislipidemia (aumento dos triglicérides e lipoproteínas de baixa densidade - LDL), hipertensão e hiperglicemia (JEPSEN; SUVAN; DESCHNER, 2020). Recentemente, outras anormalidades foram incorporadas ao conjunto de alterações da SM, tais como: doenças crônicas renais e doença hepática gordurosa não alcoólica (SRIKANTHAN; FEYH; VISWESHWAR; SHAPIRO *et al.*, 2016). Entretanto, o consenso é que o diagnóstico da SM deve ser feito pela presença de pelo menos três comorbidades (ALBERTI; ECKEL; GRUNDY; ZIMMET *et al.*, 2009), sendo as mais frequentes: obesidade, hipertensão e hiperglicemia (ERVIN, 2009). É importante destacar que todas essas comorbidades presentes na SM também já foram associadas à DP (JEPSEN; SUVAN; DESCHNER, 2020).

## 1.3. A relação entre Doença Periodontal e Síndrome Metabólica

Uma metanálise publicada por (NIBALI; TATARAKIS; NEEDLEMAN; TU *et al.*, 2013) revelou uma clara associação entre SM e PE. Os autores demonstraram nesta metanálise

que indivíduos com SM são quase duas vezes mais predispostos a desenvolver DP do que o restante da população. Em um estudo envolvendo uma população tailandesa, Thanakun et al. (2014) concluíram que a SM pode ser considerada um forte fator de risco para a PE e ressaltaram a importância dos cirurgiões-dentistas considerarem a relação SM-PE na determinação de condutas terapêuticas periodontais. Morita et al. (2010) detectaram a presença de bolsas periodontais após quatro anos de acompanhamento em 1023 pacientes e associaram estes achados clínicos periodontais com a presença alterada de um ou mais dos componentes da SM. A meta-análise mais recente publicada até o presente momento também encontrou associação positiva entre SM e DP (DAUDT; MUSSKOPF; MENDEZ; REMONTI *et al.*, 2018). Os autores também sugeriram que sejam realizados estudos prospectivos para determinar a relação de causa e efeito entre essas condições. Outros estudos de associação (DOĞAN; DOĞAN; FENTOĞLU; KIRZIOĞLU, 2019; HLUSHCHENKO; BATIG; BORYSENKO; TOKAR *et al.*, 2020; MONTERO; MOLINA; CARASOL; FERNÁNDEZ-MESEGUER *et al.*, 2021) e uma revisão (JEPSEN; SUVAN; DESCHNER, 2020) foram realizados após a metanálise de Daudt et al (2018) e também demonstraram íntima associação entre SM e DP.

O estudo transversal mais recente publicado até a presente data, analisou a condição periodontal de 5154 indivíduos da Espanha (MONTERO; MOLINA; CARASOL; FERNÁNDEZ-MESEGUER *et al.*, 2021). Os autores relataram que DP e SM estão significativamente relacionadas, sendo a pior condição periodontal associada a maiores chances de sofrer de SM, independentemente das comorbidades incluídas na definição da síndrome, sendo a hipertensão o componente com maior associação com a DP. Os autores destacaram ainda a importância de consultas odontológicas rotineiras para avaliação e manutenção do status periodontal em pacientes com SM (MONTERO; MOLINA; CARASOL; FERNÁNDEZ-MESEGUER *et al.*, 2021).

Já o estudo de Hlushchenko *et al.*, 2020 demonstrou o impacto da SM na DP. Dentre os 190 com SM incluídos no estudo, a PE foi detectada em 155. Também foram analisados 90 pacientes sem SM, e o risco de ter PE nesses indivíduos foi 1,2 vezes menor. Os autores sugeriram que a SM, como um fator de alto risco para o desenvolvimento de DM, cria condições (como o constante quadro sistêmico inflamatório) para a formação e rápida progressão de lesões periodontais destrutivas.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a possível associação entre SM e DP, tais como o deslocamento sistêmico de bactérias periodontais (FORNER; LARSEN; KILIAN; HOLMSTRUP, 2006), a liberação de citocinas inflamatórias pelo tecido periodontal

ou adiposo (HAN; JI; WANG; YAN *et al.*, 2011), o estresse oxidativo (EO) (OHNISHI; BANDOW; KAKIMOTO; MACHIGASHIRA *et al.*, 2009), a presença de lipoproteínas pró-aterogênicas (RIZZO; CAPPELLO; MARFIL; NIBALI *et al.*, 2012), a obesidade abdominal (ANDRIANKAJA; SREENIVASA; DUNFORD; DENARDIN, 2010), a reatividade cruzada e o mimetismo molecular bacteriano (ARIMATSU; YAMADA; MIYAZAWA; MINAGAWA *et al.*, 2014). Entre esses mecanismos, o EO parece ser um dos elos mais plausível capaz de ligar a fisiopatologia de ambas as condições, permitindo hipotetizar um relacionamento bidirecional entre elas (BULLON; MORILLO; RAMIREZ-TORTOSA; QUILES *et al.*, 2009).

O EO é uma condição na qual ocorre desequilíbrio entre a produção e a inativação de espécies reativas de oxigênio (ROS)(CERIELLO, ANTONIO; MOTZ, ENRICO, 2004). As ROS têm um papel essencial em uma variedade de sistemas fisiológicos, mas, sob uma condição de EO, contribuem para a disfunção celular. As condições presentes na SM (dislipidemia, hipertensão e hiperglicemia) promovem aumento de EO. Além disso, um aumento da ingestão calórica eleva a atividade metabólica, o que resulta em produção aumentada de ROS e resistência à insulina. Os pacientes obesos necessitam, então, de maiores doses de insulina para manter a homeostase da glicose no sangue. Esta condição, conhecida como a hiperinsulinemia, pode evoluir para DM tipo 2 (CERIELLO, ANTONIO; MOTZ, ENRICO, 2004; SGOLASTRA; PETRUCCI; GATTO; MONACO, 2012). A consequente hiperglicemia e um estado de oxidação promovem a gênese de produtos finais de glicosilação avançada (AGE). Os AGEs podem atuar causando apoptose em osteoblastos e fibroblastos (ALIKHANI; ALIKHANI; BOYD; MACLELLAN *et al.*, 2007), o que pode influenciar na homeostase do osso alveolar e na progressão da periodontite. A alta expressão de receptores de AGEs nos tecidos periodontais (KATZ; BHATTACHARYYA; FARKHONDEH-KISH; PEREZ *et al.*, 2005) é um achado importante que pode explicar a sensibilidade desses tecidos aos produtos derivados do dano oxidativo. Da mesma forma que em indivíduos com SM, diversos estudos têm demonstrado um aumento nos produtos do dano oxidativo no sangue periférico de indivíduos com periodontite quando comparados 'àqueles sem periodontite (BALTACIOGLU; AKALIN; ALVER; DEGER *et al.*, 2008; BATTINO; FERREIRO; BOMPADRE; LEONE *et al.*, 2001; MONTEBUGNOLI; SERVIDIO; MIATON; PRATI *et al.*, 2004). Portanto, o estado pró-oxidativo acentuado e a redução da capacidade antioxidante encontrada em indivíduos com periodontite pode levar a uma diminuição da sensibilidade à insulina, a qual pode ser agravada em indivíduos com uma dieta rica em gorduras (BULLON; MORILLO; RAMIREZ-TORTOSA; QUILES *et al.*, 2009).

Outro mecanismo que relaciona DP e SM advém da expressão de citocinas pró-inflamatórias encontradas nessas duas condições. Chauhan et al. (2016) sugeriram que os níveis salivares de TNF- $\alpha$  podem ser utilizados com um marcador de SM e DP. O TNF- $\alpha$  estimula a reabsorção óssea e os fibroblastos a produzirem colagenase (BERTOLINI; NEDWIN; BRINGMAN; SMITH *et al.*, 1986; MEIKLE; ATKINSON; WARD; MURPHY *et al.*, 1989) e aumenta a apoptose de células produtoras de matriz, limitando a capacidade de reparo dos tecidos periodontais (ALIKHANI; ALIKHANI; BOYD; MACLELLAN *et al.*, 2007; GRAVES; OSKOU; VOLEJNIKOVA; NAGUIB *et al.*, 2001; HOCK; KRISHNAN; ONYIA; BIDWELL *et al.*, 2001). IL-1 $\beta$  e IL-8, essenciais na resposta inflamatória, também encontram-se em níveis aumentados nos tecidos com DP (KINANE; LAPPIN, 2002). Em um estudo de Han et al. (2012), os níveis sorológicos de proteína C-reativa (RCP), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e homocisteína, em uma população coreana, foram associados à coexistência DP-SM. A relação Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa beta (RANKL)/Osteoprotegerina (OPG) e o Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF), fundamentais no processo de osteoclastogênese e reabsorção óssea alveolar (LEE; KIM; YEON; CHOI *et al.*, 2009; MENEZES; GARLET; LETRA; BRAMANTE *et al.*, 2008; TAUBMAN; VALVERDE; HAN; KAWAI, 2005), bem como a Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP-1) apresentam expressão periodontal aumentada em camundongos com SM (LI; LU; ZHANG; YU *et al.*, 2015). Outra quimiocina que desempenha um papel importante na reabsorção óssea trata-se das Células T normais expressas e secretadas, reguladas por ativação (RANTES). Indivíduos com gengivite e SM apresentaram níveis de RANTES significativamente maiores do que aqueles com gengivite e sem SM (GURKAN; EREN; CETINKALP; AKCAY *et al.*, 2016).

Além de citocinas pró-inflamatórias, a associação DP-SM pode modificar a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- $\beta$ ). A IL-10 é uma citocina que modula o sistema imune, reduzindo a atividade de citocinas pró-inflamatórias. Recentemente, demonstrou-se que a obesidade pode afetar os níveis de IL-6 e IL-10 de forma antagônica (DOGAN; TORAMAN; SEBIN; DOGAN *et al.*, 2016). O tratamento periodontal de pacientes portadores de SM e periodontite crônica aumentou os níveis de IL-10 (TORUMTAY; KIRZIOGLU; OZTURK TONGUC; KALE *et al.*, 2016). O TGF- $\beta$  é um fator de crescimento que participa ativamente nos processos de cicatrização e na homeostase tecidual (GIBERTONI; SOMMER; ESQUISATTO; AMARAL *et al.*, 2017; LAL; SAITO; PAPPAS; PADBERG *et al.*, 2003; TANG; KHAN; ANDREANA; ARANY, 2017). Anormalidades nas vias de sinalização do TGF- $\beta$  podem estar associadas às comorbidades da SM (LIGI; CROCE; MOSTI; RAFFETTO *et al.*, 2017; TOMA; MCCAFFREY, 2012). Os

níveis de TGF- $\beta$  podem também auxiliar no monitoramento da resposta ao tratamento periodontal (LIN; KUO; LIU; YANG *et al.*, 2017).

#### 1.4. O impacto do tratamento periodontal na SM-DP

Poucos estudos investigaram os impactos do tratamento periodontal em pacientes portadores de SM. Jenzsch *et al.* (2009) demonstraram que o tratamento periodontal não cirúrgico de pacientes com SM e DP promoveu benefícios na condição clínica periodontal e também resultou na redução das concentrações de IL-1 $\beta$  e IL-6 no fluido crevicular gengival (FCG). Outros estudos clínicos mostraram que a terapia periodontal proporcionou uma diminuição significativa de RCP (ACHARYA; BHAVSAR; JADAV; PARIKH, 2010; LOPEZ; QUINTERO; CASANOVA; IBIETA *et al.*, 2012), contagem de leucócitos total e triglicerídeos e um aumento de lipoproteína de alta densidade (HDL) (ACHARYA; BHAVSAR; JADAV; PARIKH, 2010).

Em um estudo clínico com 50 pacientes, sendo 25 portadores de SM e 25 sistemicamente saudáveis, Torumtay *et al.* (2016) compararam os efeitos de RAR em marcadores de estresse oxidativo e inflamação. A RAR diminuiu o estresse oxidativo e o estado inflamatório de pacientes com SM e periodontite crônica. Embora a melhora periodontal ocasionada pela RAR tenha sido semelhante em ambos os grupos, as diminuições nos níveis de RCP e IL-6 no grupo com SM não atingiram níveis semelhantes aos pacientes sistemicamente saudáveis. Além disso, houve redução dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) e triglicerídeos nos indivíduos com SM (TORUMTAY; KIRZIOGLU; OZTURK TONGUC; KALE *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que a RAR, mesmo considerada padrão ouro no tratamento da periodontite, não produz os resultados clínicos satisfatórios em casos graves quando usada isoladamente em pacientes altamente susceptíveis à periodontite (BEREZOW; DARVEAU, 2011). Desse modo, o uso de estratégias terapêuticas adjuvantes ao tratamento clínico periodontal convencional parece ser necessário em pacientes portadores de SM. Tem sido sugerido que o uso associado de antimicrobianos sistêmicos e RAR, além dos benefícios clínicos já conhecidos, pode ter um impacto maior sobre os marcadores de inflamação sistêmica em pacientes com DP (DEMMER; TRINQUART; ZUK; FU *et al.*, 2013) quando comparado ao uso isolado da RAR.

O estudo clínico mais recente que avaliou o efeito da terapia periodontal na SM utilizou 63 pacientes com periodontite severa e SM (MONTERO; LÓPEZ; VIDAL; MARTÍNEZ *et al.*,



2020). Os pacientes foram aleatoriamente divididos de acordo com o protocolo de tratamento periodontal adotado: RAR associado ao uso de azitromicina ou apenas RAR. Quando reavaliados, após 6 meses do tratamento, ambos os grupos apresentavam redução dos níveis de RCP. No grupo tratado com RAR e azitromicina, após 3 meses, houve redução dos níveis de HbA1c e da pressão arterial quando comparado ao baseline (MONTERO; LÓPEZ; VIDAL; MARTÍNEZ *et al.*, 2020). De fato, uma maior redução da inflamação sistêmica poderia ter um impacto direto na melhora das comorbidades da SM. Entretanto, nenhum efeito adicional da terapia antibiótica à RAR durante o tratamento periodontal básico foi observado na pressão arterial, nos níveis de triglicérides e no estado metabólico geral de pacientes portadores de SM e DP (MONTERO; LÓPEZ; VIDAL; MARTÍNEZ *et al.*, 2020). Achados similares foram relatados por um estudo de (LOPEZ; QUINTERO; CASANOVA; IBIETA *et al.*, 2012), no qual a magnitude do efeito adicional da terapia antibiótica nos parâmetros clínicos periodontais também pareceu reduzida nos pacientes portadores de SM.

Embora outros estudos demonstrem os benefícios do tratamento periodontal, isolado ou associado a terapias adjuvantes, em importantes comorbidades da SM como hipertensão (CZESNIKIEWICZ-GUZYK; OSMENDA; SIEDLINSKI; NOSALSKI *et al.*, 2019; MUÑOZ AGUILERA; SUVAN; BUTI; CZESNIKIEWICZ-GUZYK *et al.*, 2020), obesidade (OUCHI; PARKER; LUGUS; WALSH, 2011) e DM (BAEZA; MORALES; CISTERNA; CAVALLA *et al.*, 2020; FISCHER; LIRA JUNIOR; RETAMAL-VALDES; FIGUEIREDO *et al.*, 2020), mais estudos intervencionistas e com acompanhamento a longo prazo em pacientes com SM são necessários. Nesse contexto, novas abordagens preventivas e tratamento mais eficazes para gengivite e periodontite, alicerçadas nos avanços da compreensão da modulação de resposta do hospedeiro e resolução da inflamação, bem como no gerenciamento direto da microbiota, são urgentemente necessárias (TONETTI; CHAPPLE, 2011).

### **1.5. Probióticos e Doença Periodontal**

O uso de probióticos tem atraído o interesse da comunidade científica como uma nova alternativa para o tratamento da periodontite, uma vez que os mesmos podem ter ações antimicrobianas e, também, são capazes de modular a resposta imune-inflamatória do hospedeiro (TEUGHEL; LOOZEN; QUIRYNEN, 2011). Eles são definidos como microrganismos vivos, principalmente bactérias, seguros para o consumo e quando

administrados em doses adequadas são capazes de produzir efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (HILL; GUARNER; REID; GIBSON *et al.*, 2014).

A introdução de probióticos visando promover a saúde periodontal considera três fatores etiológicos determinantes da periodontite: 1) a suscetibilidade do hospedeiro, 2) a presença de bactérias patogênicas e 3) a redução ou ausência das bactérias benéficas (SLOTS; RAMS, 1991; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1992; WOLFF; DAHLEN; AEPPLI, 1994). Neste contexto, recuperar a quantidade de bactérias benéficas bucais por meio do uso de probióticos parece ser uma estratégia válida na prevenção e tratamento da DP relacionada ao biofilme.

Alguns estudos demonstraram que algumas espécies probióticas podem atenuar a expressão de IL-8 induzida por periodontopatógenos nas células epiteliais bucais e reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) no FCG (COSSEAU; DEVINE; DULLAGHAN; GARDY *et al.*, 2008; SLIEPEN; VAN DAMME; VAN ESSCHE; LOOZEN *et al.*, 2009; TWETMAN; DERAWI; KELLER; EKSTRAND *et al.*, 2009; ZHANG; WARD; DAUCH; TANZI *et al.*, 2018). Shimauchi *et al.* (2008) verificaram que o consumo de probióticos diminuiu significativamente os níveis de lactoferrina salivar, uma proteína indicativa de inflamação periodontal, em indivíduos altamente susceptíveis à periodontite.

De forma geral, os estudos que avaliaram os efeitos dos probióticos na prevenção, controle e tratamento de doenças periodontais demonstraram que eles podem promover a redução de periodontopatógenos (INVERNICI; FURLANETO; SALVADOR; OUWEHAND *et al.*, 2020; MAYANAGI; KIMURA; NAKAYA; HIRATA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, L. F.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H.; FURLANETO, F. A. *et al.*, 2017; TSUBURA; MIZUNUMA; ISHIKAWA; OYAKE *et al.*, 2009; ZHRADNIK; MAGNUSSON; WALKER; MCDONELL *et al.*, 2009), melhorar os parâmetros clínicos periodontais (RICCIA; BIZZINI; PERILLI; POLIMENI *et al.*, 2007; SHIMAUCHI; MAYANAGI; NAKAYA; MINAMIBUCHI *et al.*, 2008; TSUBURA; MIZUNUMA; ISHIKAWA; OYAKE *et al.*, 2009), diminuir os níveis salivares de prostaglandina E2 e metaloproteinases da matriz (MMP) e os níveis de citocinas pró-inflamatórias (CARDOSO; MESSORA; SILVA; OLIVEIRA *et al.*, 2020; RICCIA; BIZZINI; PERILLI; POLIMENI *et al.*, 2007; STAAB; EICK; KNOFLER; JENTSCH, 2009; SZKARADKIEWICZ; STOPA; KARPINSKI, 2014) inibir o desenvolvimento de gengivite e potencializar os efeitos da RAR na DP (GRUSOVIN; BOSSINI; CALZA; CAPPÀ *et al.*, 2020; IKRAM; HASSAN; BAIG; BORGES *et al.*, 2019; IKRAM; HASSAN; RAFFAT; MIRZA *et al.*, 2018; INCE; GURSOY; IPCI; CAKAR *et al.*, 2015; INVERNICI; FURLANETO; SALVADOR; OUWEHAND *et al.*, 2020; INVERNICI; SALVADOR; SILVA; SOARES; CASARIN; PALIOTO; SOUZA *et al.*, 2018; KURU;

LALEMAN; YALNIZOGLU; KURU *et al.*, 2017; KURU; LALEMAN; YALNIZOĞLU; KURU *et al.*, 2017; SHAH; GUJJARI; CHANDRASEKHAR, 2013; TEUGHEL; DURUKAN; OZCELIK; PAUWELS *et al.*, 2013)

Enquanto a maioria dos estudos que avaliaram os efeitos de probióticos na DP investigaram a atuação de cepas do gênero *Lactobacilos*, poucos estudos avaliaram o efeito in vivo de bactérias do gênero *Bifidobacterium* na DP (CARDOSO; MESSORA; SILVA; OLIVEIRA *et al.*, 2020; INVERNICI; FURLANETO; SALVADOR; OUWEHAND *et al.*, 2020; INVERNICI; SALVADOR; SILVA; SOARES; CASARIN; PALIOTO; SOUZA, 2018; KURU; LALEMAN; YALNIZOĞLU; KURU *et al.*, 2017; RICOLDI; FURLANETO; OLIVEIRA; TEIXEIRA *et al.*, 2017). Oliveira *et al.* (2017) demonstraram que o uso tópico de *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) promoveu um efeito protetor contra a perda óssea alveolar e de inserção conjuntiva em ratos com periodontite experimental, modificando parâmetros imunoinflamatórios e microbiológicos. Esses efeitos também foram encontrados quando *B. lactis* HN019 foi administrado em ratos com artrite reumatóide (CARDOSO; MESSORA; SILVA; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Ricoldi *et al.* (2017) concluíram que *B. lactis* HN019 pode melhorar o potencial da RAR no tratamento da periodontite experimental em ratos. Em um estudo clínico, Kuru *et al.* (2017) observaram que o uso de um iogurte probiótico suplementado com *Bifidobacterium* pode ter um efeito positivo no acúmulo de placa e nos parâmetros inflamatórios gengivais. A combinação de *L. rhamnosus* e *B. lactis* também parece ter resultados favoráveis em adolescentes periodontalmente saudáveis, promovendo melhorias significativas no índice de placa e no índice gengival, reduções de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* na saliva e biofilme, reduções de *P. gingivalis* no biofilme e diminuição da contagem total de bactérias salivares (ALANZI; HONKALA; HONKALA; VARGHESE *et al.*, 2018). Invernici *et al.* (2020), em um estudo com 30 pacientes que foram acompanhados por 90 dias, demonstraram redução significativa do índice de placa e do índice de sangramento gengival marginal em pacientes que receberam terapia probiótica com *B. lactis* HN019 adjuvante à RAR quando comparados aos pacientes do grupo placebo. Além desses achados, os autores investigaram o comportamento in vitro de *B. lactis* HN019 e demonstraram que essa cepa apresenta potencial antimicrobiano contra periodontopatógenos, além de reduzir a adesão de *P. gingivalis* a células epiteliais bucais na sua presença.

## 1.6. Probióticos e Síndrome Metabólica

Atualmente, tem sido proposto que a microbiota do intestino pode estar envolvida em doenças metabólicas associadas à obesidade (BACKHED; MANCHESTER; SEMENKOVICH; GORDON, 2007; CHEN; WANG; LI; WANG, 2012). De fato, os seres humanos e a microbiota intestinal estão em uma relação simbiótica. A microbiota intestinal desempenha tarefas metabólicas e imunológicas importantes, sendo que alterações na sua composição podem prejudicar a homeostasia do organismo. Teoricamente, todas as condições sistêmicas associadas ao comprometimento da microbiota intestinal poderiam ser beneficiadas pela modulação terapêutica desta microbiota (IANIRO; BIBBO; GASBARRINI; CAMMAROTA, 2014). Um estudo realizado em camundongos demonstrou que a alimentação com alto teor de gordura promoveu inflamação intestinal e, também, resistência à insulina, as quais foram associadas com um número reduzido de espécies de *Bifidobacterium* no ambiente intestinal (CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M. *et al.*, 2007).

A administração de probióticos contendo *Bifidobacterium* está associada a uma melhor atuação da barreira epitelial do intestino, promovida pelo aumento da expressão de proteínas nesta região com reflexos diretos na saúde sistêmica geral (AMAR; CHABO; WAGET; KLOPP *et al.*, 2011; CANI, PATRICE D.; AMAR, JACQUES; IGLESIAS, MIGUEL ANGEL; POGGI, MARJORIE *et al.*, 2007). Chen *et al.* (2012) demonstraram que a modulação dietética da microbiota do intestino com o aumento de *Bifidobacterium* foi capaz de reduzir o acúmulo de gordura visceral (esteatose hepática e gordura mesentérica), bem como melhorar a sensibilidade à insulina em ratos com dieta rica em gordura. Também já foi demonstrado que a administração de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* reduziu a esteatose hepática e o número de adipócitos e enterócitos em ratos obesos, melhorou a função dos macrófagos e células dendríticas em relação à fagocitose, aumentou a produção de citocinas e induziu a proliferação de linfócitos T (CANO; SANTACRUZ; TREJO; SANZ, 2013). Além disso, a administração de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* em ratos com dieta rica em gordura foi capaz de reduzir a infiltração de macrófagos para o interior do tecido adiposo, contribuindo para a melhoria da homeostase glicose-insulina e da esteatose hepática (WANG; TANG; ZHANG; ZHAO *et al.*, 2015).

Alguns estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que a utilização de probióticos também pode ser uma alternativa promissora no tratamento e prevenção da SM (BARRETO; COLADO SIMAO; MORIMOTO; BATISTI LOZOVY *et al.*, 2014; BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006; CANI; DELZENNE, 2009; CANI; NEYRINCK; FAVA; KNAUF *et al.*, 2007; KIMOTO; OHMOMO; OKAMOTO, 2002; PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; CHINCHOLKAR, S. B., 2010; SHARAFEDTINOV; PLOTNIKOVA; ALEXEEVA;

SENTSOVA *et al.*, 2013; WANG; LIU; GAO; HAO, 2013), podendo atuar nas suas principais comorbidades. Os probióticos são capazes de incorporar o colesterol em sua membrana celular, causando uma absorção reduzida e, conseqüentemente, diminuindo os níveis séricos de colesterol total (KIMOTO; OHMOMO; OKAMOTO, 2002). Além disso, os probióticos produzem hidrolases, que diminuem a absorção do colesterol através de uma maior excreção de sais biliares (BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006; PATEL, ANIL K.; SINGHANIA, REETA R.; PANDEY, ASHOK; CHINCHOLKAR, SUDHIR B., 2010) Probióticos também podem afetar a pressão arterial influenciando no estresse oxidativo, no sistema de angiotensina, na inflamação sistêmica (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e MCP-1) e na produção de endotelina e peroxinitrito (KANG; CAI, 2018). Tomaro-Duchesneau *et al.* (2014) demonstraram que a administração de *Lactobacillus fermentum*, microrganismos produtores de ácido ferúlico, reduziu os níveis de insulina em jejum, a resistência à insulina, os níveis séricos de triglicérides, LDL e os índices aterogênicos e ateroscleróticos em ratos Zucker obesos. Além disso, a terapia probiótica aumentou significativamente os níveis de HDL, contribuindo para o controle dos marcadores envolvidos na patogênese da SM (TOMARO-DUCHESNEAU; SAHA; MALHOTRA; JONES *et al.*, 2014).

A possibilidade de tratar doenças bucais com um método natural, não-invasivo e menos estressante é particularmente atraente e pode evitar problemas relacionados a efeitos farmacológicos decorrentes do uso de antibióticos (NISSEN; SGORBATI; BIAVATI; BELIBASAKIS, 2014). Do mesmo modo, novas abordagens terapêuticas também precisam ser melhor investigadas para o tratamento de pacientes portadores de SM, já que métodos atuais envolvendo modificações do estilo de vida e uso de agentes farmacológicos nem sempre são efetivos (LEBOVITZ, 2011), além de gerar efeitos colaterais pelo uso constante de medicamentos (GRUNDY, 2005). Neste contexto, alguns estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que a utilização de probióticos pode ser uma promissora alternativa terapêutica/preventiva para a SM e para a periodontite. Entretanto, as evidências existentes ainda são preliminares e necessitam de mais comprovações. Novos estudos são fundamentais para melhor elucidar o papel das bactérias benéficas na cavidade bucal e na patogênese da SM, identificar novas espécies de bactérias com potencial terapêutico, estabelecer tempos e novos veículos de administração e determinar a real significância clínica desta terapia.

Dessa forma, considerando que i) as atuais abordagens preventivas/terapêuticas para DP não têm sido totalmente efetivas para uma parcela da população que apresenta alto risco para a doença e formas mais severas da mesma (FISCHER; LIRA JUNIOR; RETAMAL-VALDES; FIGUEIREDO *et al.*, 2020), ii) que o tratamento periodontal bem sucedido em pacientes com

SM pode reduzir a inflamação sistêmica e os riscos de doenças cardiovasculares (ACHARYA; BHAVSAR; JADAV; PARIKH, 2010; BIZZARRO; VAN DER VELDEN; TEEUW; GERDES *et al.*, 2017) e iii) que as medidas atualmente disponíveis para prevenção e controle das complicações da SM apresentam efeitos colaterais indesejáveis e eficácia parcial (GRUNDY, 2005; GRUNDY; CLEEMAN; DANIELS; DONATO *et al.*, 2005; LEBOVITZ, 2011), investigações de novas estratégias de prevenção ou tratamento para ambas as condições são urgentemente necessárias e podem proporcionar um impacto significativo nos programas de saúde pública mundiais. Até o presente momento, nenhum estudo avaliou o impacto da terapia probiótica isoladamente na associação SM-DP.

---

## 2. Justificativa

A SM, englobando o *diabetes mellitus* tipo 2 e as doenças cardiovasculares, é considerada um preocupante problema de saúde pública nos países industrializados (FORD; GILES; DIETZ, 2002). Nos EUA, em 2005, a incidência de *diabetes mellitus* tipo 2 foi estimada em 16,2 milhões de indivíduos, projetando-se um aumento para 48,3 milhões em 2050 (NARAYAN; BOYLE; GEISS; SAADDINE *et al.*, 2006). As doenças cardiovasculares, responsáveis por cerca de 16,7 milhões de mortes em todo o mundo, são as principais causas de morbidade e mortalidades globais (GENEST; MCPHERSON; FROHLICH; ANDERSON *et al.*, 2009; TARRIDE; LIM; DESMEULES; LUO *et al.*, 2009). Da mesma forma, a DP é altamente prevalente na população mundial. Em um levantamento epidemiológico realizado nos Estados Unidos, foi demonstrado que um em cada dois americanos com 30 anos de idade ou mais possui DP (EKE; DYE; WEI; THORNTON-EVANS *et al.*, 2012). Neste estudo, 47% da amostra examinada, representando 64,7 milhões de adultos, apresentavam periodontite nas formas leve (8,7%), moderada (30%) e severa (8,5%). Para adultos com 65 anos de idade ou mais, o percentual de ocorrência de periodontite moderada ou severa foi de 64% (EKE; DYE; WEI; THORNTON-EVANS *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, os estudos proporcionaram avanços importantes na compreensão dos etiopatogênese da DP, na identificação dos fatores de risco para a DP e, também, demonstraram importantes associações epidemiológicas entre DP e doenças sistêmicas, assim como maior conhecimento sobre os mecanismos que explicam essas associações e sua provável relevância para a saúde pública (GENCO; SANZ, 2020). Nesse contexto, existem diversas evidências de que DP e SM, assim como suas comorbidades, estão relacionadas (DAUDT; MUSSKOPF; MENDEZ; REMONTI *et al.*, 2018; JEPSEN; SUVAN; DESCHNER, 2020; NIBALI; TATARAKIS; NEEDLEMAN; TU *et al.*, 2013). E essa relação parece cada vez ser melhor explicada nos conceitos de saúde e doença geral a partir do eixo cérebro-boca-intestino



(ARIMATSU; YAMADA; MIYAZAWA; MINAGAWA *et al.*, 2014; HAJISHENGALLIS, 2015; LOURENÇO; SPENCER; ALM; COLOMBO, 2018).

De fato, o conceito de modular a microbiota intestinal por meio do uso de bactérias específicas para melhorar o metabolismo do hospedeiro ganhou considerável interesse nos últimos anos. Atualmente, foram identificados vários potenciais candidatos bacterianos, cujos mecanismos de ação e efeitos benéficos têm sido investigados. Neste contexto, alguns estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que a utilização de probióticos pode ser uma promissora alternativa terapêutica/preventiva para a SM e para a DP. Entretanto, as evidências existentes ainda são preliminares e necessitam de mais comprovações. Novos estudos são fundamentais para melhor elucidar o papel das bactérias benéficas na cavidade bucal e na patogênese da SM, identificar novas espécies de bactérias com potencial terapêutico, estabelecer tempos e novos veículos de administração e determinar a real significância clínica desta terapia. Este é o primeiro estudo que avaliou o impacto de *B. lactis* HN019 na associação SM-DP.

---

## 3. Proposição

### 3.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar os potenciais efeitos do agente probiótico *B. lactis* HN019 no desenvolvimento e progressão da periodontite experimental associada ou não às comorbidades da SM em ratos.

### 3.2. Objetivos Específicos

Avaliar em ratos, com ou sem periodontite experimental, portadores ou não de síndrome metabólica, tratados ou não com *B. lactis* HN019:

- ✓ Perda óssea alveolar por meio de análises com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT);
- ✓ Condições histopatológicas dos tecidos periodontais;
- ✓ Parâmetros metabólicos: Níveis séricos de glicose, colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos, ácidos graxos e insulina; Teste de tolerância à Glicose (TTG); Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR);
- ✓ Parâmetros antropométricos: Peso, IMC e circunferência abdominal;
- ✓ Expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, RANKL e RANTES) e anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$  e OPG) nos tecidos periodontais por meio de imunoenaios enzimáticos (Luminex<sup>TM</sup> xMAP<sup>®</sup> e ELISA);
- ✓ Atividade das enzimas Catalase (CAT) (The OxiSelect<sup>TM</sup> Catalase Activity Assay Kit - Cell Biolabs, San Diego, CA, EUA) e Mieloperoxidase (MPO) (OxiSelect<sup>TM</sup> Myeloperoxidase Chlorination Activity Assay Kit- Cell Biolabs, San Diego, CA, EUA) no soro;
- ✓ Perfil microbiológico intestinal por meio de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) de amostras de fezes.

---

## 4. Materiais e Métodos

#### 4.1. Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo de tamanho amostral foi realizado pelo programa Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi calculado considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão entre os grupos 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%, as mudanças na média do volume ósseo como variável primária e  $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$ . O cálculo da amostra por grupo foi baseado na formula:  $n \geq \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$ . Considerando ainda o longo período experimental, possibilidades de óbitos e variabilidade de parâmetros metabólicos com o modelo de indução de SM, um total de 12 animais por grupo experimental foi utilizado.

#### 4.2. Apreciação ética

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

#### 4.3. Modelo experimental

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

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

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

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

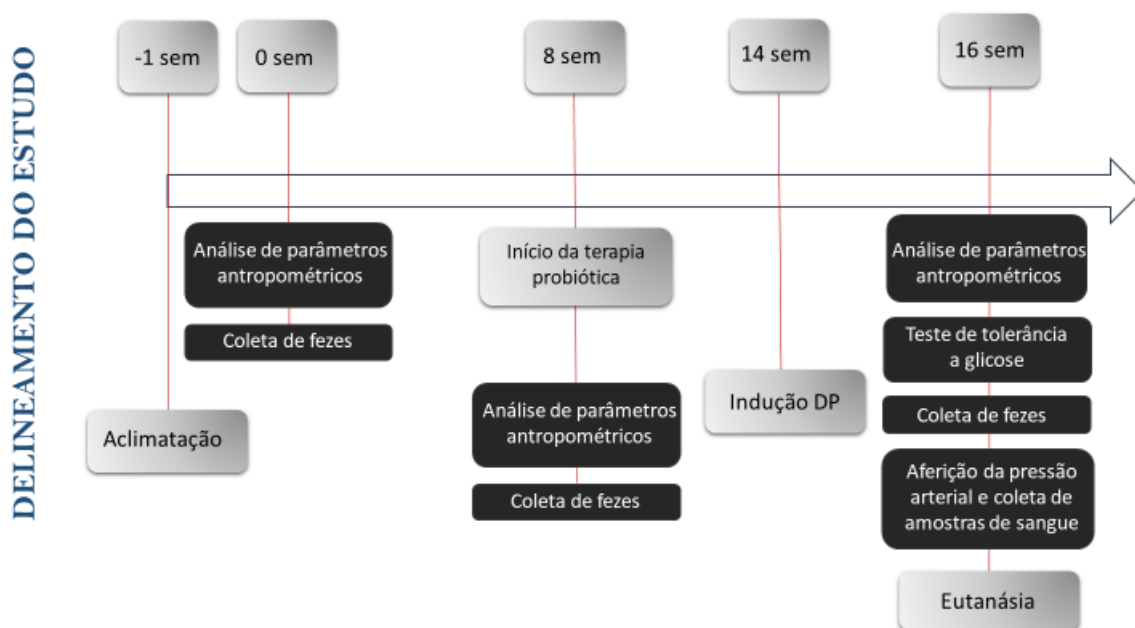


Figura 1: Delineamento do estudo experimental

#### 4.4. Indução da síndrome metabólica com dieta hipercalórica rica em gordura

Os animais receberam dieta hipercalórica rica em gordura (Tabela 1) durante 8 semanas para indução da SM (CHENG; TON; TAN; ABDUL KADIR, 2017; REEVES, 1997; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), preparada especialmente para pesquisa (Rhoister Indústria e Comércio - Araçoiaba da Serra, SP, Brasil), antes do início da terapia probiótica. A dieta era renovada diariamente, fornecida *ad libitum*, e foi mantida até o final do experimento, totalizando 16 semanas de alimentação hipercalórica. Todos os animais foram acompanhados diariamente. Só foram incluídos no estudo os animais que, ao final do experimento, apresentaram alterações em pelo menos 3 parâmetros metabólicos e antropométricos: peso, perfil lipídico, IMC, pressão arterial, glicemia, insulina, HOMA-IR e/ou teste de tolerância à glicose, compatíveis com a SM conforme descrito em estudos anteriores (CHENG; TON; TAN; ABDUL KADIR, 2017; MARQUES; MEIRELES; NORBERTO; LEITE *et al.*, 2016). Os animais não submetidos à indução da SM receberam ração considerada padrão para alimentação de ratos, também oferecida *ad libitum* durante 16 semanas (Tabela 1).

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

Macronutrientes	Dieta padrão	Dieta hipercalórica rica em gordura
Proteína (% kcal)	20	18,4
Carboidrato (%kcal)	70	21,3
Gordura (%kcal)	10	60,3
Conteúdo energético (kcal/g)	3,9	5,1

#### 4.5. Indução da doença periodontal experimental com ligadura

Para a colocação da ligadura nos grupos SMDP, DP, SMDPP e DPP, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal, com solução de Cloridrato de Xilazina a 2% (2mg/mL) (Rompum® - Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Ketamina a 10% (10mg/mL) (Dopalen® - Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil) nas respectivas doses de 10mg/Kg (Xilazina) e 80mg/Kg (Ketamina).

Após a anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos mesmos, facilitando o acesso aos dentes posteriores da mandíbula. Com o auxílio de porta agulha tipo Castroviejo (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil) e sonda exploradora odontopediátrica (Golgran, São Paulo, SP, Brasil), foi colocado fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdo e direito de cada animal. Nos animais dos grupos DP/PROB e SM/DP/PROB, a colocação de ligaduras ocorreu 6 semanas após o início da terapia probiótica.

A presença das ligaduras nos animais foi verificada periodicamente e não houve necessidade de substituição para nenhum animal.



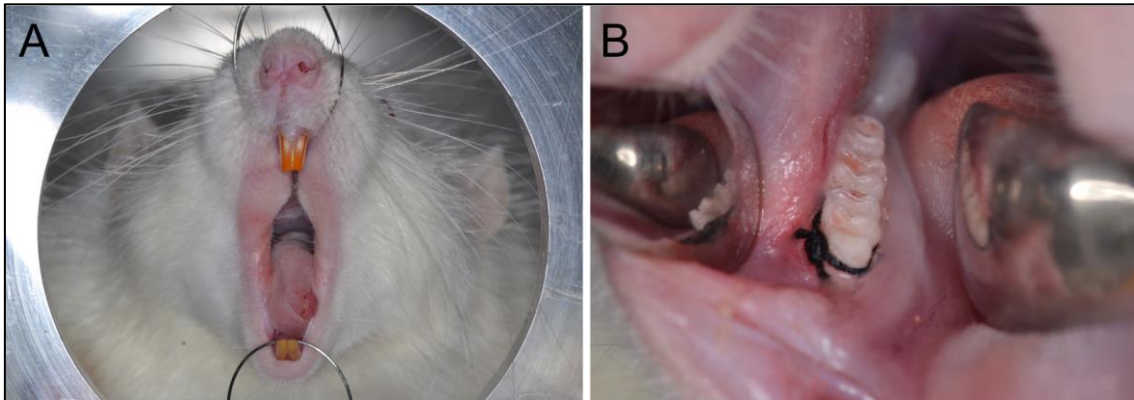


Figura 2: A) Animal posicionado para a colocação da ligadura; B) Fio de seda em posição para indução da doença periodontal no primeiro molar inferior.

#### 4.6. Administração do agente probiótico

*B. lactis* HN019 (HOWARUTM Bifido, E. I. Dupont® de Nemours and Company, Wilmington, DE, EUA) foi cultivado em meio MRS Agar (Man, Rogosa and Sharpe - D<sup>TM</sup>Lactobacilli MRS Broth, Sparks, MD, EUA) por 48 horas a 37°C sob condições de anaerobiose (GASPAK<sup>TM</sup> EZ Anaerobe Container System with indicator, Sparks, MD, EUA). A seguir, com auxílio de alça esterilizada, o inóculo bacteriano foi transferido para tubos de centrifugação tipo Falcon contendo pérolas de vidro e água destilada esterilizada. Após homogeneização em agitador de tubos (Phoenix AP 65, Araraquara, SP, Brasil), a suspensão foi submetida à diluição decimal seriada até 10<sup>10</sup>, em solução salina tamponada fosfatada (PBS), com pH 7,0. Alíquotas de 100 µL foram depositadas em placas de Petri contendo MRS Agar e semeadas com auxílio de bastão de vidro esterilizado. Após a semeadura, as placas foram incubadas em anaerobiose, durante 48 horas a 37°C. A padronização quantitativa dos inóculos foi obtida pela determinação da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Micronal - AJX -1000, São Paulo, SP, Brasil), bem como por contagem, em duplicata, do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

Nos grupos SM-PROB, S-PROB, SM-DP-PROB e S-DP-PROB, o probiótico *B. lactis* HN019 foi adicionado diariamente na água dos animais na proporção de 1 x 10<sup>10</sup> UFC/mL. Todos os animais ingeriram a mesma quantidade de probiótico durante todo o período experimental. O consumo de probióticos não ultrapassou 8 semanas.



Figura 3: Placas de Petri contendo MRS Agar e semeadas com *B. lactis* HN019 após incubação em anaerobiose durante 48 horas a 37°C.

#### 4.7. Eutanásia e coleta de materiais para análise

Todos os animais foram submetidos à eutanásia 16 semanas após o início dos experimentos. Após avaliação de parâmetros antropométricos, aferição de pressão arterial sob sedação inalatória com Isoflurano e punção cardíaca sob anestesia geral com solução de Cloridrato de Xilazina a 2% (2mg/mL) (Rompum® - Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Ketamina a 10% (10mg/mL) (Dopalen®- Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil) nas respectivas doses de 10mg/Kg (Xilazina) e 80mg/Kg (Ketamina), para coleta de amostras de sangue, a eutanásia dos animais foi realizada pela administração de uma dose letal (150 mg/kg) de tiopentato de sódio (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil). As hemi-mandíbulas direitas tiveram seu tecido

gingival removido para realização de imunoenaios enzimáticos (Luminex™ xMAP®). Nestas mesmas hemi-mandíbulas, a perda óssea alveolar foi avaliada por meio de análise microtomográfica. Já as hemi-mandíbulas direitas foram coletadas e processadas para análise histológica.

## **4.8. Parâmetros Antropométricos e Metabólicos**

### **4.8.1. Pesagem, Cálculo de IMC**

Todos os animais foram monitorados e pesados semanalmente para controle do ganho de massa corporal, parâmetro importante para comprovação da obesidade, uma das comorbidades da SM. No baseline, após 8 semanas e antes da eutanásia, foram realizadas medidas de circunferência abdominal com auxílio de fita métrica e cálculo do índice de massa corporal (IMC) por meio da fórmula:  $IMC = \text{Peso(kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$ . Os animais estavam sob efeito de anestesia no momento das aferições e a altura considerada teve como referência a distância entre o nariz e a região anal dos ratos. Para medida fiel da circunferência abdominal, foram realizadas 3 medições na região abdominal e a maior delas foi adotada. Todas as medidas foram realizadas por um mesmo operador calibrado com os animais em decúbito lateral.

### **4.8.2. Perfil lipídico**

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

### **4.8.3. Glicemia em jejum**

No momento da eutanásia, amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca para análise dos níveis séricos de glicemia de todos os animais, que estavam sob jejum de 12

horas, e enviadas ao Laboratório de Patologia Clínica, Microbiologia e Hemocentro Veterinário (Hemolabvet – Ribeirão Preto, SP, Brasil) que realizou a análise utilizando o kit GLICOSE Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A. - Lagoa Santa, MG, Brasil). Todas as análises foram realizadas após os animais serem submetidos a 12 horas de jejum (ANTUNES; ELKFURY; JORNADA; FOLETTO *et al.*, 2016).

#### **4.8.4. Teste de Tolerância à Glicose**

Para comprovação da indução da SM, foi realizado também na 16ª semana, o teste de tolerância à glicose, conforme já descrito na literatura (ANTUNES; ELKFURY; JORNADA; FOLETTO *et al.*, 2016). Resumidamente, após 12 horas de jejum, os animais foram submetidos à ingestão de solução de glucose com concentração de 2g/kg via gavagem e os níveis glicêmicos foram medidos a cada 30 minutos durante 2 horas com auxílio de glicosímetro de precisão Accu-Check Active (Roche Diabetes Care – São Paulo, SP, Brasil).

#### **4.8.5. Insulina**

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

#### **4.8.6. Resistência à Insulina**

A resistência à insulina foi estimada com a avaliação do modelo HOMA-IR, de acordo com a fórmula [glicose no plasma em jejum (mg/dL) × insulina no plasma em jejum (μU/mL)]/405 (AGIL; ROSADO; RUIZ; FIGUEROA *et al.*, 2012).

#### **4.9. Aferição da Pressão Arterial Média**

A aferição da pressão arterial média por método invasivo foi realizada no momento da eutanásia. Para tal avaliação, os animais foram mantidos sob anestesia inalatória com isoflurano (mantidos a uma taxa de 5% de anestésico e 2,5% de oxigênio) e a artéria femoral foi canulada

(3 cm de tubo PE-10 conectado a 14 cm de tubo PE-50). Ainda com o animal anestesiado, a cânula foi conectada a um transdutor de pressão e a pressão arterial média e a pressão arterial sistólica foram registradas por cerca de 5 minutos por um sistema de aquisição de dados (MP150CE; Biopac Systems Inc., CA, EUA) conectado a um computador (Acknowledge 3.2, para o Windows).

#### 4.10. Análise de Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado por meio da quantificação da atividade de catalase no soro (The OxiSelect™ Catalase Activity Assay Kit - Cell Biolabs, San Diego, CA, EUA) e quantificação da atividade de cloração de mieloperoxidase no soro (OxiSelect™ Myeloperoxidase Chlorination Activity Assay Kit- Cell Biolabs, San Diego, CA, EUA). As amostras foram coletadas via punção cardíaca no momento da eutanásia.

#### 4.11. Perfil microbiológico intestinal - Coleta de fezes e qRT-PCR

A coleta de fezes foi realizada para todos os animais no *baseline*, 8 e 16 semanas após o início do experimento. Para que as fezes fossem coletadas frescas, os animais foram colocados em caixas individualmente por poucos minutos, sob supervisão, até que fosse possível realizar a coleta das fezes defecadas naquele instante. Todas as amostras foram coletadas com auxílio de pinça estéril, colocadas em tubo estéril e imediatamente armazenadas em freezer -80°C.

O DNA genômico foi extraído e purificado a partir de amostras de fezes usando kit específico para esse fim (DNeasy Power Soil® Kit – Qiagen, Hiden, Alemanha) conforme as instruções do fabricante. A pureza e a quantificação do DNA foram avaliadas com um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e por meio de quantificação fluorimétrica (Qubit Fluorometric Quantification - Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), considerando as razões de A 260/280 e A 260/230 dadas pelo espectro de absorvância máxima em 260nm. Foram admitidas apenas amostras com A 260/280 entre 1,8 a 2,0 (DNA). A partir dos dados obtidos na quantificação, as amostras foram diluídas com água *nuclease-free* (Invitrogen UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water - Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) até serem padronizadas na concentração de 10ng/μL.

Em seguida, a análise por qRT-PCR foi realizada em microplacas de 96 poços (MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate - Thermo Scientific, Wilmington, DE,

EUA) e com o termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Misturas de reações de qRT-PCR “master mix” (total de 10 µL) foram utilizadas contendo a proporção de 5 µL de Faststart SYBR Green (Roche Diagnostics Ltd), 0,25 µl de cada primer específico - Forward (F) e Reverse (R) (Exxtend Solução em Oligos, Paulínia, São Paulo, Brasil) - para 4 µL de água *nuclease-free* e 0,5 µL de DNA. As sequências iniciadoras para *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Lactobacilos* e *Bifidobacterium*, assim como o protocolo de termociclagem e padronização da curva foram executados conforme as referências citadas na Tabela 3.

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

Filo ou Gênero Bacteriano	Sequência Utilizada	Referência
<i>Firmicutes</i>	F: GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA R: AGCTGACGACAACCATGCAC	(GUO; XIA; TANG; ZHOU <i>et al.</i> , 2008)
<i>Bacteroidetes</i>	F: GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT R: AGCTGACGACAACCATGCAG	(GUO; XIA; TANG; ZHOU <i>et al.</i> , 2008)
<i>Lactobacilos</i>	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG	(RINTTILA; KASSINEN; MALINEN; KROGIUS <i>et al.</i> , 2004)
<i>Bifidobacterium</i>	F: TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG R: CCACATCCAGC(A/G)TCCAC	(RINTTILA; KASSINEN; MALINEN; KROGIUS <i>et al.</i> , 2004)

#### 4.12. Análise microtomográfica (Micro-CT)

Espécimes não-desmineralizados (hemimandíbulas esquerdas) foram escaneados por um sistema de Micro-CT de feixe cônico (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raios X foi operado a um potencial de aceleração de 60 kV com uma corrente de feixe de 165 µA e um tempo de exposição de 490 ms por projeção. As imagens foram produzidas com um tamanho de voxel de 6x6x6 µm.

Usando um software apropriado (Data Viewer®, version 1.5.0, Bruker, Kontich, Bélgica), os modelos tridimensionais gerados foram rotacionados para uma posição padrão de análise, de acordo com os seguintes critérios: (1) no plano transaxial, o primeiro molar inferior (M1) tinha o seu eixo posicionado verticalmente, (2) no plano sagital, a superfície oclusal do M1 foi posicionada horizontalmente e (3) no plano coronal, o osso mandibular foi orientado verticalmente, com a raiz mesial do M1 na posição mais superior da imagem. Medidas lineares do nível ósseo alveolar (NOA) foram realizadas em quatro sítios: vestibular, lingual, interproximal e furca. Para as faces vestibular e lingual, na imagem transaxial passando através da raiz distal do M1, as distâncias lineares entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) vestibular/lingual foram medidas. Para a região de furca, na imagem sagital passando por ambas as raízes mesial e distal do M1, o NOA foi avaliado por meio da mensuração da distância entre o teto da furca e crista óssea alveolar (COA) interradicular. Para a região interproximal, as imagens do plano coronal foram analisadas usando um software específico (CT-Analyser®, version 1.13.5.1+, Bruker, Kontich, Bélgica). A distância entre a última imagem mostrando a COA, entre M1 e segundo molar inferior, e a primeira imagem mostrando a JCE do M1, foi mensurada. As medidas lineares obtidas de cada animal foram somadas para expressar o valor do NOA.

Para as análises volumétricas, um volume de interesse (seção prismática) foi delineado a partir dos ápices de todas as raízes do M1 até o teto da furca do M1, tocando as superfícies das raízes, em todas as imagens do plano coronal, com o mesmo software utilizado para a análise da região interproximal. Os seguintes parâmetros foram avaliados: volume ósseo (VO) e porosidade óssea (PO). Todas as análises de Micro-CT foram realizadas por um operador calibrado que desconhecia os grupos experimentais e tratamentos realizados. Para calibração do examinador, um terço da amostra foi avaliada em dois períodos de tempo com um intervalo de 48 horas. O coeficiente de correlação intraclassa (CCI) foi utilizado para determinar a reprodutibilidade do examinador nas duas avaliações realizadas. Valores de CCI maiores que 90% foram considerados para assegurar a calibração do examinador.

#### **4.13. Análise imunoenzimática**

Com bisturi estéril, a gengiva foi removida da região vestibular e lingual dos primeiros molares inferiores da hemimandíbula esquerda de cada animal. Os tecidos gengivais coletados foram lavados em PBS associado a um coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich). Em seguida, os tecidos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e macerados

manualmente com gral e pistilo. Os tecidos macerados foram novamente colocados em solução PBS + inibidores de proteases e homogeneizados mecanicamente (Ultra-Stirrer ULTRA 80-II, Eikonol do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi coletado e armazenado a -80°C. Foi determinado o valor de proteína total de cada amostra por meio de imunoenaios enzimáticos convencionais (ELISA), utilizando-se kits comercialmente disponíveis (DCTM Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A leitura colorimétrica foi realizada através de um espectrofotômetro a 650nm (TP-Reader, ThermoPlate®, Brasil) e os valores foram expressos em mg/dL. Os valores de proteína total foram convertidos em pg/mL.

Os níveis das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-10, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , RANTES foram determinados por meio da tecnologia Luminex™ xMAP®. As amostras coletadas foram analisadas usando-se kits disponíveis comercialmente (TGFBMAG-04 K para TGF- $\beta$  e RECYTMAG-65K para as demais citocinas – Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em um analisador Luminex 100/200 (Luminex® 100/200™ System, Luminex Corporation, Austin, TX, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para leitura no sistema Luminex, o sobrenadante resultante do processamento e centrifugação das biópsias gengivais foi incubado em microplacas de titulação de 96 poços com microesferas de poliestireno associadas a fluoróforos e conjugadas a anticorpos de captura específicos para cada citocina alvo. Após a ligação do analito (amostra) aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final foi feita por meio de um marcador fluorescente (Streptavidina-Ficoeritrina) ligado ao anticorpo de detecção. As concentrações foram estimadas em pg/ $\mu$ L a partir de uma curva padrão utilizando-se o software xPONENT® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). Os níveis finais das citocinas analisadas foram obtidos pela razão entre os valores inicialmente obtidos com sistema Luminex® 100/200™ e os valores de proteína total convertidos em pg/mL.

Os níveis de OPG e RANKL, foram analisados por meio de ELISA, utilizando-se kit comercialmente disponíveis (MBS774950, MBS2500776 e MBS775260 respectivamente - MyBioSource Inc., San Diego, CA, USA), conforme instruções do fabricante. A leitura colorimétrica foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro a 450nm (PowerWave XS2, Biotek, Winooski, VT, EUA). Os níveis finais das citocinas analisadas foram obtidos pela razão entre estes valores obtidos e aqueles referentes ao conteúdo de proteína total convertidos em pg/g.



#### **4.14. Análise Histológica**

As hemi-mandíbulas direitas 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  $\mu\text{m}$ , no plano méso-distal. Dois cortes histológicos de cada espécime, representando a porção vestibulo-lingual central da hemi-mandíbula, foram corados utilizando a técnica de 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, considerando: conteúdo do infiltrado inflamatório periodontal, extensão da inflamação, padrão do tecido conjuntivo e perfil do osso alveolar presente.

#### **4.15. 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, histológicos, microbiológicos, imunoenzimáticos, antropométricos, biomoleculares assim como valores obtidos de aferição da pressão arterial analisados foram definidos como variáveis secundárias.

#### **4.16. Análise estatística dos dados obtidos**

Foi verificada a normalidade e homocedasticidade dos dados obtidos (Teste Shapiro-Wilk). As comparações inter e intragrupos nos diferentes intervalos de tempo foram realizadas por meio de testes paramétricos ou não-paramétricos adequados. Para todas as análises estatísticas foi utilizado um nível de significância de 5%. Todos os cálculos foram realizados pelo software Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California)

---

## 5. Resultados

## 5.1. Pesagem

Ao longo dos diferentes períodos experimentais, foi observado aumento significativo de peso nos animais de todos os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

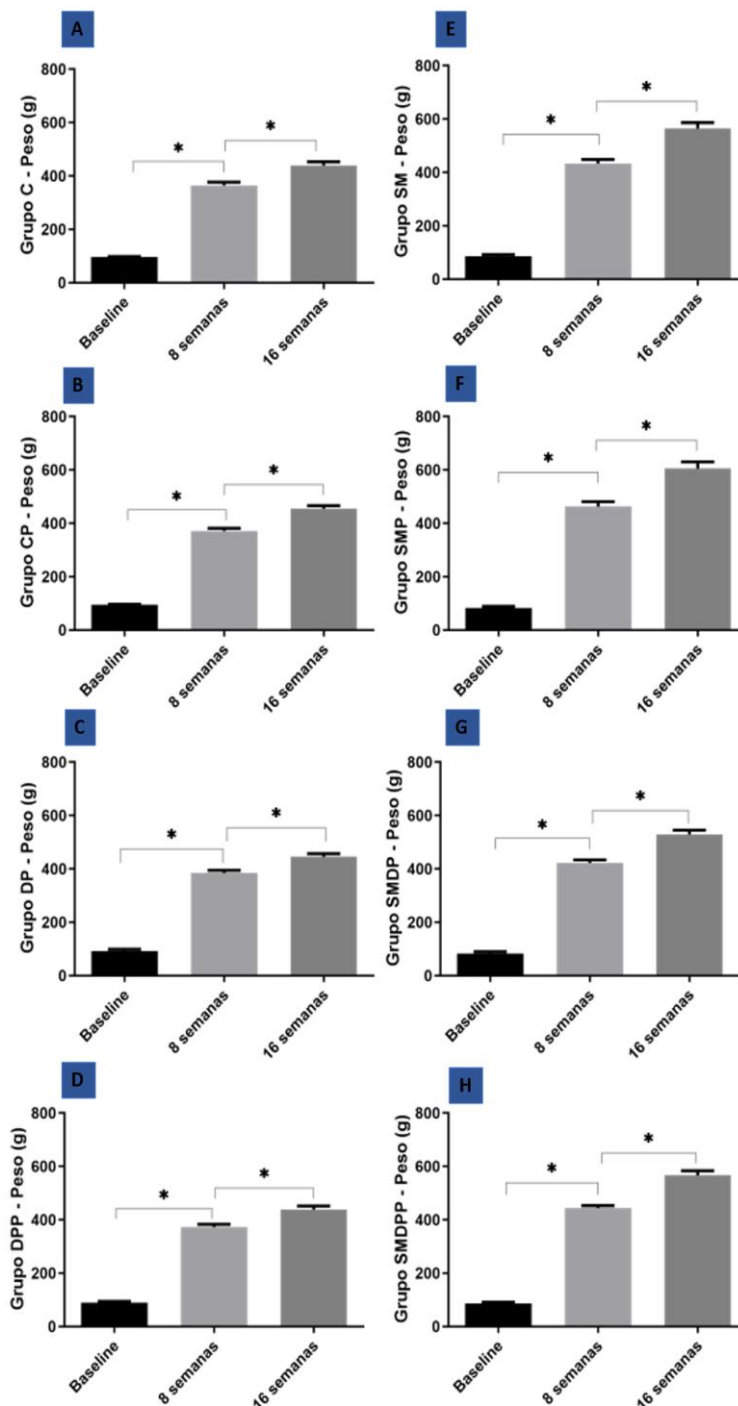


Figura 4 - Médias e desvios-padrão do ganho de peso para os grupos: A) C; B) CP; C) DP; D) DPP; E) SM; F) SMP; G) SMDP e H) SMDPP com comparações entre os tempos experimentais. \*diferença significativa intragrupos (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

Conforme pode ser visto na Figura 5, as comparações intergrupos para os ganhos de peso entre tempos experimentais (valores de delta), demonstram valores significativamente maiores para os grupos com SM (SM, SMP, SMDP e SMDPP) quando comparados aos seus respectivos controles (C, CP, DP e DPP) ( $p < 0,05$ ).

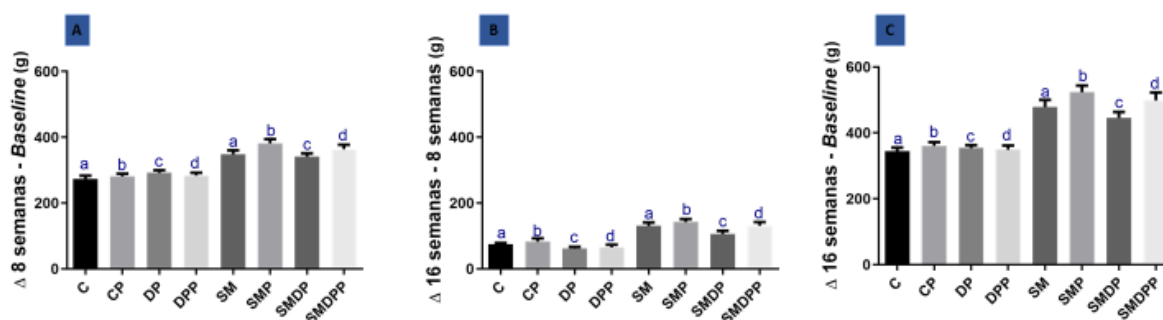


Figura 5: Médias e desvios-padrão dos valores de delta de ganho de peso para os grupos experimentais: A) Delta entre a semana 8 e baseline; B) Delta entre a semana 16 e a semana 8; C) Delta entre a semana 16 e baseline. Letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

## 5.2. Circunferência abdominal

Quando comparados ao baseline, todos os grupos experimentais apresentaram aumento da circunferência abdominal (Figura 6).

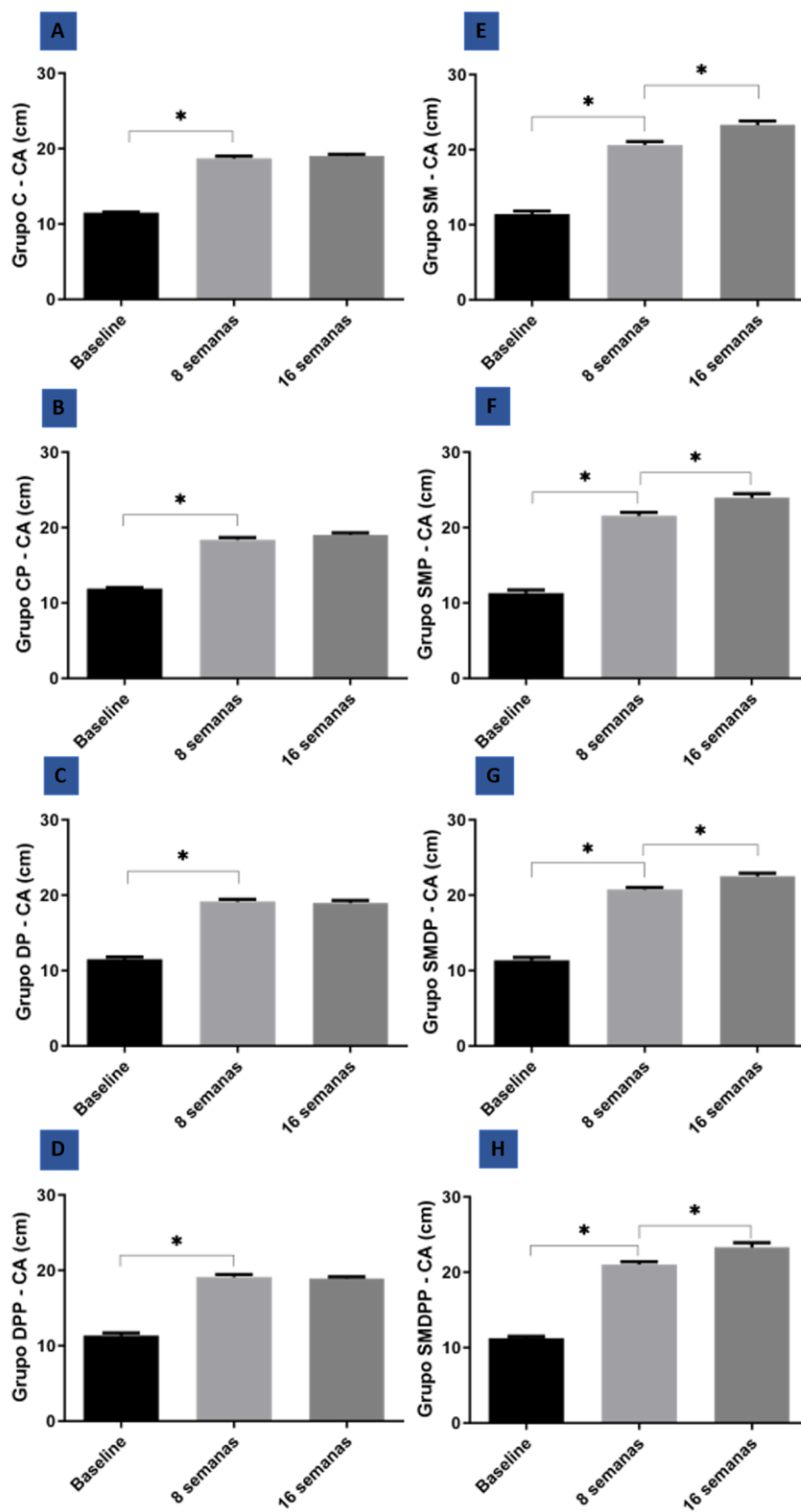


Figura 6: Médias e desvios-padrão da circunferência abdominal para os grupos: A) C; B) CP; C) DP; D) DPP; E) SM; F) SMP; G) SMDP e H) SMDPP com comparações entre os tempos experimentais. CA = circunferência abdominal \*diferença significativa intragrupos (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

Os aumentos obtidos (Figura 7) na circunferência abdominal dos animais com SM (SM, SMP, SMDP e SMDPP) foram significativamente maiores que aqueles dos animais sem SM (C, CP, DP e DPP, respectivamente) ( $p < 0,05$ ).

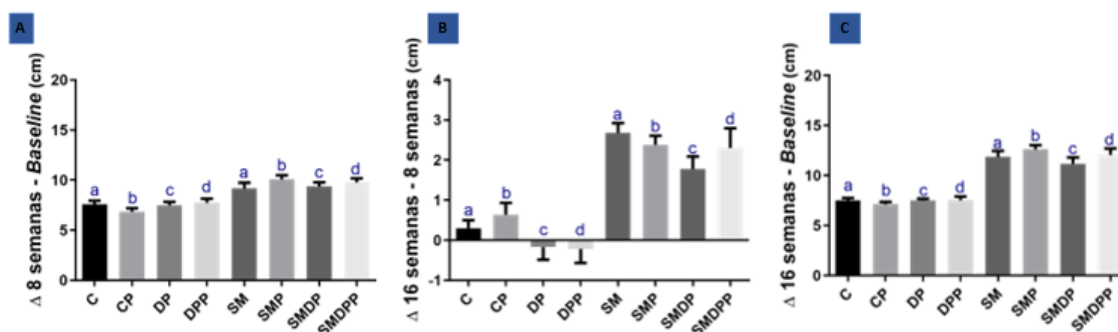


Figura 7: Médias e desvios-padrão dos valores de delta de circunferência abdominal para os grupos experimentais: A) Delta entre a semana 8 e baseline; B) Delta entre a semana 16 e a semana 8; C) Delta entre a semana 16 e baseline. Letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

### 5.3. Índice de massa corporal (IMC)

Quando comparados ao baseline, todos os grupos experimentais apresentaram aumento do IMC (Figura 8). Os aumentos obtidos nos animais com SM foram significativamente maiores que aqueles dos animais sem SM ( $p < 0,05$ ) (Figura 9).

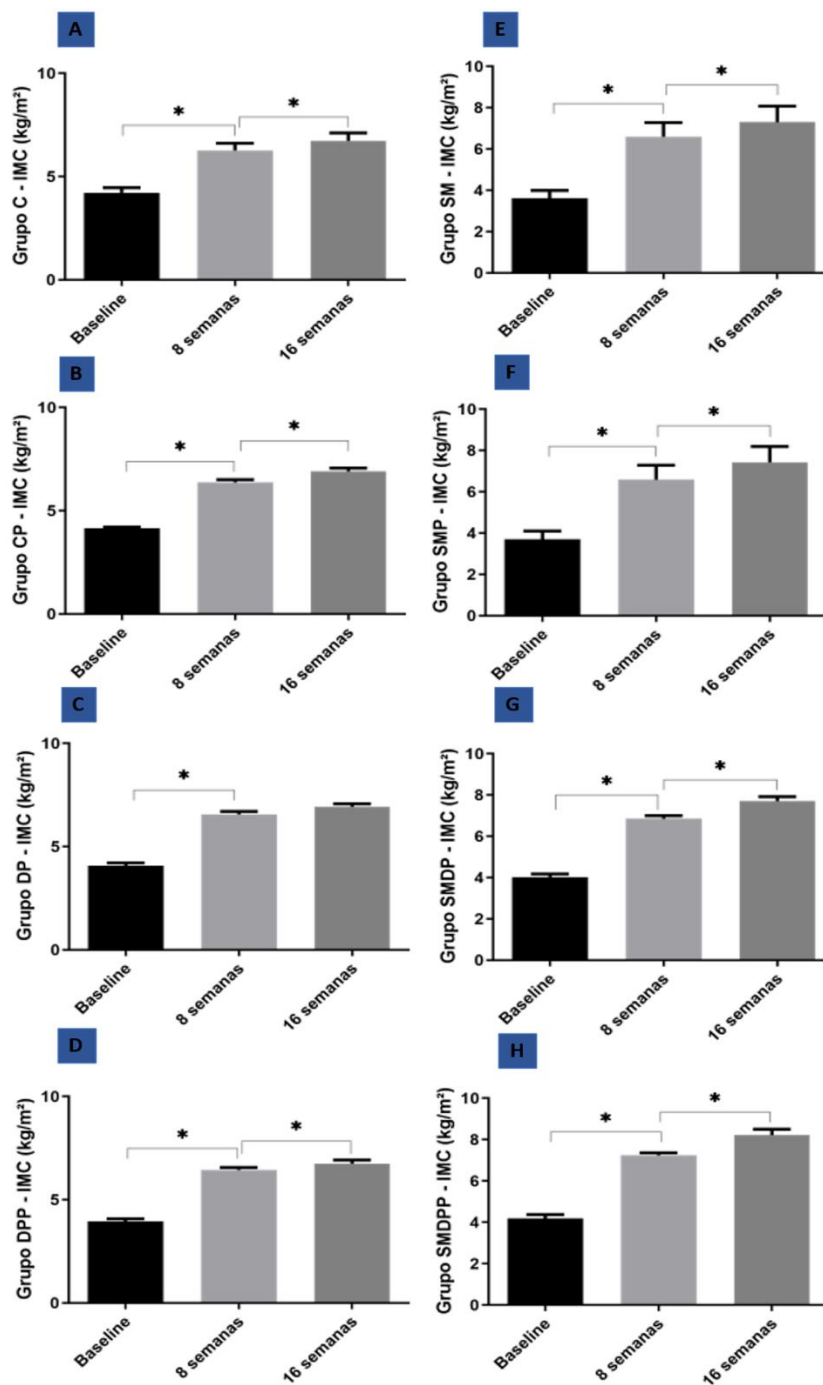


Figura 8: Médias e desvios-padrão do ganho de peso para os grupos: A) C; B) CP; C) DP; D) DPP; E) SM; F) SMP; G) SMDP e H) SMDPP com comparações entre os tempos experimentais. IMC= índice de massa corporal. \* diferença significativa intragrupos (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

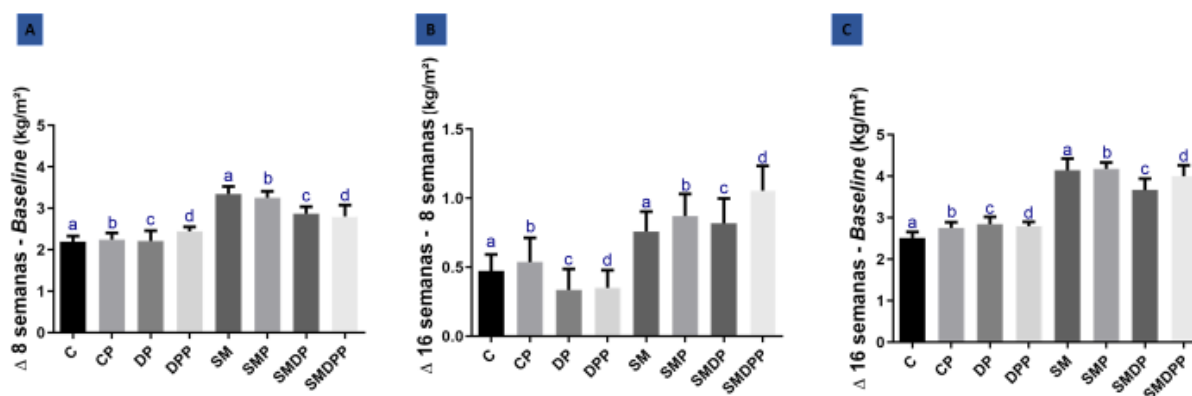


Figura 9: Médias e desvios-padrão do delta do Índice de Massa Corporal para os grupos experimentais. A) Delta entre a semana 8 e baseline; B) Delta entre a semana 16 e a semana 8; C) Delta entre a semana 16 e o baseline. Letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4. Aferição de Pressão Arterial

Os animais dos grupos SM, SMP e SMDPP apresentaram valores de pressão sistólica significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que aqueles dos grupos C, CP e DPP, respectivamente (Figura 10). O Grupo DP também apresentou maiores valores de pressão sistólica quando comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ). Para pressão média, os grupos SM e SMP apresentaram valores significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que aqueles dos grupos C e CP, respectivamente.



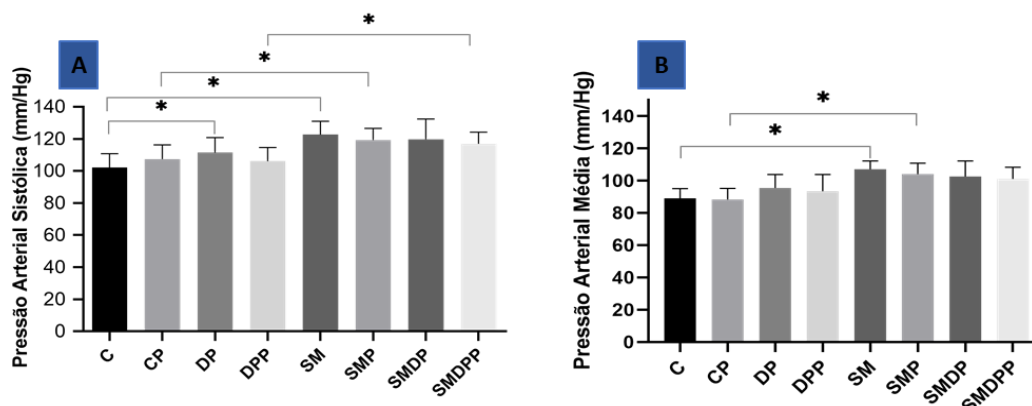


Figura 10: Médias e desvios-padrão da pressão arterial para os grupos experimentais com comparações entres os grupos. A) Pressão arterial sistólica; B) Pressão arterial média. \*diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

### 5.5. Perfil lipídico

Em relação aos níveis séricos de colesterol total, o grupo SM apresentou valores elevados quando comparados ao grupo C ( $p < 0,05$ ). O uso do probiótico promoveu redução dos níveis de colesterol total no grupo SMDPP quando comparado ao grupo SMDP ( $p < 0,05$ ) (Figura11 - A).

O grupo SM apresentou a maior taxa de LDL quando comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ). Os animais portadores de SM experimental que receberam administração de probiótico (grupos SMP e SMDPP) apresentaram redução de LDL quando comparados aos animais do grupo SM ( $p < 0,05$ ) (Figura 11 - B).

Para as taxas de HDL, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 11 - C).

Os animais dos grupos SM, SMDP e SMDPP apresentaram aumento no nível sérico de triglicerídeos quando comparados aos grupos C, DP e DPP, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Para o grupo dos animais com SM que receberam terapia probiótica (SMP), não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de triglicerídeos quando comparado ao seu controle (CP). Além disso, os animais com SM, portadores ou não de DP, que receberam terapia

probiótica (SMP e SMDPP) apresentaram valores menores de triglicerídeos quando comparados aos grupos com as mesmas condições que não receberam probiótico (SM e SMDP) ( $p < 0,05$ ) (Figura 11 - D).

Na Figura 11 - E é possível observar que os grupos SM e SMDPP apresentaram maiores níveis séricos de ácidos graxos quando comparados aos grupos C e DPP ( $p < 0,05$ ). O grupo SMDP apresentou valores de ácidos graxos maiores quando comparados àqueles do grupo SM ( $p < 0,05$ ).

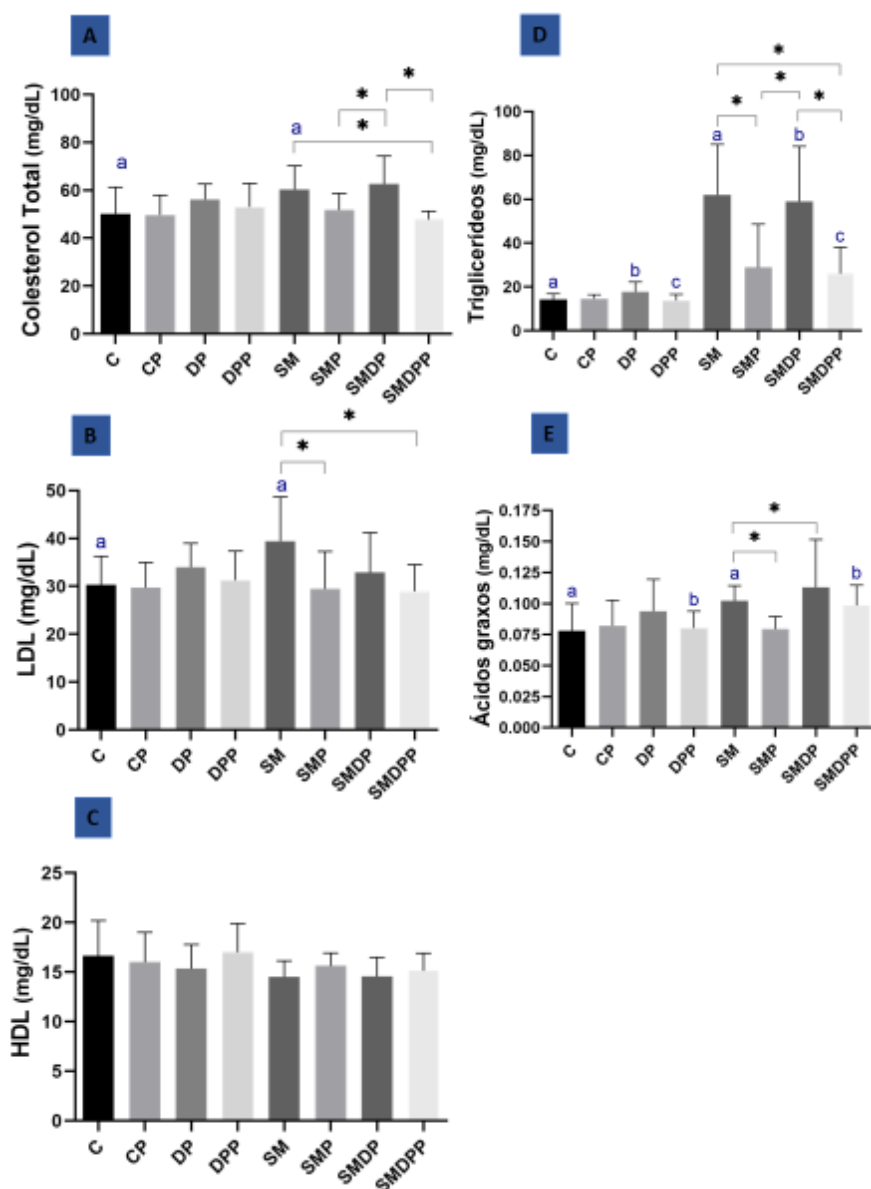


Figura 11: Médias e desvios-padrão para o perfil lipídico nos grupos experimentais com comparações entre os grupos. A) Colesterol total; B) LDL; C) HDL; D) Triglicerídeos e E) Ácidos graxos. O símbolo \* e letras iguais representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

## 5.6. Glicemia

Os grupos C, CP, DP e DPP apresentaram taxas glicêmicas na 16ª semana estatisticamente inferiores àsquelas dos grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP, respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 12).

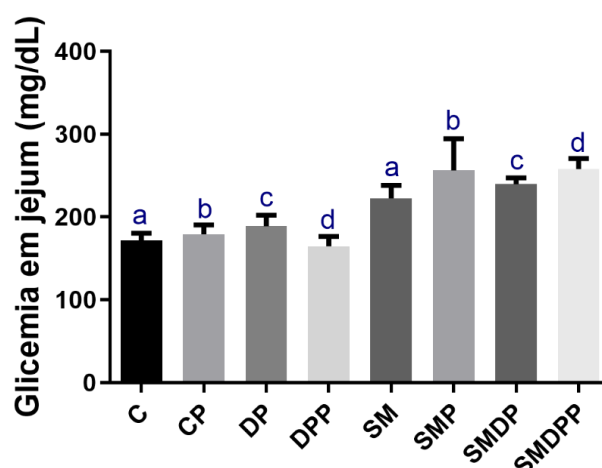


Figura 12: Médias e desvios-padrão de glicemia em jejum para os grupos experimentais na 16ª semana. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

## 5.7. Teste de Tolerância à Glicose (OGTT)

Os valores de glicemia obtidos, distribuídos ao longo do tempo, no OGTT estão representados na Figura 13 - A para todos os grupos. A área sobre a curva (AUC) do gráfico obtida para cada grupo está representada na Figura 13 - B. Os animais dos grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP apresentaram maiores valores de AUC quando comparados aos seus respectivos controles (C, CP, DP e DPP), com diferenças significativas entre eles ( $p < 0,05$ ).

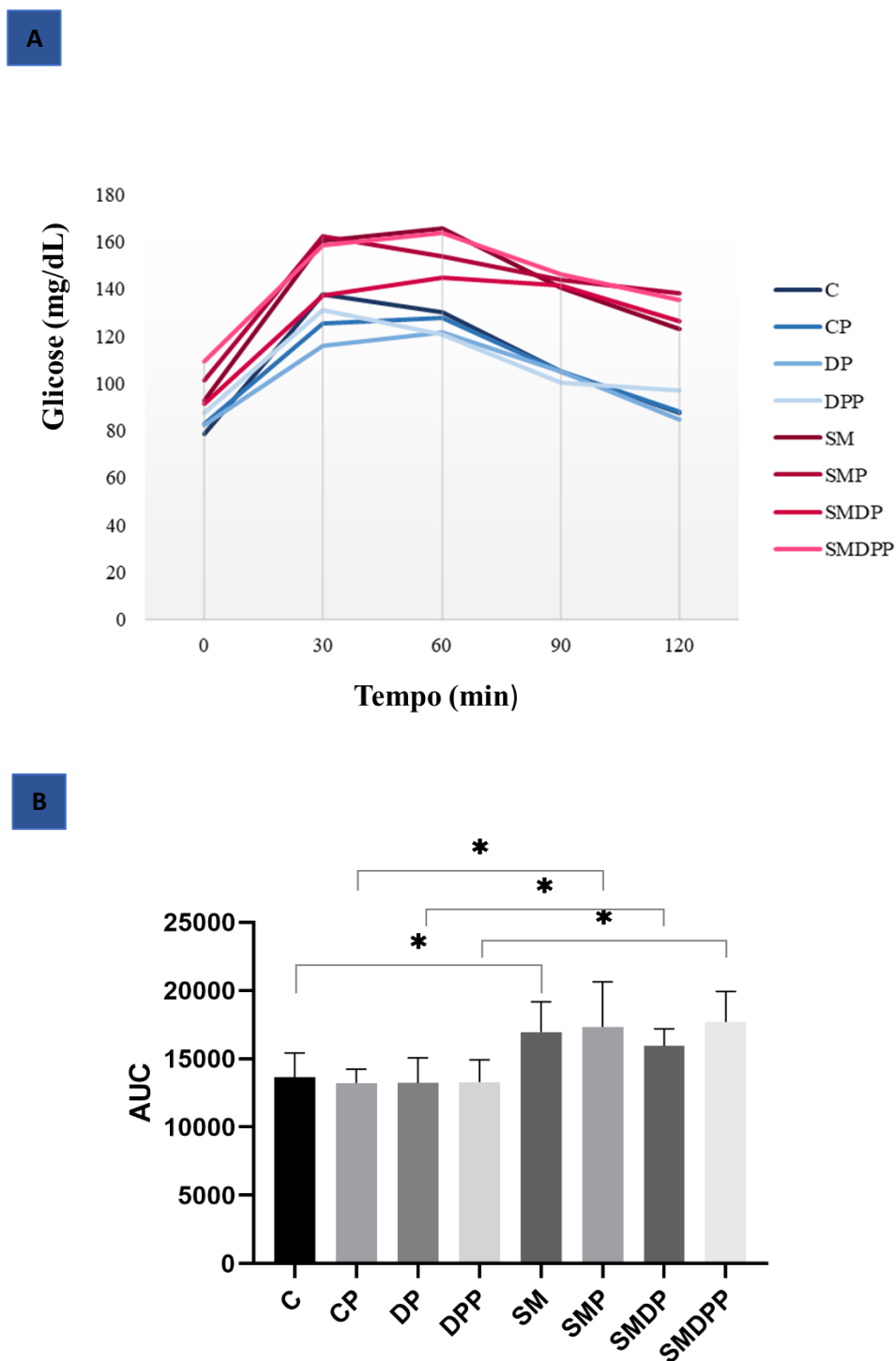


Figura 13: A) Médias dos níveis glicêmicos em mg/dL dos diferentes grupos distribuídos ao longo do tempo em minutos; B) Médias e desvios-padrão da AUC para os grupos experimentais, com comparações entre os grupos.

\*diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

## 5.8. Insulina

Para os níveis de insulina, foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas quando o grupo DPP foi comparado aos grupos SMDP e C ( $p < 0,05$ ) (Figura 14).

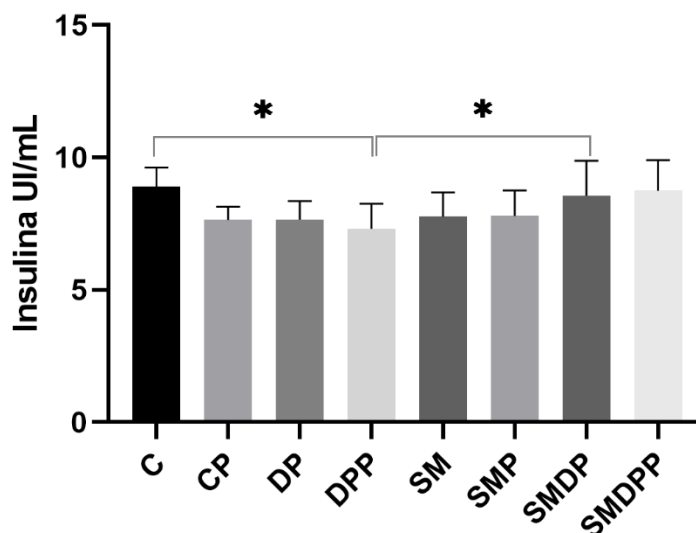


Figura 14: Médias e desvios-padrão de insulina para os grupos experimentais na 16ª semana. \* representa diferença estatística entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

## 5.9. Resistência à Insulina (HOMA-IR)

Os dados do índice HOMA-IR mostram que os grupos C, CP, DP e DPP apresentaram valores estatisticamente inferiores aos grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Observou-se também uma redução ( $p < 0,05$ ) desses valores no grupo DPP quando comparado ao grupo DP (Figura 15).

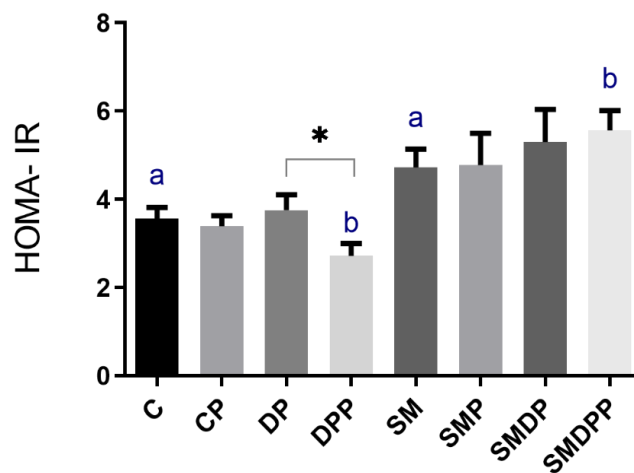


Figura 15: Médias e desvios-padrão para o HORMA-IR com comparações entres os grupos experimentais. O símbolo \* e letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

### 5.10. Resumo dos principais dados encontrados em parâmetros metabólicos

Na Tabela 2 estão distribuídos os principais dados obtidos em parâmetros metabólicos e antropométricos dos grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. Na figura 16 pode ser observado o aspecto de um animal normosistêmico (representativo para os grupos C, CP, DP e DPP) e um animal com SM (representativo para os grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP) na 16ª semana de experimento.

Tabela 3: Principais parâmetros metabólicos e antropométricos analisados

	C	CP	DP	DPP	SM	SMP	SMDP	SMDPP
<b>Peso final</b> <b>(g)</b>	439,9 +/- 40,4	455,1 +/- 34,7	445,9 +/- 34,9	438,0 +/- 48,1	564,1 +/- 73,7 a,b,c,d	605,8 +/- 81,3 a,b,c,d	528,7 +/- 53,6 a,b,c,d	567,2 +/- 51,9 a,b,c,d
<b>IMC</b> <b>(kg/m<sup>2</sup>)</b>	0,67 +/- 0,03 e,f,g,h	0,69 +/- 0,04 e,f,h	0,69 +/- 0,04 e,f,h	0,67 +/- 0,05 e,f,g,h	0,8 +/- 0,08	0,81 +/- 0,05	0,76 +/- 0,06	0,82 +/- 0,07
<b>Circ.</b> <b>Abdominal</b> <b>(cm)</b>	19 +/- 0,8	19 +/-0,8	18,9 +/-1	18,9 +/-0,8	23,3 +/-1,6 a,b,c,d	23,9 +/- 1,8 a a,b,c,d	22,5 +/- 1,2 a,b,c,d	23,3 +/- 2 a,b,c,d
<b>Glicemia</b> <b>(mg/dL)</b>	171,5 +/- 25	179,2 +/- 33,8	188,9 +/- 37,2	164,3 +/- 29,99	222,5 +/- 38 a	256,1 +/- 93,9 a,b,d	239,4 +/- 15,7 a	257,7 +/- 36 a,b,d
<b>HOMA-IR</b>	3,5 +/- 0,6	3,3 +/- 0,7	3,7 +/- 1	2,7 +/- 0,7 c	4,7 +/- 0,9 a	4,7 +/- 1	5,2 +/-1,8	5,5 +/-1,4 d
<b>Triglicerídeos</b> <b>(mg/dL)</b>	14,2 +/- 2,6 e	14,6 +/- 1,8	17,6 +/- 4,6 g	13,7 +/-2,9 h	62 +/-23	28,8 +/-4 e, g	59 +/- 25,1	26 +/- 12 e, g
<b>Colesterol</b> <b>Total</b> <b>(mg/dL)</b>	50,2 +/- 11	49,7 +/- 8,2	56,2 +/- 6,4	53 +/-9,8	60,40 +/- 9,8 a, h	51,8 +/- 6,8	62,6 +/- 11,6 a, h, f	47,7 +/- 3,5
<b>LDL</b> <b>(mg/dL)</b>	30,3 +/- 5,9	29,6 +/- 5,2	33,9 +/- 5	31,2 +/- 6	39,4 +/- 9,1 a	29,4 +/- 7,7 e	32,8 +/- 8,2	28,9 +/- 5,5 e
<b>Ácidos</b> <b>Graxos</b>	0,07 +/- 0,02	0,08 +/-0,02	0,09 +/-0,02	0,08 +/- 0,01	0,10 +/- 0,01 a	0,07 +/- 0,01 e,g	0,11 +/- 0,03	0,09 +/- 0,01 d

Tabela 3: Médias e desvio- padrão dos diferentes grupos para as análises de parâmetros metabólicos e antropométricos realizadas imediatamente antes da eutanásia dos animais.

a- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo C (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).

b- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo CP (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).

- c- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo DP (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).
- d- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo DPP (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).
- e- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo SM (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).
- f- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo SMP (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).
- g- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo SMDP (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).
- h- Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo SMDPP (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).



Figura 16: Animal normotêmico à esquerda (representativo para os grupos C, CP, DP e DPP) e animal com SM à direita (representativo para os grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP) na 16ª semana de experimento

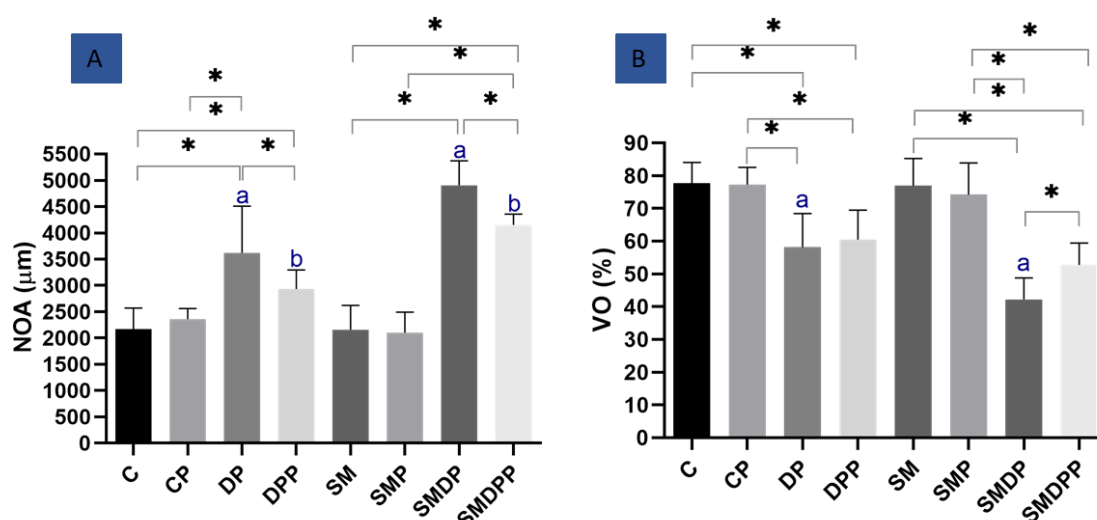
### 5.11. Microtomografia computadorizada (Micro-CT)



A Figura 17 apresenta as médias e desvios-padrão dos valores obtidos na análise microtomográfica. Os grupos DP, SMDP e SMDPP, submetidos à colocação de ligadura ao redor do M1, apresentaram valores significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores de NOA (Figura 17 - A) quando comparados aos seus respectivos controles (grupos C, SM e SMP). O grupo DPP apresentou valor de NOA estatisticamente superior ao grupo C ( $p < 0,05$ ). Os grupos SMDPP e DPP apresentaram menor NOA quando comparados aos grupos SMDP e DP, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Os grupos SMDP e SMDPP apresentaram NOA significativamente ( $p < 0,05$ ) maior que àqueles dos grupos DP e DPP, respectivamente

No parâmetro de VO (Figura 17 - B), os grupos C, SM e SMP apresentaram valores inferiores àqueles dos grupos DP, SMDP e SMDPP) ( $p < 0,05$ ). O grupo SMDP apresentou menor VO quando comparado aos grupos DP e SMDPP ( $p < 0,05$ ).

Na avaliação de PO (Figura 17 - C), notou-se que os grupos sem DP (C, CP, SM e SMP) apresentaram valores inferiores àqueles dos grupos com DP (DP, DPP, SMDP e SMDPP) ( $p < 0,05$ ). Menores valores de porosidade total também foram observados nos grupos DPP e SMDPP quando comparados aos grupos DP e SMDP, respectivamente ( $p < 0,05$ ).



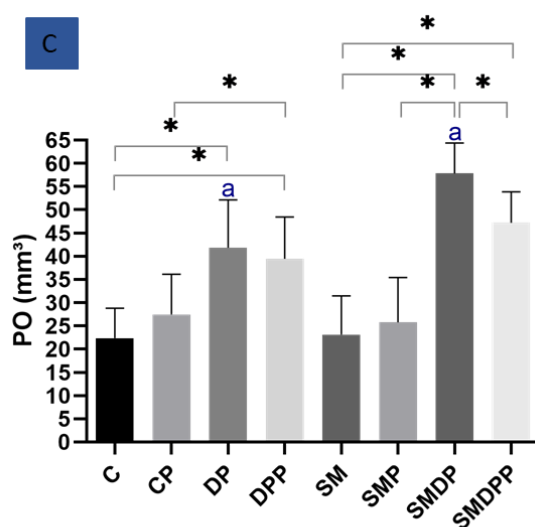


Figura 17: Médias e desvios-padrão das medidas obtidas na análise microtomográfica para todos os grupos experimentais. A) NOA; B) VO; C) PO. NOA = nível ósseo alveolar; VO = volume ósseo na região de bifurcação em relação ao volume total da região; PO = porosidade óssea. O símbolo \* e letras iguais representam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).

A Figura 18 representa a reconstrução 3D das imagens obtidas na Micro-CT para os grupos C, CP, DP e DPP. Os grupos SM, SMP, SMDP e SMDPP estão representados na Figura 19.

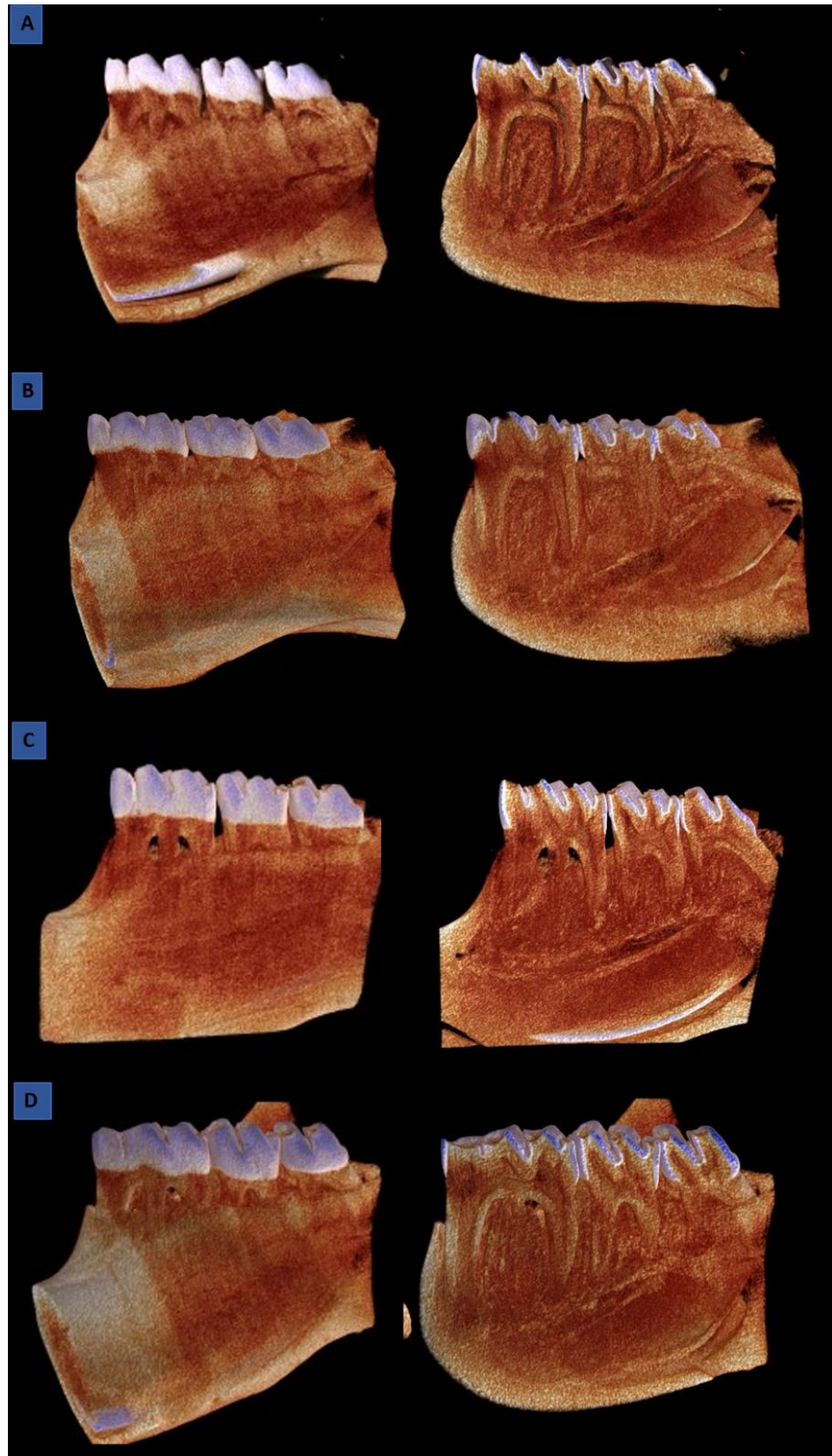


Figura 18: Reconstrução 3D das imagens obtidas na Micro-CT. A) C; B) CP; C) DP e D) DPP. Vista da face vestibular (imagens à esquerda) e Vista da superfície interna - corte sagital (imagens à direita). CTVox® (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do pixel = 7,96  $\mu\text{m}$

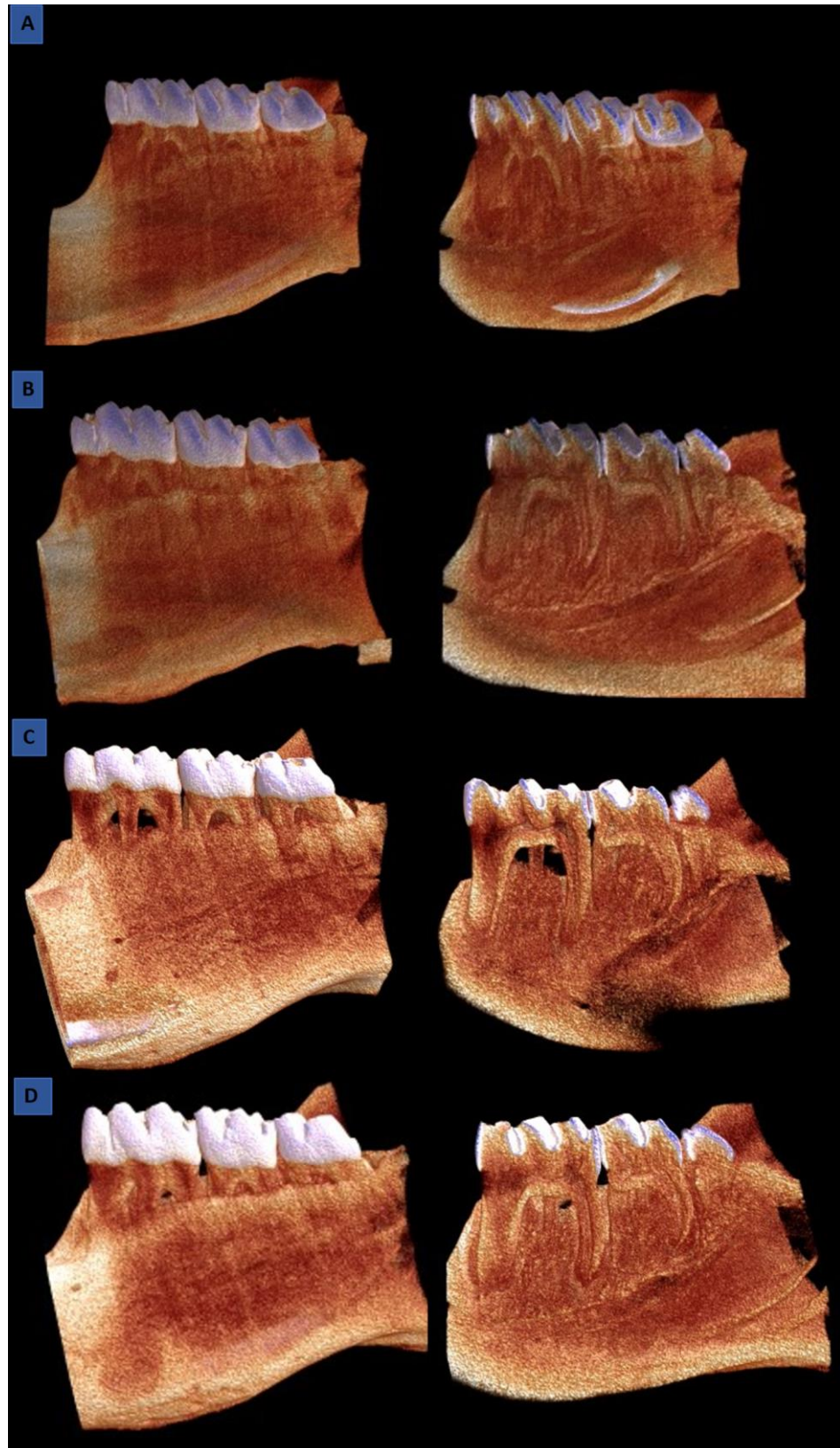


Figura 19: Reconstrução 3D das imagens obtidas na Micro-CT. A) SM; B) SMP; C) SMDP e D) SMDPP. Vista da face vestibular (imagens à esquerda) e Vista da superfície interna - corte sagital (imagens à direita). CTVox® (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do pixel = 7,96  $\mu\text{m}$

## 5.12. Análise Histológica

Os grupos C e CP apresentaram ligamento periodontal com características normais, grande quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias. As fibras colágenas estavam dispostas de modo organizado e perfeitamente inseridas no cimento adjacente e osso alveolar. O tecido ósseo na região de furca apresentava osteócitos em abundância e contornos regulares (Figuras 20 - A e B). Na região interproximal, entre o 1o e 2o molares inferiores, notou-se a preservação do epitélio juncional e do epitélio do sulco (Figuras 21 - A e B).

As características histológicas dos grupos SM e SMP (Figuras 20 - E e F; Figuras 21 - E e F) foram bastante semelhantes às daquelas do grupo C. No grupo SM, algumas trabéculas ósseas se apresentavam com espessura mais reduzida e os espaços medulares estavam menores e preenchidos por células hematopoiéticas, bem como observou-se numerosos vasos congestionados e uma disposição menos organizada das fibras conjuntivas.

As características histológicas apresentadas pelo grupo DP (Figuras 20 - C e 21 - C) e pelo grupo SMDP (Figuras 20 - G e 21 - G) foram semelhantes. No entanto, o grau de disfunção tecidual e a magnitude da resposta inflamatória local foram mais intensas no grupo SMDP. Ambos os grupos apresentaram tecido conjuntivo altamente desorganizado, com fibras irregularmente dispostas e edema intersticial moderado a intenso, presença de células inflamatórias (notadamente, células multinucleadas), bem como poucos fibroblastos. No grupo SMDP, um intenso infiltrado foi identificado em todo o tecido conjuntivo da área de furca (Figura 20 - G). Além disso, as amostras deste grupo apresentavam características de necrose óssea nesta região com a presença de células gigantes multinucleadas. O septo interradicular estava substancialmente reduzido, com afinamento de trabéculas e um número substancial de osteoclastos ativos. O tecido ósseo e cimento radiculares na região de furca apresentaram intensa destruição, contorno irregular e lacunas de *howship*. Na região interproximal, em ambos os grupos, entre o 1º e 2º molares, foram observados danos estruturais no epitélio sulcular e migração apical do epitélio juncional.

Os grupos DPP e SMDPP (Figuras 20 - D e H; Figuras - 21 D e H), quando comparados ao Grupo DP e SMDP (Figuras 20 - C e G; Figuras 21 - C e G), respectivamente, apresentaram tecido conjuntivo mais celularizado, menor edema intersticial, menor infiltrado inflamatório e fibras colágenas melhor dispostas e organizadas entre o osso alveolar e o cimento. Além disso, o tecido ósseo dos grupos DPP e SMDPP na região de bifurcação apresentou contorno regular



e arquitetura em platô decorrente do processo de reabsorção óssea com menor presença de células reabsortivas (Figuras 20 - D e H; Figuras 21 - D e H). O cimento radicular apresentou contorno regular e menores áreas de reabsorção. Na região interproximal (Figuras 21 - D e H), entre o 1° e 2° molares inferiores, observou-se danos estruturais de menor intensidade no epitélio sulcular, bem como menor deslocamento apical do epitélio juncional quando comparados ao Grupo DP.

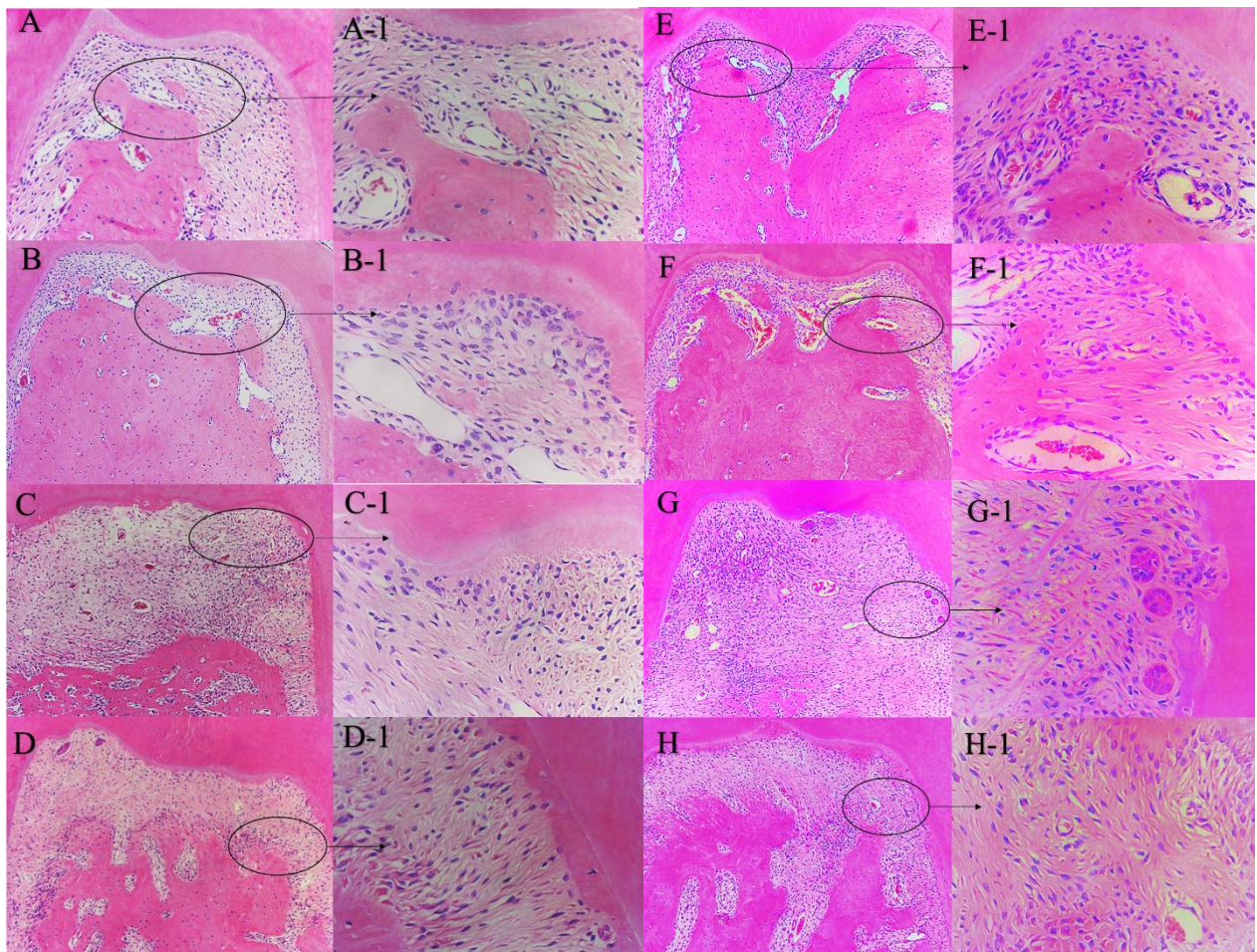


Figura 20: Imagens histológicas da região de bifurcação do 1° molar inferior, com aumento de 20x (A-H) e 40x (A1-H1), dos grupos C (A, A1), CP (B, B1), DP (C, C1), DPP (D, D1), SM (E, E1), SMP (F, F1), SMDP (G, G1) e SMDPP (H, H1).



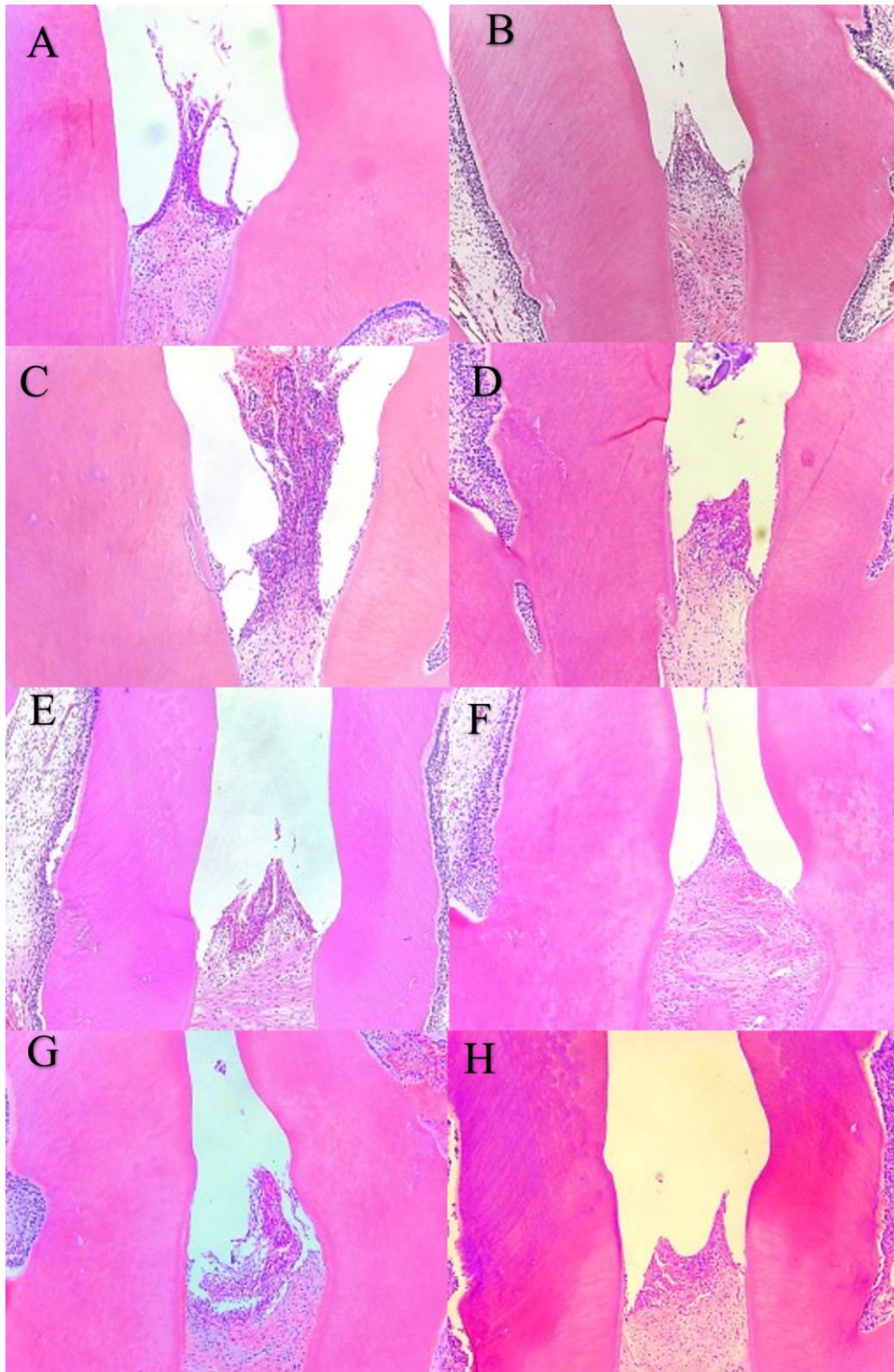


Figura 21: Imagens histológicas da região interproximal entre 1° e 2° molares inferiores, com aumento de 40x dos grupos: C (A), CP (B), DP (C), DPP (D), SM (E), SMP (F), SMDP (G) e SMDPP (H).

### 5.13. Estresse Oxidativo

Na Figura 22 - A é possível observar que a concentração de mieloperoxidase no grupo DP foi significativamente superior àquela dos grupos C e CP ( $p < 0,05$ ). Houve uma tendência de diferença estatística ( $p = 0,0659$ ) quando o grupo DP foi comparado ao grupo DPP. O grupo SMDP apresentou maiores concentrações deste analito quando comparado ao grupo SMP ( $p < 0,05$ ). Foram observadas tendências de diferença estatística na comparação entre os grupos SM e SMP ( $p = 0,0721$ ); SMDP e SMDPP ( $p = 0,0939$ ).

Na Figura 22 - B nota-se que o grupo C apresentou concentração de catalase estatisticamente superior aos grupos DP, DPP e SMDP ( $p < 0,05$ ). O grupo SM apresentou menores valores quando comparado ao SMDPP ( $p < 0,05$ ). Uma tendência de menores valores de catalase também foi observada nos grupos SM e SMDP quando comparados aos grupos SMP ( $p = 0,0906$ ) e SMDPP ( $p = 0,0541$ ), respectivamente.

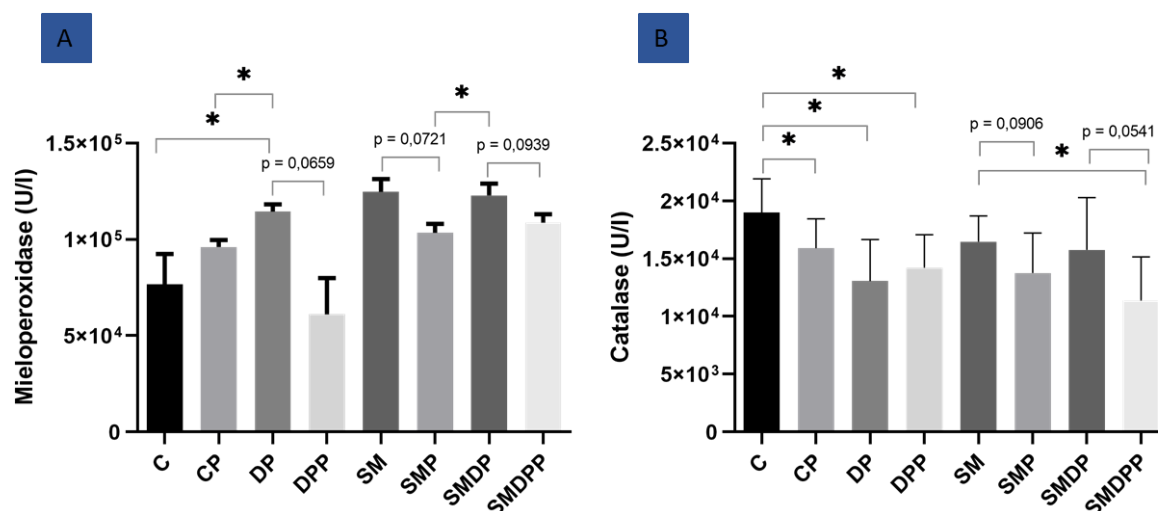


Figura 22: Médias e desvios-padrão da concentração sérica de Mieloperoxidase (A) e Catalase (B) para os grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. \*diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ). Comparações com valores de  $p < 0,1$  também foram representadas nos gráficos.



#### 5.14. Análise Imunoenzimática

As médias e desvio-padrão para a análise imunoenzimática, assim como as diferenças estatísticas entre os grupos estão representadas na Figura 23. Grupos que receberam PROB (DPP e SMDPP) apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) dos níveis de IL-1 $\beta$  quando comparados àqueles que não receberam PROB (DP e SMDP). Os grupos DPP e SMP apresentaram menores níveis de IL-6 que os grupos DP e SM, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Em relação à OPG e RANK-L, os seguintes dados foram observados: i) grupos com PROB (DPP e SMDPP) apresentaram níveis significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores de OPG que aqueles sem PROB (DP e SMDP); ii) o grupo SMP apresentou menores níveis de RANK-L quando comparado ao grupo SM ( $p < 0,05$ ); iii) e o grupo SMDPP apresentou menor razão RANK-L/OPG quando comparado ao grupo SMDP ( $p < 0,05$ ). Além disso, o grupo SMDP apresentou maior razão RANK-L/-OPG quando comparado ao grupo DP, assim como menor concentração de TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ). Para TNF- $\alpha$ , o grupo DPP apresentou menor concentração que o grupo DP. Do mesmo modo, o grupo SMDPP apresentou menores valores de TNF- $\alpha$  que aqueles do grupo SMDP ( $p < 0,05$ ). O grupo SMP também apresentou valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) de TNF- $\alpha$  que aqueles do grupo SM.

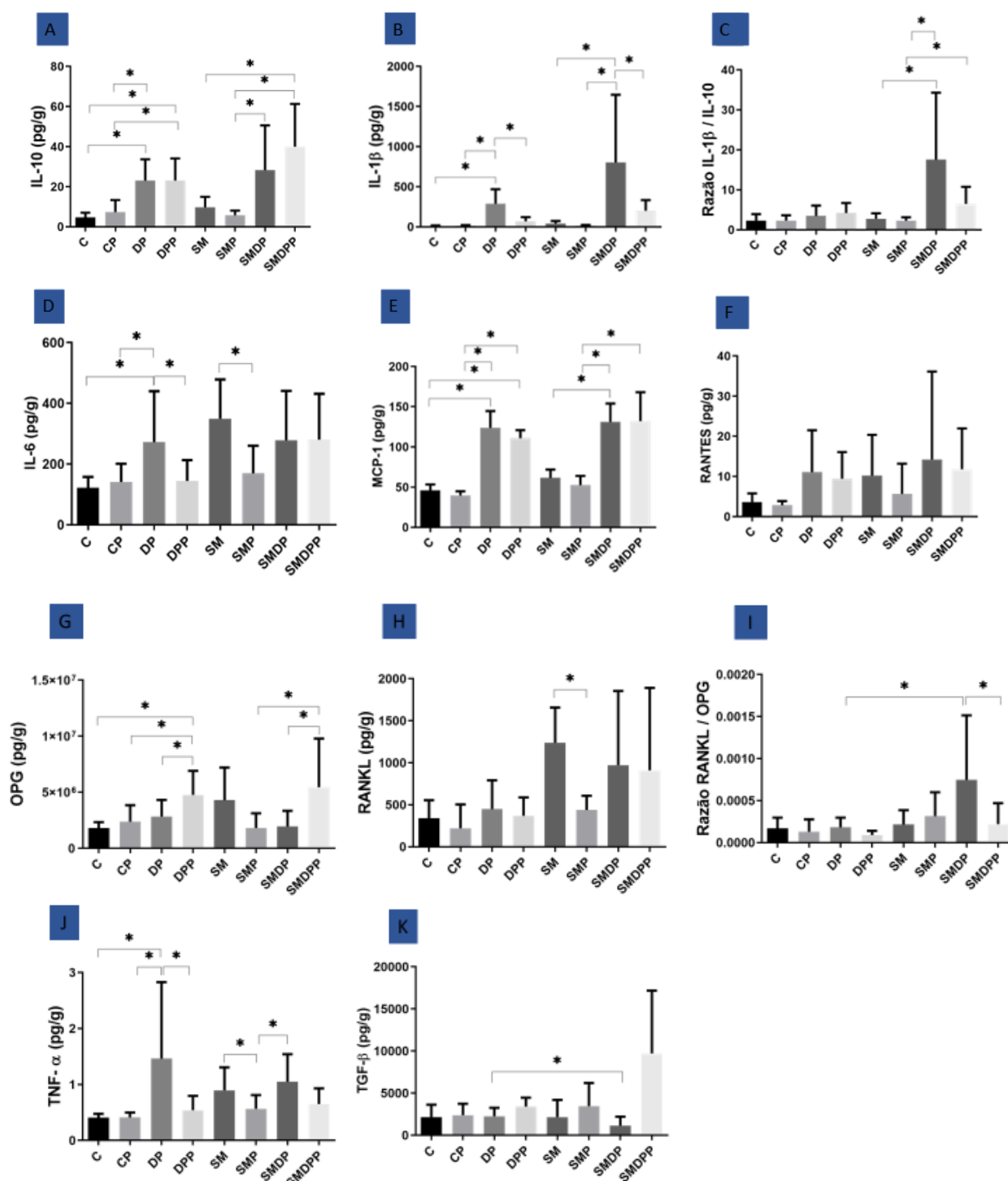


Figura 23: Médias e desvios-padrão da concentração média de: A) IL-10; B) IL-1β; C) IL-10/ IL-1β; D) IL-6; E) MCP-1; F) RANTES; G) OPG; H) RANKL; I) RANKL/OPG; J) TNF-α e K) TGF-β para todos os grupos.

\*diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ).

## 5.15. Perfil Microbiológico Intestinal (qRT-PCR)

### 5.15.1. Razão Firmicutes/Bacteroidetes

Foi observado que o grupo SMP apresentou razão Firmicutes/Bacteroidetes superior àquela dos grupos C e DP ( $p < 0,05$ ) (Figura 24).

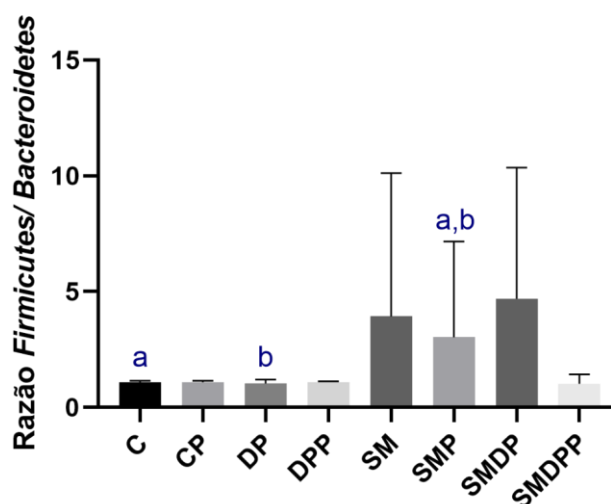


Figura 24: Médias e desvios-padrão da razão entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, presente nas fezes, para os grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. Letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (Teste t,  $p < 0,05$ ).

### 5.15.2. Lactobacilos, Firmicutes, Bifidobacterium e Bacteroidetes

A Figura 25 mostra os valores das diferenças (delta) obtidas nas contagens de *Lactobacilos*, *Firmicutes*, *Bifidobacterium* e *Bacteroidetes* entre a 16ª semana experimental e o baseline: valores positivos demonstram aumentos nas contagens de microrganismos e valores negativos indicam redução.

Todos os grupos apresentaram reduções nas contagens de *Lactobacilos* em relação ao baseline. Foi observada maior redução nas contagens de *Lactobacilos* (Figura 25 - A) no grupo SM quando comparado aos grupos C e SMDP ( $p < 0,05$ ). Foram observadas duas tendências de diferenças estatísticas: a primeira entre os grupos DPP e SMDPP ( $p = 0,0576$ ), indicando maior redução de *Lactobacilos* para SMDPP, e a segunda entre os grupos CP e SMP ( $p = 0,0690$ ), indicando maior redução de *Lactobacilos* para SMP (Figura 25 - A).

Para *Firmicutes*, houve aumento nas contagens apenas nos grupos C, DP, SM e SMDP em relação ao baseline. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas na comparações de delta dos grupos C e DP; DP e DPP; SM e SMP; e SMP e SMDPP. Existiram duas tendências de diferença estatística nessa análise: a primeira foi entre os grupos C e DP ( $p = 0,0892$ ), indicando aumento de *Firmicutes* para DP, e a outra foi entre os grupos SMDP e SMDPP ( $p = 0,0591$ ), indicando redução de *Firmicutes* para DP (Figura 25 - B).

Todos os grupos apresentaram reduções nas contagens de *Bifidobacterium* em relação ao baseline (Figura 25 - C). O grupo SM apresentou maiores reduções de *Bifidobacterium* quando comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ). O grupo SMDPP apresentou redução de *Bifidobacterium* significativamente superior àquela observada no grupo DPP ( $p < 0,05$ ).

Para *Bacterioidetes* (Figura 25 - D), houve aumento nas contagens apenas no grupo SMP em relação ao baseline. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas nas comparações de delta dos grupos SMP e CP; SMP e SM, SMP e SMDPP. Os grupos C e DP apresentaram maior redução de *Bacterioidetes* quando comparados aos grupos CP e SMDP, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Uma maior redução de *Bacterioidetes* também foi observada no grupo SMDPP quando comparado ao grupo SMDP ( $p < 0,05$ ).

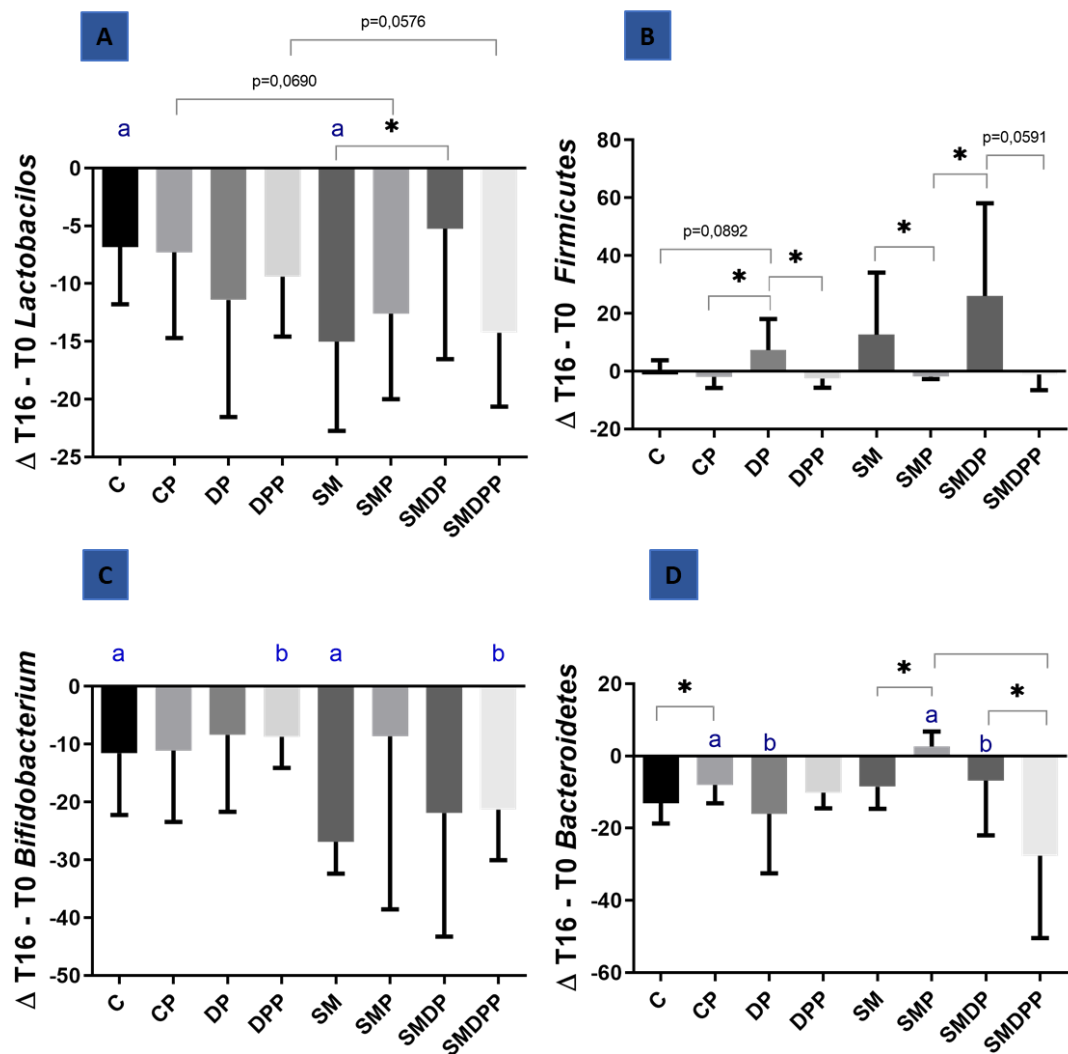


Figura 25: Médias e desvios-padrão das diferenças (delta) na contagem de bactérias entre a 16ª semana (T16) e o baseline (T0) nas fezes dos grupos C, CP, DP, DPP, SM, SMP, SMDP e SMDPP. A)  $\Delta$  T16-T0 *Lactobacilos*; B)  $\Delta$  T16-T0 *Firmicutes*; C)  $\Delta$  T16-T0 *Bifidobacterium*; D)  $\Delta$  T16-T0 *Bacteroidetes*. O símbolo \* e letras iguais representam diferença significativa entre os grupos indicados (Teste t,  $p < 0,05$ ).

---

## 6. Discussão

Este é o primeiro estudo a avaliar o impacto da terapia probiótica com *B. lactis* HN019 no desenvolvimento e progressão da DP em ratos com SM. A escolha desse gênero bacteriano levou em consideração seus benefícios nos tecidos periodontais (CARDOSO; MESSORA; SILVA; OLIVEIRA *et al.*, 2020; OLIVEIRA, L. F.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H.; FURLANETO, F. A. *et al.*, 2017; RICOLDI; FURLANETO; OLIVEIRA; TEIXEIRA *et al.*, 2017) e, também, efeitos capazes de atenuar as comorbidades da SM (BAGAROLLI; TOBAR; OLIVEIRA; ARAUJO *et al.*, 2017; GANGULI; MENG; RAUTAVA; LU *et al.*, 2013; KARIMI; JAMALUDDIN; MOHTARRUDIN; AHMAD *et al.*, 2017; LE; HOSAKA; NGUYEN; KASSU *et al.*, 2015; ROSELLI; FINAMORE; NUCCITELLI; CARNEVALI *et al.*, 2009; TOMOSADA; VILLENA; MURATA; CHIBA *et al.*, 2013). Os dados obtidos na análise de micro-CT demonstram que o uso sistêmico de *B. lactis* HN019 reduziu em 15% a perda óssea alveolar nos animais com SM e DP. Já para o grupo DPP, essa redução foi de 19% quando comparado ao grupo DP. Além disso, *B. lactis* HN019 impactou a microarquitetura óssea reduzindo a PO total óssea e aumentando o VO na região de bifurcação dos molares desses animais (Grupos DPP e SMDPP). A terapia probiótica também afetou benéficamente o perfil lipídico dos animais com SM, reduzindo os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, ácidos graxos e LDL.

Ao analisar os resultados do presente estudo, os métodos de indução de doenças devem ser considerados. Devido à sua natureza multifatorial, selecionar um modelo experimental adequado que melhor represente a fisiopatologia da SM em seres humanos pode ser bastante desafiador. Ratos e camundongos são os modelos animais mais comumente utilizados nas investigações de SM (BERNINI; SIMAO; ALFIERI; LOZOVVOY *et al.*, 2016; BORTOLIN; VARGAS; GASPAROTTO, 2018; BROOKS; DEVALLANCE; D'AUDIFFRET; FRISBEE *et al.*, 2015; LEE; LEE; KIM; JIN *et al.*, 2015; MAMIKUTTY; THENT; SAPRI; SAHRUDDIN *et al.*, 2014; RAMOS-JUNIOR; LEITE; CARMO-SILVA; TAIRA *et al.*, 2017; VIRTO; CANO; JIMENEZ-ORTEGA; FERNANDEZ-MATEOS *et al.*, 2018). Algumas das abordagens utilizadas para induzir a SM em roedores incluem a modificação genética de roedores e/ou manipulação dietética pela administração de ração com alto teor calórico e concentrações elevadas de gordura e/ou de carboidrato. Embora ratos modificados geneticamente, como a linhagem *Zucker*, sejam utilizados amplamente, ainda não é perfeitamente estabelecida qual é a contribuição relativa da genética versus meio ambiente no aumento do peso corporal e outras comorbidades associadas à SM. Em humanos, o uso de genética demonstrou que apenas um número relativamente pequeno de indivíduos tem mutação parcial ou completa no gene da

leptina, também conhecida como hormônio da saciedade, ou em seu receptor (SPEAKMAN; HAMBLY; MITCHELL; KRÓL, 2008). Já os modelos de distúrbios metabólicos, induzidos por dieta, têm considerável capacidade de mimetizarem os eventos vistos em humanos (Nilsson, Raun et al. 2012), incluindo o lento e progressivo ganho de peso, alterações do metabolismo lipídico e o desenvolvimento secundário da resistência à insulina (ALWAHSH; DWYER; FORBES; VAN THIEL *et al.*, 2017) Kleinert, Clemmensen et al. 2018)(MARQUES; MEIRELES; NORBERTO; LEITE *et al.*, 2016).

No presente estudo, a SM foi induzida por dieta hipercalórica com alta concentração de gordura, com composição semelhante às utilizadas em estudos prévios (ALWAHSH; DWYER; FORBES; VAN THIEL *et al.*, 2017; ANTUNES; ELKFURY; JORNADA; FOLETTI *et al.*, 2016; CHENG; TON; TAN; ABDUL KADIR, 2017; MARQUES; MEIRELES; NORBERTO; LEITE *et al.*, 2016; WANG; TANG; ZHANG; ZHAO *et al.*, 2015). De fato, todos os animais alimentados com dieta hipercalórica apresentaram alterações, quando comparados aos animais normosistêmicos, em pelo menos três parâmetros: IMC, peso, circunferência abdominal, perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e ácidos graxos), glicemia, teste de tolerância à glicose, insulina, HOMA-IR e/ou aferição de pressão arterial, sendo compatíveis com o diagnóstico da SM. Esses dados corroboram com estudos anteriores (CHENG; TON; TAN; ABDUL KADIR, 2017; JOHN; MOUATT; MAJZOUB; THOMAS *et al.*, 2019; MARQUES; MEIRELES; NORBERTO; LEITE *et al.*, 2016; VIRTO; CANO; JIMENEZ-ORTEGA; FERNANDEZ-MATEOS *et al.*, 2018).

O modelo experimental de DP utilizado, por meio de colocação de ligadura ao redor de molares de ratos, também já foi amplamente caracterizado em estudos anteriores. A presença persistente de microorganismos ao redor do fio de seda levam à destruição de tecido conjuntivo e perda óssea correspondendo aos estágios iniciais de periodontite (DE MOLON; PARK; JIN; SUGAI *et al.*, 2018; OLIVEIRA, L. F. F.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H. F.; FURLANETO, F. A. C. *et al.*, 2017; RICOLDI; FURLANETO; OLIVEIRA; TEIXEIRA *et al.*, 2017; WU; TAYA; KURAJI; ITO *et al.*, 2020). No presente estudo os animais dos grupos DP, DPP, SMDP e SMDPP apresentaram perda óssea significativa quando comparados aos animais dos grupos C e SM, assim como aumento de PO ( $p < 0,05$ ).

Ao analisar os dados obtidos por meio da micro-CT, é notório que os animais com SM e DP experimentais, independente da administração ou não de PROB (Grupos SMDP e SMDPP), apresentaram maior severidade de DP quando comparados aos animais normosistêmicos (DP e



DPP). De fato, existem várias evidências epidemiológicas que suportam a relação entre SM e DP (JEPSEN; SUVAN; DESCHNER, 2020). Em uma recente metanálise, foi sugerido que indivíduos com SM tem 38% mais chances de ter DP (DAUDT; MUSSKOPF; MENDEZ; REMONTI *et al.*, 2018). Embora os mecanismos que expliquem como essas condições podem afetar negativamente uma à outra ainda não sejam bem esclarecidos, um elo plausível entre a SM e a DP é o constante estado pró-inflamatório que as originam (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; VERMA; GAUTAM, 2019). Realmente, na análise imunoenzimática do presente estudo, o grupo SMDP apresentou menor concentração de TGF- $\beta$  quando comparado ao grupo DP, assim como maior taxa na razão RANK-L/OPG. A razão RANK-L/OPG é um parâmetro que reflete a atividade ou estabilidade da DP. Quando as concentrações de RANK-L superam as concentrações de OPG, nota-se progressão da perda óssea. Por outro lado, quando os valores de RANK-L estão iguais ou inferiores aos de OPG é aceito que há uma certa estabilidade no processo de perda óssea decorrente da DP. Algumas revisões de literatura (MENEZES; GARLET; LETRA; BRAMANTE *et al.*, 2008; POLAK; SHAPIRA, 2018) mostraram que diversos estudos clínicos e pré-clínicos encontraram níveis gengivais elevados da taxa RANK-L/OPG na presença de diabetes mal controlada, uma comorbidade da SM, o que poderia agravar a perda óssea na presença de DP. Já o TGF- $\beta$  é um fator de crescimento tecidual que participa ativamente no processo de cicatrização e manutenção da homeostase tecidual (GIBERTONI; SOMMER; ESQUISATTO; AMARAL *et al.*, 2017; LAL; SAITO; PAPPAS; PADBERG *et al.*, 2003; TANG; KHAN; ANDREANA; ARANY, 2017). Estudos relatam que anormalidades na via de sinalização do TGF- $\beta$  conduzem a diversas patologias, como hipertensão, hiperlipidemia e aterosclerose, comorbidades da SM (LIN; KUO; LIU; YANG *et al.*, 2017; TOMA; MCCAFFREY, 2012; ZENG; DANG; SCHUNKERT, 2016). Os níveis de TGF- $\beta$  também estão envolvidos no monitoramento da resposta ao tratamento periodontal (LIN; KUO; LIU; YANG *et al.*, 2017).

Outro mecanismo proposto para explicar a associação entre SM e DP é o EO. A DP está associada à redução da capacidade antioxidante e aumento do dano oxidativo nos tecidos periodontais (CHEN; CAI; ZHAO; SHI *et al.*, 2019; GHARBI; HAMILA; BOUGUEZZI; DANDANA *et al.*, 2019). O EO, resultado do desequilíbrio persistente entre a produção de espécies moleculares altamente reativas e de antioxidantes, induz inflamação e é considerado um fator de risco comum para doenças inflamatórias, como a resistência à insulina, DM tipo 2, doenças cardiovasculares e SM (CARRIER, 2017; CERIELLO, A.; MOTZ, E., 2004). O EO, além de promover a progressão fisiopatológica da doença periodontal (CHAPPLE;

MATTHEWS, 2007), aumenta a liberação de mediadores inflamatórios do hospedeiro e desencadeia respostas inflamatórias locais e sistêmicas (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000). No presente estudo, os animais dos grupos DP e DPP apresentaram níveis reduzidos de CAT quando comparados ao grupo C ( $p < 0,05$ ). Quando a DP foi associada à SM, houve redução significativa em comparação aos animais apenas com SM ( $p < 0,05$ ). A CAT é uma enzima capaz de converter o peróxido de hidrogênio resultante do EO em água e oxigênio (KATTOOR; POTHINENI; PALAGIRI; MEHTA, 2017). De fato, a atividade de CAT parece estar inversamente relacionada com a DP (Trivedi et al., 2014). A atividade de CAT foi analisada em tecido gengival humano e se mostrou reduzida com o aumento da profundidade da bolsa periodontal (Ellis et al., 1998) e outros parâmetros clínicos compatíveis com DP (Trivedi et al., 2014). Vários estudos indicam que mudanças na atividade de enzimas antioxidantes na DP estão relacionadas a condições sistêmicas (Akalin et al., 2009; Tonguç et al., 2011; Duarte et al., 2012; Trivedi et al., 2014). Em humanos, a análise de atividade de CAT e outros importantes antioxidantes em saliva e plasma se mostrou superior em pacientes sistemicamente saudáveis e sem DP quando comparados a indivíduos portadores de periodontite e/ou DM. No presente estudo, valores reduzidos de CAT foram observados nos animais dos grupos DP, DPP e SMDP.

Ainda sobre EO, os valores de MPO no presente estudo foram significativamente superiores nos grupos DP e SM quando comparados ao grupo C ( $p < 0,05$ ). A MPO é uma enzima heme-peroxidase responsável pela atividade antimicrobiana contra microorganismos e está relacionada com o aumento do EO e diminuição dos níveis de atividade da CAT (DA FONSECA; NUNES-SOUZA; GUEDES GDA; SCHETTINO-SILVA *et al.*, 2014; GARAI; RIOS-GONZALEZ; FURTMULLER; FUKUTO *et al.*, 2017). Apesar de seus efeitos benéficos relacionados à sua ação protetora mediada por leucócitos contra patógenos, a atividade excessiva de MPO pode implicar em dano tecidual por meio da produção de agentes oxidantes (Davies, 2011), estando envolvida em condições inflamatórias crônicas (Galijasevic et al. 2003), como a aterosclerose e doença arterial coronariana (Baldus et al. 2006). Ela também parece estar envolvida na SM e suas comorbidades (DA FONSECA; NUNES-SOUZA; GUEDES GDA; SCHETTINO-SILVA *et al.*, 2014). Esses achados podem explicar os níveis elevados dessa enzima nos animais dos grupos DP e SM. Os dados do presente estudo sugerem que o consumo de PROB pode promover uma redução da MPO. Embora, diferenças significativas não tenham sido observadas, uma tendência de menores valores de MPO foi observada nas comparações dos grupos DPP e DP, SMP e SM; e SMDPP e SMDP. Embora esse seja o primeiro estudo a avaliar o efeito de *B. lactis* HN019 na atividade de MPO em ratos

com SM e DP, outros estudos também já demonstraram redução da atividade de MPO após a administração de PROB em diferentes situações, como em pacientes com colite ulcerative (HEGAZY; EL-BEDEWY, 2010), em ratos com disbiose intestinal (ROY SARKAR; MITRA MAZUMDER; BANERJEE, 2020) e em ratos com ansiedade/depressão (JANG; LEE; KIM, 2019). É importante ressaltar que esses dados devem ser interpretados com cautela e não podem ser considerados isoladamente, uma vez que o EO é resultado do desequilíbrio de uma cascata de reações, sendo influenciado pela atividade de diversas enzimas e produtos, não apenas pela CAT e MPO.

É interessante observar também que, no presente estudo, os animais do grupo DP, não submetidos à indução de SM, apresentaram aumento significativo na aferição de pressão arterial sistólica quando comparados àqueles do grupo C ( $p < 0,05$ ). Uma recente meta-análise demonstrou que, de fato, a DP está associada a níveis mais elevados de pressão arterial sistólica e diastólica, sendo esse risco equivalente a 49% para aqueles com periodontite severa (MUÑOZ AGUILERA; SUVAN; BUTI; CZESNIKIEWICZ-GUZIK *et al.*, 2020). Os autores ainda destacaram que o manejo da DP pode ser de extrema relevância em pacientes com hipertensão, dada a importância da relação entre essas duas condições (MUÑOZ AGUILERA; SUVAN; BUTI; CZESNIKIEWICZ-GUZIK *et al.*, 2020). Uma das hipóteses propostas para explicar a associação entre DP e hipertensão arterial é o estado inflamatório persistente nessas duas condições. Já foi demonstrado que pacientes com hipertensão e DP, além do aumento de citocinas pró-inflamatórias, apresentam atividade aumentada de MPO (TÜRKOĞLU; BARİŞ; TERVAHARTIALA; ŞENARSLAN *et al.*, 2014). Entre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- $\alpha$ , por exemplo, pode afetar a função endotelial (MUÑOZ AGUILERA; SUVAN; BUTI; CZESNIKIEWICZ-GUZIK *et al.*, 2020). No presente estudo, os animais do grupo DP apresentaram níveis elevados de IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, MPO e TNF- $\alpha$ , quando comparado ao grupo C.

No presente estudo, verificou-se que o uso de *B. lactis* HN019 levou à menor progressão da DP, o que foi evidenciado pelos menores índices de NOA e PO, assim como maiores índices de VO, quando os grupos tratados (DPP e SMDPP) e não tratados com PROB (DP e SMDP) foram comparados. Esses resultados também foram encontrados em outros estudos pré-clínicos deste grupo de pesquisa utilizando a mesma cepa probiótica, administrada via local ou sistemicamente (CARDOSO; MESSORA; SILVA; OLIVEIRA *et al.*, 2020; OLIVEIRA, L. F.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H.; FURLANETO, F. A. *et al.*, 2017; RICOLDI; FURLANETO; OLIVEIRA; TEIXEIRA *et al.*, 2017). Invernici *et al.* (2018) relataram os benefícios de *B. lactis*

HN019 como terapia adjuvante no tratamento não cirúrgico da DP em indivíduos com periodontite generalizada. Os indivíduos tratados com RAR e PROB apresentaram diminuição na profundidade da sondagem e ganho clínico de inserção significativamente maiores do que aqueles tratados apenas com RAR (INVERNICI; SALVADOR; SILVA; SOARES; CASARIN; PALIOTO; SOUZA *et al.*, 2018). A plausibilidade do uso de probióticos na promoção de saúde periodontal é baseada na sua capacidade de inibir periodontopatógenos (por meio de competição e/ou produção de bacteriocinas, ácido lático e peróxido de hidrogênio), além de seu efeito imunomodulador (SEMINARIO-AMEZ; LÓPEZ-LÓPEZ; ESTRUGO-DEVESA; AYUSO-MONTERO *et al.*, 2017). Já foi demonstrado em testes *in vitro* que essa cepa apresentou potencial antimicrobiano contra importantes periodontopatógenos (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*) (INVERNICI; FURLANETO; SALVADOR; OUWEHAND *et al.*, 2020). Além disso, *B. lactis* é capaz de aderir a biofilmes subgengivais contendo *P. gingivalis*, *Actinomyces naeslundii* e *F. nucleatum* (JASBERG; SODERLING; ENDO; BEIGHTON *et al.*, 2016) e pode, conseqüentemente, alterar a qualidade e quantidade do biofilme bucal (KURU; LALEMAN; YALNIZOĞLU; KURU *et al.*, 2017) ao reduzir o número de sítios de ligação disponíveis para outras bactérias (INVERNICI; FURLANETO; SALVADOR; OUWEHAND *et al.*, 2020). Estudos *in vivo* também já demonstraram redução significativa de periodontopatógenos dos complexos microbianos laranja e vermelho (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1992) no biofilme bucal quando *B. lactis* HN019 foi administrado (INVERNICI; SALVADOR; SILVA; SOARES; CASARIN; PALIOTO; SOUZA *et al.*, 2018; OLIVEIRA, L. F.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H.; FURLANETO, F. A. *et al.*, 2017). A terapia probiótica parece ser uma potencial alternativa ao uso de antimicrobianos sistêmicos como terapia adjuvante no tratamento não cirúrgico da DP. A prevalência crescente de resistência a antibióticos, assim como outros efeitos colaterais decorrentes do seu uso (ELIAS; MOJA; MERTZ; LOEB *et al.*, 2017), como diarreia, náusea e cefaléia, de fato, são fatores que justificam a busca pelo desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas antimicrobianas para tratar doenças bucais relacionadas ao biofilme. Essas estratégias devem, idealmente, reduzir os níveis de biofilme sem afetar o equilíbrio biológico geral da cavidade bucal (ALLAKER; DOUGLAS, 2009).

Em relação aos efeitos imunomoduladores de PROB, foi observado, no presente estudo, que os animais dos grupos SMDPP e DPP apresentaram concentrações significativamente menores de IL-1 $\beta$  quando comparados aos grupos SMDP e DP, respectivamente. A IL-1 $\beta$  está envolvida na resposta imune do tipo Th1 ou imunidade mediada por células, sendo capaz de

estimular a osteoclastogênese. Alguns estudos demonstraram que os níveis de IL-1 $\beta$  são reduzidos após a implementação da RAR e/ou terapia probiótica (INCE; GURSOY; IPCI; CAKAR *et al.*, 2015; INVERNICI; SALVADOR; SILVA; SOARES; CASARIN; PALIOTO; SOUZA *et al.*, 2018; KURU; LALEMAN; YALNIZOĞLU; KURU *et al.*, 2017). Do mesmo modo, o grupo DPP apresentou níveis significativamente menores de IL-6 quando comparado ao grupo DP. Estudos com outras cepas probióticas corroboram esse achado (ERCAN; OLGUN; KISA; YALIM, 2020; SHIN; BAEK; LEE, 2018). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória do sistema imune inato, uma das primeiras a serem apresentadas nas vias de patogênese da DP, sendo responsável pela migração de células inflamatórias e osteoclastogênese (CEKICI; KANTARCI; HASTURK; VAN DYKE, 2014). Os grupos tratados com PROB (DPP e SMDPP) apresentaram perfis de citocinas diretamente envolvidas no metabolismo ósseo (TNF- $\alpha$ , OPG e RANK-L) diferentes daqueles não tratados com PROB (DP e SMDP), corroborando os achados de estudos prévios (Oliveira *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2020). O grupo DPP apresentou uma redução significativa de TNF- $\alpha$  e aumento de OPG quando comparado com o grupo DP. O grupo SMDPP apresentou menor razão RANK-L/OPG quando comparado ao grupo SMDP ( $p < 0,05$ ). O TNF- $\alpha$  estimula a reabsorção óssea e os fibroblastos a produzirem colagenase (BERTOLINI; NEDWIN; BRINGMAN; SMITH *et al.*, 1986; MEIKLE; ATKINSON; WARD; MURPHY *et al.*, 1989). Essa citocina aumenta a apoptose de células produtoras de matriz, limitando a capacidade de reparo dos tecidos periodontais (ALIKHANI; ALIKHANI; BOYD; MACLELLAN *et al.*, 2007; GRAVES; OSKOU; VOLEJNIKOVA; NAGUIB *et al.*, 2001; HOCK; KRISHNAN; ONYIA; BIDWELL *et al.*, 2001). OPG e sua relação com RANK-L desempenham papel fundamental no equilíbrio entre formação e reabsorção óssea e estão intimamente relacionadas com a DP (CEKICI; KANTARCI; HASTURK; VAN DYKE, 2014).

Embora estudos anteriores já tenham demonstrado o impacto de *B. lactis* sobre citocinas pró e anti-inflamatórias e seus benefícios na atividade linfocitária e capacidade fagocítica de células mononucleares (CARDOSO; MESSORA; SILVA; OLIVEIRA *et al.*, 2020; INVERNICI; FURLANETO; SALVADOR; OUWEHAND *et al.*, 2020; MENG; BA; LEE; PENG *et al.*, 2017; OLIVEIRA, L. F. F.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H. F.; FURLANETO, F. A. C. *et al.*, 2017; RICOLDI; FURLANETO; OLIVEIRA; TEIXEIRA *et al.*, 2017), é importante ressaltar que as interpretações dos resultados obtidos não podem considerar os efeitos isolados das citocinas investigadas, mas sim as possíveis ações sinérgicas das mesmas, sejam elas já conhecidas ou não, no processo inflamatório periodontal associadas aos desfechos microtomográficos observados. Além disso, não se pode concluir com o presente estudo se as

alterações observadas no perfil de citocinas dos tecidos periodontais foram decorrentes de uma ação local da terapia probiótica, se foi consequência da mudança de parâmetros microbiológicos ou se foi decorrente da ação sistêmica do PROB, sobretudo no ambiente intestinal dos animais. Além dos efeitos locais na DP, cepas probióticas podem beneficiar a microbiota intestinal com diferentes mecanismos de ação, entre eles: modulação imune do hospedeiro, produção de produtos antimicrobianos, competição por sítios de ligação com patógenos e aumento na função da barreira epitelial intestinal (BAGAROLLI; TOBAR; OLIVEIRA; ARAUJO *et al.*, 2017; BORDALO TONUCCI; DOS SANTOS; DE LUCES FORTES FERREIRA; RIBEIRO *et al.*, 2017; KIM; GUEVARRA; KIM; KWON *et al.*, 2019; MIGLIORANZA SCAVUZZI; MIGLIORANZA; HENRIQUE; PITELLI PAROSCHI *et al.*, 2015; WANG; TANG; ZHANG; ZHAO *et al.*, 2015). Gatej *et al.* (2018) investigaram o papel de *L. rhamnosus* na perda óssea alveolar e inflamação local e sistêmica em camundongos com DP. Os autores demonstraram que a administração probiótica previamente à indução da DP via gavagem oral ou via inoculação oral reduziu significativamente a perda óssea alveolar e a inflamação gengival, evidenciando assim a ação de PROB em ambas as vias: local e sistêmica (GATEJ; MARINO; BRIGHT; FITZSIMMONS *et al.*, 2018)

Tem sido sugerido na literatura que a microbiota oral disbiótica, presente na DP, pode impactar a microbiota intestinal, favorecendo o desenvolvimento ou agravamento de doença sistêmicas (ARIMATSU; YAMADA; MIYAZAWA; MINAGAWA *et al.*, 2014; LOURENÇO; SPENCER; ALM; COLOMBO, 2018). Um dos mecanismos propostos é que ulceração do epitélio do sulco, presente na bolsa periodontal, serve como porta de entrada para translocação bacteriana por via sanguínea, bem como de mediadores da resposta inflamatória local para diferentes órgãos do corpo humano (HAJISHENGALLIS, 2015). Messora *et al.* (2013) demonstraram que a DP modificar a morfologia intestinal de ratos. Na via inversa, uma microbiota intestinal disbiótica também pode promover uma resposta imuno-inflamatória sistêmica que, por sua vez, contribuirá para o desequilíbrio da microbiota oral (LOURENÇO; SPENCER; ALM; COLOMBO, 2018). Essas hipóteses evidenciam a complexa relação entre esses dois ecossistemas no eixo boca-intestino e podem explicar a maior severidade da DP nos animais portadores de SM. Futuros estudos correlacionando dados microbiológicos do biofilme bucal e da microbiota intestinal são fundamentais para melhor elucidar os mecanismos envolvidos no uso de probióticos para o tratamento ou prevenção de DP, assim como sua relação com outras condições sistêmicas.

Estudos em humanos e outros mamíferos têm relacionado o microbioma intestinal a uma variedade de processos fisiológicos que são vitais para a saúde do hospedeiro, incluindo homeostase energética, metabolismo, saúde epitelial intestinal, atividade imunológica e, até mesmo, desenvolvimento neurocomportamental (BARKO; MCMICHAEL; SWANSON; WILLIAMS, 2018). A disbiose da microbiota pode levar a uma alteração da permeabilidade intestinal, permitindo a translocação de bactérias e seus componentes, como os lipopolissacarídeos (LPS) e endotoxinas que, quando em contato com o sistema imunológico submucoso, induzem inflamação e prejudicam a sinalização em tecidos metabolicamente ativos (Stenman et al, 2016). Alterações na diversidade da microbiota intestinal, como o aumento de *Firmicutes* e a redução de *Bacteroidetes* estão relacionadas a um aumento na permeabilidade intestinal, a um estado pró-inflamatório e a diversas patologias como DM, resistência à insulina, obesidade e SM (CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M. *et al.*, 2007; CANI; DELZENNE, 2009; LEY; BÄCKHED; TURNBAUGH; LOZUPONE *et al.*, 2005; MIGLIORANZA SCAVUZZI; MIGLIORANZA; HENRIQUE; PITELLI PAROSCHI *et al.*, 2015). No presente estudo, a análise de qRT-PCR das fezes dos animais demonstrou que o grupo SM apresentou tendência de aumento da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* ao longo do experimento quando comparado ao grupo C ( $p=0,0993$ ). O grupo DP também apresentou aumento de *Firmicutes* quando comparado ao grupo CP ( $p < 0,05$ ) e tendência de aumento quando comparado ao grupo C ( $p = 0,0892$ ). Também foi possível detectar aumento de *Firmicutes* quando o grupo SMDP foi comparado ao grupo SMP ( $p < 0,05$ ). Em relação à *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, o grupo SM apresentou maior redução desses gêneros bacterianos, ao longo do experimento, quando comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ). Já foi relatado que *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* estão presentes em maiores proporções em humanos e mamíferos durante o período de amamentação e nos primeiros anos de vida, sendo considerados fundamentais no desenvolvimento do sistema imune e metabolismo do hospedeiro (BARKO; MCMICHAEL; SWANSON; WILLIAMS, 2018; SÁNCHEZ; DELGADO; BLANCO-MÍGUEZ; LOURENÇO *et al.*, 2017). Os dados microbiológicos do presente estudo reforçam a hipótese de que o eixo boca-intestino pode estar envolvido no processo de saúde e doença do hospedeiro e na associação de condições como a SM e a DP, uma vez que mudanças no perfil microbiológico intestinal parecem ter ocorrido nos ratos portadores dessas condições.

Em relação aos efeitos de PROB no ambiente intestinal, observou-se que: i) O grupo DPP apresentou redução de *Firmicutes* ao longo do experimento, enquanto o grupo DP apresentou aumento ao longo do experimento, com diferença estatística entre os grupos ( $p<0,05$ );

ii) O grupo SMDPP apresentou redução de *Firmicutes* ao longo do experimento, enquanto o grupo SMDP apresentou aumento ao longo do experimento, com tendência de diferença entre os grupos ( $p < 0,0591$ ); iii) O grupo SMDPP apresentou menor redução de *Bacteroidetes* que o grupo SMDP ( $p < 0,05$ ) ao longo do experimento e iv) O grupo SMP apresentou aumento de *Bacteroidetes* ao longo do experimento, enquanto o grupo SM apresentou redução, havendo diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ) e v) PROB não alterou de forma significativa a quantidade de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Embora já tenha sido demonstrado que a terapia probiótica pode causar alterações na composição da microbiota intestinal, associadas ou não a alterações metabólicas (LARSEN; VOGENSEN; VAN DEN BERG; NIELSEN *et al.*, 2010; PLAZA-DÍAZ; FERNÁNDEZ-CABALLERO; CHUECA; GARCÍA *et al.*, 2015; VEIGA; PONS; AGRAWAL; OOZEER *et al.*, 2014), os estudos são controversos. Em uma população idosa, o consumo de queijo probiótico contendo duas cepas de *Lactobacillus* não modificou significativamente os níveis dos principais grupos microbianos, como *Bifidobacterium* e *Bacteroidetes* (LAHTINEN; FORSSSTEN; AAKKO; GRANLUND *et al.*, 2012). Da mesma forma, em um outro estudo conduzido em gêmeas monozigótica (MCNULTY; YATSUNENKO; HSIAO; FAITH *et al.*, 2011), não foram observadas alterações na composição das espécies microbianas intestinais após o consumo de leite fermentado contendo *B. lactis* CNCM I-2494. Entretanto, os autores detectaram mudanças significativas no metatranscriptoma das amostras de fezes durante o período de consumo de PROB (MCNULTY; YATSUNENKO; HSIAO; FAITH *et al.*, 2011). Esse achado ressaltado a importância de se investigar não apenas alterações quantitativas da microbiota intestinal, mas também as possíveis alterações qualitativas promovidas pela terapia probiótica (SANCHEZ-MUNIZ; MACHO-GONZALEZ; GARCIMARTIN; SANTOS-LOPEZ *et al.*, 2019). Nesse contexto, diversos mecanismos de ação são propostos para explicar a atuação de PROB na modulação da microbiota intestinal, o que não implica necessariamente na mudança de composição ou da quantidade de espécies bacterianas: i) o aumento da função da barreira epitelial intestinal; ii) produção de produtos antimicrobianos; iii) competição por sítios de ligação com potenciais patógenos; iv) interferência na sinalização de Quorum Sensing e, portanto, na eficiência da colonização e formação do biofilme; v) modulação imune através da inibição de citocinas pró-inflamatórias; iv) alteração do metabolismo da microbiota por meio da presença e produção de substâncias por cepas probióticas, que influenciam o comportamento metabólico e consequente produção de demais substâncias por bactérias comensais, relação conhecida como “cross-feeding” (SÁNCHEZ; DELGADO; BLANCO-MÍGUEZ; LOURENÇO *et al.*, 2017).



No que se refere aos efeitos microbiológicos de PROB no ambiente intestinal, é importante também destacar a sensibilidade decorrente dos métodos de processamento das fezes para os resultados obtidos a importância do perfil microbiológico e imunológico do hospedeiro pré-terapia. Alguns trabalhos identificaram diferentes perfis de resposta microbiana ao uso de probióticos, sugerindo uma classificação dos indivíduos em “permissivos” ou “resistentes” à terapia probiótica. Indivíduos classificados como “permissivos” foram aqueles nos quais as estirpes probióticas se incorporaram à microbiota e puderam ser detectadas semanas após a interrupção do uso. Já aqueles que apresentaram um perfil considerado “resistente” não foram colonizados pelas espécies probióticas e, portanto, cessado o uso de PROB o seu efeito desapareceu (ZMORA; ZILBERMAN-SCHAPIRA; SUEZ; MOR *et al.*, 2018). Os autores atribuem essa permissividade/ resistência à microbiota comensal pré-existente do hospedeiro, mediada por fatores como idade, dieta, uso de antibióticos, características da cepa utilizada e seu local específico de colonização (ZHANG; DERRIEN; LEVENEZ; BRAZEILLES *et al.*, 2016; ZMORA; ZILBERMAN-SCHAPIRA; SUEZ; MOR *et al.*, 2018). De fato, pode ocorrer uma grande variabilidade na abundância de espécies probióticas nas fezes durante a fase experimental de estudos que investigam produtos probióticos (Zhang *et al.*, 2016). Contudo, nem sempre existem alterações no perfil microbiológico, mas sim alterações na expressão gênica da microbiota, as quais refletem a ocorrência de uma modulação funcional, sem necessariamente indicar uma alteração composicional (MALDONADO-GÓMEZ; MARTÍNEZ; BOTTACINI; O'CALLAGHAN *et al.*, 2016). Também é importante observar que já foram relatadas diferenças significativas entre a composição da microbiota fecal e da microbiota em diferentes regiões do intestino (ZMORA; ZILBERMAN-SCHAPIRA; SUEZ; MOR *et al.*, 2018). Desse modo, a análise microbiológica de amostras de fezes não necessariamente pode ser utilizada como um marcador para os efeitos de microrganismos probióticos na mucosa do trato gastrointestinal do hospedeiro e seu microbioma (FULLER, 1991; OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2002).

No presente estudo, os efeitos sistêmicos de PROB foram avaliados na análise de diversos parâmetros metabólicos. O grupo SMP apresentou redução significativa de LDL, triglicérides e ácidos graxos quando comparado ao grupo SM. Já o grupo SMDPP apresentou redução de 23% nos níveis séricos de colesterol total quando comparado ao grupo SMDP. Esses dados corroboram os resultados estudos anteriores (GAO; ZHU; GAO; LIU *et al.*, 2011; GUO; LIU; ZHANG; SHEN *et al.*, 2011; KONDO; XIAO; SATOH; ODAMAKI *et al.*, 2010; LUOTO; KALLIOMAKI; LAITINEN; ISOLAURI, 2010; TAKEMURA; OKUBO; SONOYAMA, 2010).

e podem ser explicados pela capacidade de algumas cepas probióticas em incorporar colesterol à sua membrana celular, diminuindo o pool de colesterol intestinal disponível para absorção (GAO; ZHU; GAO; LIU *et al.*, 2011; MIGLIORANZA SCAVUZZI; MIGLIORANZA; HENRIQUE; PITELLI PAROSCHI *et al.*, 2015). É importante destacar ainda que diversos estudos já demonstraram o impacto sistêmico de cepas probióticas nas comorbidades da SM e isso se deve principalmente à capacidade dos probióticos de modulação da microbiota intestinal e do sistema imune, além de ser capaz de alterar a permeabilidade da barreira intestinal (MIGLIORANZA SCAVUZZI; MIGLIORANZA; HENRIQUE; PITELLI PAROSCHI *et al.*, 2015), influenciando assim todo o metabolismo do hospedeiro.

Vale ressaltar que os efeitos dos probióticos são cepa-específicos e dependentes da dose em que são administrados (TEUGHELIS; LOOZEN; QUIRYNEN, 2011) e, dessa forma, os dados encontrados no presente estudo não podem ser generalizados. Além disso, este trabalho possui limitações inerentes de um estudo experimental em ratos. Mais estudos envolvendo dosagens, esquemas terapêuticos e vias de administração diferentes de *B. lactis* HN019, assim como os efeitos sistêmicos da terapia (bacteremia, infecções secundárias, modificações na microbiota intestinal) são necessários. Análises do metabolismo da microbiota intestinal, assim como da microbiota oral, histologia do intestino e análises de outros biomarcadores de EO também podem ser importantes para melhor esclarecer a influência de PROB sobre a SM e DP, sobretudo quando ambas as condições estão associadas.

---

## 7. Conclusão

O uso de *B. lactis* HN019 reduziu a severidade da DP em ratos com ou sem SM e modulou parâmetros imunoinflamatórios nos tecidos periodontais. Além disso, *B. lactis* HN019 impactou benéficamente parâmetros de dislipidemia em ratos com SM.

---

## Referências Bibliográficas

- ACHARYA, A.; BHAVSAR, N.; JADAV, B.; PARIKH, H. Cardioprotective effect of periodontal therapy in metabolic syndrome: a pilot study in Indian subjects. **Metabolic syndrome and related disorders**, 8, n. 4, p. 335-341, 2010.
- AGIL, A.; ROSADO, I.; RUIZ, R.; FIGUEROA, A. *et al.* Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. **Journal of pineal research**, 52, n. 2, p. 203-210, 2012.
- AGUILAR, M.; BHUKET, T.; TORRES, S.; LIU, B. *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. **Jama**, 313, n. 19, p. 1973-1974, May 19 2015.
- ALANZI, A.; HONKALA, S.; HONKALA, E.; VARGHESE, A. *et al.* Effect of Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. **Benef Microbes**, 9, n. 4, p. 593-602, Jun 15 2018.
- ALBANDAR, J. M.; SUSIN, C.; HUGHES, F. J. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. **J Periodontol**, 89 Suppl 1, p. S183-s203, Jun 2018.
- ALIKHANI, M.; ALIKHANI, Z.; BOYD, C.; MACLELLAN, C. M. *et al.* Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. **Bone**, 40, n. 2, p. 345-353, 2007.
- ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. W. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **Int J Antimicrob Agents**, 33, n. 1, p. 8-13, Jan 2009.
- ALVEAR, F. S.; MARÁ, E.; BOTERO, L. Factores de riesgo para las enfermedades periodontales. **Revista Facultad de Odontología-a Universidad de Antioquia**, 22, p. 109-116, 2010.
- ALWAHSH, S. M.; DWYER, B. J.; FORBES, S.; VAN THIEL, D. H. *et al.* Insulin Production and Resistance in Different Models of Diet-Induced Obesity and Metabolic Syndrome. *In*: TARANTINO, G. (Ed.). **Int J Mol Sci**, 2017. v. 18.
- AMAR, J.; CHABO, C.; WAGET, A.; KLOPP, P. *et al.* Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. **EMBO molecular medicine**, 3, n. 9, p. 559-572, 2011.
- ANDRIANKAJA, O. M.; SREENIVASA, S.; DUNFORD, R.; DENARDIN, E. Association between metabolic syndrome and periodontal disease. **Australian dental journal**, 55, n. 3, p. 252-259, 2010.
- ANTUNES, L. C.; ELKFURY, J. L.; JORNADA, M. N.; FOLETTTO, K. C. *et al.* Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. **Arch Endocrinol Metab**, 60, n. 2, p. 138-142, Apr 2016.
- ARIMATSU, K.; YAMADA, H.; MIYAZAWA, H.; MINAGAWA, T. *et al.* Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. **Sci Rep**, 4, p. 4828, May 6 2014.
- BACKHED, F.; MANCHESTER, J. K.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104, n. 3, p. 979-984, 2007.

- BAEZA, M.; MORALES, A.; CISTERNA, C.; CAVALLA, F. *et al.* Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. **J Appl Oral Sci**, 28, p. e20190248, 2020.
- BAGAROLLI, R. A.; TOBAR, N.; OLIVEIRA, A. G.; ARAUJO, T. G. *et al.* Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. **J Nutr Biochem**, 50, p. 16-25, Dec 2017.
- BALTACIOGLU, E.; AKALIN, F. A.; ALVER, A.; DEGER, O. *et al.* Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. **Archives of oral biology**, 53, n. 8, p. 716-722, 2008.
- BARKO, P. C.; MCMICHAEL, M. A.; SWANSON, K. S.; WILLIAMS, D. A. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. **J Vet Intern Med**, 32, n. 1, p. 9-25, Jan 2018.
- BARRETO, F. M.; COLADO SIMAO, A. N.; MORIMOTO, H. K.; BATISTI LOZOVYOY, M. A. *et al.* Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, 30, n. 7-8, p. 939-942, 2014.
- BATTINO, M.; FERREIRO, M. S.; BOMPADRE, S.; LEONE, L. *et al.* Elevated hydroperoxide levels and antioxidant patterns in Papillon-Lefevre syndrome. **Journal of periodontology**, 72, n. 12, p. 1760-1766, 2001.
- BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and environmental microbiology**, 72, n. 3, p. 1729-1738, 2006.
- BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R. P. Microbial shift and periodontitis. **Periodontol 2000**, 55, n. 1, p. 36-47, Feb 2011.
- BERNINI, L. J.; SIMAO, A. N.; ALFIERI, D. F.; LOZOVYOY, M. A. *et al.* Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. **Nutrition**, 32, n. 6, p. 716-719, Jun 2016.
- BERTOLINI, D. R.; NEDWIN, G. E.; BRINGMAN, T. S.; SMITH, D. D. *et al.* Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature**, 319, n. 6053, p. 516-518, Feb 6-12 1986.
- BIZZARRO, S.; VAN DER VELDEN, U.; TEEUW, W. J.; GERDES, V. E. A. *et al.* Effect of periodontal therapy with systemic antimicrobials on parameters of metabolic syndrome: A randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, 44, n. 8, p. 833-841, Aug 2017.
- BORDALO TONUCCI, L.; DOS SANTOS, K. M.; DE LUCES FORTES FERREIRA, C. L.; RIBEIRO, S. M. *et al.* Gut microbiota and probiotics: Focus on diabetes mellitus. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 57, n. 11, p. 2296-2309, Jul 24 2017.
- BORTOLIN, R. C.; VARGAS, A. R.; GASPAROTTO, J. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. 42, n. 3, p. 525-534, Mar 2018.
- BROOKS, S. D.; DEVALLANCE, E.; D'AUDIFFRET, A. C.; FRISBEE, S. J. *et al.* Metabolic syndrome impairs reactivity and wall mechanics of cerebral resistance arteries in obese Zucker rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 309, n. 11, p. H1846-1859, Dec 1 2015.

- BULLON, P.; MORILLO, J. M.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; QUILES, J. L. *et al.* Metabolic syndrome and periodontitis: is oxidative stress a common link? **Journal of dental research**, 88, n. 6, p. 503-518, 2009.
- CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007.
- CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, 56, n. 7, p. 1761-1772, Jul 2007.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. **Curr Opin Pharmacol**, 9, n. 6, p. 737-743, Dec 2009.
- CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; KNAUF, C. *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, 50, n. 11, p. 2374-2383, 2007.
- CANO, P. G.; SANTACRUZ, A.; TREJO, F. M.; SANZ, Y. Bifidobacterium CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, 21, n. 11, p. 2310-2321, 2013.
- CARDOSO, R. S.; MESSORA, M. R.; SILVA, P. H. F.; OLIVEIRA, L. F. *et al.* Effects of Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis. **Benef Microbes**, 11, n. 1, p. 33-46, Feb 19 2020.
- CARRIER, A. Metabolic Syndrome and Oxidative Stress: A Complex Relationship. **Antioxid Redox Signal**, 26, n. 9, p. 429-431, Mar 20 2017.
- CARVAJAL, P.; VERNAL, R.; REINERO, D.; MALHEIROS, Z. *et al.* Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section II: Introduction part II. **Braz Oral Res**, 34, n. suppl 1, p. e023, 2020.
- CATON, J. G.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T.; CHAPPLE, I. L. C. *et al.* A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Clin Periodontol**, 45 Suppl 20, p. S1-s8, Jun 2018.
- CEKICI, A.; KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T. E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000**, 64, n. 1, p. 57-80, Feb 2014.
- CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 24, n. 5, p. 816-823, 2004.
- CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 24, n. 5, p. 816-823, May 2004.
- CHAMPAGNE, C. M. E.; BUCHANAN, W.; REDDY, M. S.; PREISSER, J. S. *et al.* Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, 31, p. 167-180, 2003.
- CHAPPLE, I. L.; MATTHEWS, J. B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. **Periodontol 2000**, 43, p. 160-232, 2007.



CHEN, J.; WANG, R.; LI, X.-F.; WANG, R.-L. Bifidobacterium adolescentis supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. **The British journal of nutrition**, 107, n. 10, p. 1429-1434, 2012.

CHEN, M.; CAI, W.; ZHAO, S.; SHI, L. *et al.* Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. **J Clin Periodontol**, 46, n. 6, p. 608-622, Jun 2019.

CHENG, H. S.; TON, S. H.; TAN, J. B. L.; ABDUL KADIR, K. The Ameliorative Effects of a Tocotrienol-Rich Fraction on the AGE-RAGE Axis and Hypertension in High-Fat-Diet-Fed Rats with Metabolic Syndrome. *In: Nutrients*, 2017. v. 9.

COSSEAU, C.; DEVINE, D. A.; DULLAGHAN, E.; GARDY, J. L. *et al.* The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. **Infection and immunity**, 76, n. 9, p. 4163-4175, 2008.

CZESNIKIEWICZ-GUZIŁ, M.; OSMENDA, G.; SIEDLINSKI, M.; NOSALSKI, R. *et al.* Causal association between periodontitis and hypertension: evidence from Mendelian randomization and a randomized controlled trial of non-surgical periodontal therapy. **Eur Heart J**, 40, n. 42, p. 3459-3470, Nov 1 2019.

DA FONSECA, L. J.; NUNES-SOUZA, V.; GUEDES GDA, S.; SCHETTINO-SILVA, G. *et al.* Oxidative status imbalance in patients with metabolic syndrome: role of the myeloperoxidase/hydrogen peroxide axis. **Oxid Med Cell Longev**, 2014, p. 898501, 2014.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature reviews. Microbiology**, 8, n. 7, p. 481-490, 2010.

DAUDT, L. D.; MUSSKOPF, M. L.; MENDEZ, M.; REMONTI, L. L. R. *et al.* Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Braz Oral Res**, 32, p. e35, May 24 2018.

DE MOLON, R. S.; PARK, C. H.; JIN, Q.; SUGAI, J. *et al.* Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. **Microsc Res Tech**, 81, n. 12, p. 1412-1421, Dec 2018.

DEMMER, R. T.; TRINQUART, L.; ZUK, A.; FU, B. C. *et al.* The influence of anti-infective periodontal treatment on C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **PLoS One**, 8, n. 10, p. e77441, 2013.

DOĞAN, E. S. K.; DOĞAN, B.; FENTOĞLU, Ö.; KIRZIOĞLU, F. Y. The role of serum lipoxin A4 levels in the association between periodontal disease and metabolic syndrome. **J Periodontal Implant Sci**, 49, n. 2, p. 105-113, Apr 2019.

DOGAN, G. E.; TORAMAN, A.; SEBIN, S. O.; DOGAN, C. *et al.* Salivary IL-6 and IL-10 levels in subjects with obesity and gingivitis. **Am J Dent**, 29, n. 5, p. 261-265, Oct 2016.

EBERSOLE, J. L.; CAPPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontol** 2000, 23, p. 19-49, Jun 2000.

EKE, P. I.; DYE, B. A.; WEI, L.; THORNTON-EVANS, G. O. *et al.* Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. **Journal of dental research**, 91, n. 10, p. 914-920, 2012.

- ELIAS, C.; MOJA, L.; MERTZ, D.; LOEB, M. *et al.* Guideline recommendations and antimicrobial resistance: the need for a change. **BMJ Open**, 7, n. 7, p. e016264, Jul 26 2017.
- ERCAN, N.; OLGUN, E.; KISA, Ü.; YALIM, M. Effect of synbiotics in the treatment of smokers and non-smokers with gingivitis: randomized controlled trial. **Aust Dent J**, 65, n. 3, p. 210-219, Sep 2020.
- FISCHER, R. G.; LIRA JUNIOR, R.; RETAMAL-VALDES, B.; FIGUEIREDO, L. C. *et al.* Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. **Braz Oral Res**, 34, n. suppl 1, p. e026, 2020.
- FORD, E. S.; GILES, W. H.; DIETZ, W. H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **JAMA**, 287, n. 3, p. 356-359, 2002.
- FORNER, L.; LARSEN, T.; KILIAN, M.; HOLMSTRUP, P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. **Journal of clinical periodontology**, 33, n. 6, p. 401-407, 2006.
- FRENCKEN, J. E.; SHARMA, P.; STENHOUSE, L.; GREEN, D. *et al.* Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. **J Clin Periodontol**, 44 Suppl 18, p. S94-s105, Mar 2017.
- FRIEDEWALD, V. E.; KORNMAN, K. S.; BECK, J. D.; GENCO, R. *et al.* The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. **Journal of periodontology**, 80, n. 7, p. 1021-1032, 2009.
- FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, 32, n. 4, p. 439-442, Apr 1991.
- GAMONAL, J.; BRAVO, J.; MALHEIROS, Z.; STEWART, B. *et al.* Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section I: Introduction part I. **Braz Oral Res**, 34, n. suppl 1, p. e024, 2020.
- GANGULI, K.; MENG, D.; RAUTAVA, S.; LU, L. *et al.* Probiotics prevent necrotizing enterocolitis by modulating enterocyte genes that regulate innate immune-mediated inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 304, n. 2, p. G132-141, Jan 15 2013.
- GAO, D.; ZHU, G.; GAO, Z.; LIU, Z. *et al.* Antioxidative and hypolipidemic effects of lactic acid bacteria from pickled Chinese cabbage. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5, n. 8, p. 1439-1446, 2011.
- GARAI, D.; RIOS-GONZALEZ, B. B.; FURTMULLER, P. G.; FUKUTO, J. M. *et al.* Mechanisms of myeloperoxidase catalyzed oxidation of H<sub>2</sub>S by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or O<sub>2</sub> to produce potent protein Cys-polysulfide-inducing species. **Free Radic Biol Med**, 113, p. 551-563, Dec 2017.
- GATEJ, S. M.; MARINO, V.; BRIGHT, R.; FITZSIMMONS, T. R. *et al.* Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. **J Clin Periodontol**, 45, n. 2, p. 204-212, Feb 2018.
- GENCO, R. J.; SANZ, M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. **Periodontol 2000**, 83, n. 1, p. 7-13, Jun 2020.
- GENEST, J.; MCPHERSON, R.; FROHLICH, J.; ANDERSON, T. *et al.* 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. **The Canadian journal of cardiology**, 25, n. 10, p. 567-579, 2009.

GHARBI, A.; HAMILA, A.; BOUGUEZZI, A.; DANDANA, A. *et al.* Biochemical parameters and oxidative stress markers in Tunisian patients with periodontal disease. **BMC Oral Health**, 19, n. 1, p. 225, Oct 22 2019.

GIBERTONI, F.; SOMMER, M. E. L.; ESQUISATTO, M. A. M.; AMARAL, M. *et al.* Evolution of Periodontal Disease: Immune Response and RANK/RANKL/OPG System. **Braz Dent J**, 28, n. 6, p. 679-687, Nov-Dec 2017.

GRAVES, D. T.; OSKOUI, M.; VOLEJNIKOVA, S.; NAGUIB, G. *et al.* Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. **J Dent Res**, 80, n. 10, p. 1875-1879, Oct 2001.

GRUNDY, S. M. Metabolic syndrome: therapeutic considerations. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 170, p. 107-133, 2005.

GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; DANIELS, S. R.; DONATO, K. A. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. **Cardiol Rev**, 13, n. 6, p. 322-327, Nov-Dec 2005.

GRUSOVIN, M. G.; BOSSINI, S.; CALZA, S.; CAPPÀ, V. *et al.* Clinical efficacy of *Lactobacillus reuteri*-containing lozenges in the supportive therapy of generalized periodontitis stage III and IV, grade C: 1-year results of a double-blind randomized placebo-controlled pilot study. **Clin Oral Investig**, 24, n. 6, p. 2015-2024, Jun 2020.

GUO, X.; XIA, X.; TANG, R.; ZHOU, J. *et al.* Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Lett Appl Microbiol**, 47, n. 5, p. 367-373, Nov 2008.

GUO, Z.; LIU, X. M.; ZHANG, Q. X.; SHEN, Z. *et al.* Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 21, n. 11, p. 844-850, Nov 2011.

GURKAN, A.; EREN, G.; CETINKALP, S.; AKCAY, Y. D. *et al.* Monocyte chemotactic protein-1, RANTES and macrophage migration inhibitory factor levels in gingival crevicular fluid of metabolic syndrome patients with gingivitis. **Arch Oral Biol**, 69, p. 82-88, Sep 2016.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 1, p. 30-44, Jan 2015.

HAN, W.; JI, T.; WANG, L.; YAN, L. *et al.* Abnormalities in periodontal and salivary tissues in conditional presenilin 1 and presenilin 2 double knockout mice. **Molecular and cellular biochemistry**, 347, n. 1-2, p. 13-20, 2011.

HEGAZY, S. K.; EL-BEDEWY, M. M. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, 16, n. 33, p. 4145-4151, Sep 7 2010.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 11, n. 8, p. 506-514, 2014/08/01 2014.

HLUSHCHENKO, T. A.; BATIG, V. M.; BORYSENKO, A. V.; TOKAR, O. M. *et al.* Prevalence and Intensity of Periodontal Disease in Individuals with Metabolic Syndrome. **J Med Life**, 13, n. 3, p. 289-292, Jul-Sep 2020.

HOCK, J. M.; KRISHNAN, V.; ONYIA, J. E.; BIDWELL, J. P. *et al.* Osteoblast apoptosis and bone turnover. **J Bone Miner Res**, 16, n. 6, p. 975-984, Jun 2001.

IANIRO, G.; BIBBO, S.; GASBARRINI, A.; CAMMAROTA, G. Therapeutic modulation of gut microbiota: current clinical applications and future perspectives. **Current drug targets**, 15, n. 8, p. 762-770, 2014.

IKRAM, S.; HASSAN, N.; BAIG, S.; BORGES, K. J. J. *et al.* Effect of local probiotic (*Lactobacillus reuteri*) vs systemic antibiotic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in chronic periodontitis. **J Investig Clin Dent**, 10, n. 2, p. e12393, May 2019.

IKRAM, S.; HASSAN, N.; RAFFAT, M. A.; MIRZA, S. *et al.* Systematic review and meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trials using probiotics in chronic periodontitis. **J Investig Clin Dent**, 9, n. 3, p. e12338, Aug 2018.

INCE, G.; GURSOY, H.; IPCI, S. D.; CAKAR, G. *et al.* Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. **Journal of periodontology**, 86, n. 6, p. 746-754, 2015.

INVERNICI, M. M.; FURLANETO, F. A. C.; SALVADOR, S. L.; OUWEHAND, A. C. *et al.* *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. **PLoS One**, 15, n. 9, p. e0238425, 2020.

INVERNICI, M. M.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H. F.; SOARES, M. S. M. *et al.* Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. 45, n. 10, p. 1198-1210, Oct 2018.

INVERNICI, M. M.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H. F.; SOARES, M. S. M. *et al.* Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, 45, n. 10, p. 1198-1210, Oct 2018.

JANG, H. M.; LEE, K. E.; KIM, D. H. The Preventive and Curative Effects of *Lactobacillus reuteri* NK33 and *Bifidobacterium adolescentis* NK98 on Immobilization Stress-Induced Anxiety/Depression and Colitis in Mice. **Nutrients**, 11, n. 4, Apr 11 2019.

JASBERG, H.; SODERLING, E.; ENDO, A.; BEIGHTON, D. *et al.* *Bifidobacteria* inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. **Eur J Oral Sci**, 124, n. 3, p. 251-258, Jun 2016.

JEPSEN, S.; SUVAN, J.; DESCHNER, J. The association of periodontal diseases with metabolic syndrome and obesity. **Periodontol 2000**, 83, n. 1, p. 125-153, Jun 2020.

JIN, L. J.; LAMSTER, I. B.; GREENSPAN, J. S.; PITTS, N. B. *et al.* Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. **Oral Dis**, 22, n. 7, p. 609-619, Oct 2016.

JOHN, O. D.; MOUATT, P.; MAJZOUB, M. E.; THOMAS, T. *et al.* Physiological and Metabolic Effects of Yellow Mangosteen (*Garcinia dulcis*) Rind in Rats with Diet-Induced Metabolic Syndrome. **Int J Mol Sci**, 21, n. 1, Dec 31 2019.

KANG, Y.; CAI, Y. Gut microbiota and hypertension: From pathogenesis to new therapeutic strategies. **Clin Res Hepatol Gastroenterol**, 42, n. 2, p. 110-117, Apr 2018.

KARIMI, G.; JAMALUDDIN, R.; MOHTARRUDIN, N.; AHMAD, Z. *et al.* Single-species versus dual-species probiotic supplementation as an emerging therapeutic strategy for obesity. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 27, n. 10, p. 910-918, Oct 2017.

KASSEBAUM, N. J.; BERNABE, E.; DAHIYA, M.; BHANDARI, B. *et al.* Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. **J Dent Res**, 93, n. 11, p. 1045-1053, Nov 2014.

KASSEBAUM, N. J.; SMITH, A. G. C.; BERNABE, E.; FLEMING, T. D. *et al.* Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. **J Dent Res**, 96, n. 4, p. 380-387, Apr 2017.

KATTOOR, A. J.; POTHINENI, N. V. K.; PALAGIRI, D.; MEHTA, J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, 19, n. 11, p. 42, Sep 18 2017.

KATZ, J.; BHATTACHARYYA, I.; FARKHONDEH-KISH, F.; PEREZ, F. M. *et al.* Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. **Journal of clinical periodontology**, 32, n. 1, p. 40-44, 2005.

KIM, S. K.; GUEVARRA, R. B.; KIM, Y. T.; KWON, J. *et al.* Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. **J Microbiol Biotechnol**, 29, n. 9, p. 1335-1340, Sep 28 2019.

KIMOTO, H.; OHMOMO, S.; OKAMOTO, T. Cholesterol removal from media by lactococci. **Journal of dairy science**, 85, n. 12, p. 3182-3188, 2002.

KINANE, D. F.; LAPPIN, D. F. Immune processes in periodontal disease: a review. **Ann Periodontol**, 7, n. 1, p. 62-71, Dec 2002.

KONDO, S.; XIAO, J.-Z.; SATOH, T.; ODAMAKI, T. *et al.* Antiobesity effects of Bifidobacterium breve strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 74, n. 8, p. 1656-1661, 2010.

KOROMANTZOS, P. A.; MAKRILAKIS, K.; DEREKA, X.; KATSILAMBROS, N. *et al.* A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. **J Clin Periodontol**, 38, n. 2, p. 142-147, Feb 2011.

KUMAR, P. S.; LEYS, E. J.; BRYK, J. M.; MARTINEZ, F. J. *et al.* Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. **J Clin Microbiol**, 44, n. 10, p. 3665-3673, Oct 2006.

KURU, B. E.; LALEMAN, I.; YALNIZOGLU, T.; KURU, L. *et al.* The Influence of a Bifidobacterium animalis Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. **J Periodontol**, 88, n. 11, p. 1115-1123, Nov 2017.

KURU, B. E.; LALEMAN, I.; YALNIZOGLU, T.; KURU, L. *et al.* The Influence of a Bifidobacterium animalis Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. **J Periodontol**, 88, n. 11, p. 1115-1123, Nov 2017.

LAHTINEN, S. J.; FORSSTEN, S.; AAKKO, J.; GRANLUND, L. *et al.* **Age**, 34, n. 1, p. 133, 2012.

- LAL, B. K.; SAITO, S.; PAPPAS, P. J.; PADBERG, F. T., Jr. *et al.* Altered proliferative responses of dermal fibroblasts to TGF-beta1 may contribute to chronic venous stasis ulcer. **J Vasc Surg**, 37, n. 6, p. 1285-1293, Jun 2003.
- LARSEN, N.; VOGENSEN, F. K.; VAN DEN BERG, F. W.; NIELSEN, D. S. *et al.* Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **PLoS One**, 5, n. 2, p. e9085, Feb 5 2010.
- LARSSON, L. Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis. **Curr Oral Health Rep**, 4, n. 4, p. 286-293, 2017.
- LE, T. K.; HOSAKA, T.; NGUYEN, T. T.; KASSU, A. *et al.* Bifidobacterium species lower serum glucose, increase expressions of insulin signaling proteins, and improve adipokine profile in diabetic mice. **Biomed Res**, 36, n. 1, p. 63-70, 2015.
- LEBOVITZ, H. E. Insulin: potential negative consequences of early routine use in patients with type 2 diabetes. **Diabetes care**, 34 Suppl 2, p. S225-230, 2011.
- LEE, K.-S.; LEE, S. G.; KIM, E.-K.; JIN, H.-J. *et al.* Metabolic syndrome parameters in adolescents may be determinants for the future periodontal diseases. **Journal of clinical periodontology**, 42, n. 2, p. 105-112, 2015.
- LEE, M. S.; KIM, H. S.; YEON, J. T.; CHOI, S. W. *et al.* GM-CSF regulates fusion of mononuclear osteoclasts into bone-resorbing osteoclasts by activating the Ras/ERK pathway. **J Immunol**, 183, n. 5, p. 3390-3399, Sep 1 2009.
- LEY, R. E.; BÄCKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 31, p. 11070-11075, Aug 2 2005.
- LI, Y.; LU, Z.; ZHANG, X.; YU, H. *et al.* Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. **J Dent Res**, 94, n. 2, p. 362-370, Feb 2015.
- LIGI, D.; CROCE, L.; MOSTI, G.; RAFFETTO, J. D. *et al.* Chronic Venous Insufficiency: Transforming Growth Factor-beta Isoforms and Soluble Endoglin Concentration in Different States of Wound Healing. **Int J Mol Sci**, 18, n. 10, Oct 21 2017.
- LIN, E.; KUO, P. H.; LIU, Y. L.; YANG, A. C. *et al.* Transforming growth factor-beta signaling pathway-associated genes SMAD2 and TGFBR2 are implicated in metabolic syndrome in a Taiwanese population. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 13589, Oct 19 2017.
- LOPEZ, N. J.; QUINTERO, A.; CASANOVA, P. A.; IBIETA, C. I. *et al.* Effects of periodontal therapy on systemic markers of inflammation in patients with metabolic syndrome: a controlled clinical trial. **J Periodontol**, 83, n. 3, p. 267-278, Mar 2012.
- LOURENÇO, T. G. B.; SPENCER, S. J.; ALM, E. J.; COLOMBO, A. P. V. Defining the gut microbiota in individuals with periodontal diseases: an exploratory study. **J Oral Microbiol**, 10, n. 1, p. 1487741, 2018.
- LU, Q.; SAMARANAYAKE, L. P.; DARVEAU, R. P.; JIN, L. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. **Journal of periodontal research**, 40, n. 6, p. 474-481, 2005.
- LUOTO, R.; KALLIOMAKI, M.; LAITINEN, K.; ISOLAURI, E. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. **Int J Obes (Lond)**, 34, n. 10, p. 1531-1537, Oct 2010.

MALDONADO-GÓMEZ, M. X.; MARTÍNEZ, I.; BOTTACINI, F.; O'CALLAGHAN, A. *et al.* Stable Engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the Human Gut Depends on Individualized Features of the Resident Microbiome. **Cell Host Microbe**, 20, n. 4, p. 515-526, Oct 12 2016.

MAMIKUTTY, N.; THENT, Z. C.; SAPRI, S. R.; SAHRUDDIN, N. N. *et al.* The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. **Biomed Res Int**, 2014, p. 263897, 2014.

MARQUES, C.; MEIRELES, M.; NORBERTO, S.; LEITE, J. *et al.* High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. **Adipocyte**, 5, n. 1, p. 11-21, Jan-Mar 2016.

MAYANAGI, G.; KIMURA, M.; NAKAYA, S.; HIRATA, H. *et al.* Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. **Journal of clinical periodontology**, 36, n. 6, p. 506-513, 2009.

MCNULTY, N. P.; YATSUNENKO, T.; HSIAO, A.; FAITH, J. J. *et al.* The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. **Sci Transl Med**, 3, n. 106, p. 106ra106, Oct 26 2011.

MEIKLE, M. C.; ATKINSON, S. J.; WARD, R. V.; MURPHY, G. *et al.* Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. **J Periodontol Res**, 24, n. 3, p. 207-213, May 1989.

MENEZES, R.; GARLET, T. P.; LETRA, A.; BRAMANTE, C. M. *et al.* Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. **J Endod**, 34, n. 8, p. 932-938, Aug 2008.

MENG, H.; BA, Z.; LEE, Y.; PENG, J. *et al.* Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in yogurt reduced expression of TLR-2 on peripheral blood-derived monocytes and pro-inflammatory cytokine secretion in young adults. **Eur J Nutr**, 56, n. 2, p. 649-661, Mar 2017.

MIGLIORANZA SCAVUZZI, B.; MIGLIORANZA, L. H. d. S.; HENRIQUE, F. C.; PITELLI PAROSCHI, T. *et al.* The role of probiotics on each component of the metabolic syndrome and other cardiovascular risks. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, 19, n. 8, p. 1127-1138, 2015/08/03 2015.

MONTEBUGNOLI, L.; SERVIDIO, D.; MIATON, R. A.; PRATI, C. *et al.* Poor oral health is associated with coronary heart disease and elevated systemic inflammatory and haemostatic factors. **Journal of clinical periodontology**, 31, n. 1, p. 25-29, 2004.

MONTERO, E.; LÓPEZ, M.; VIDAL, H.; MARTÍNEZ, M. *et al.* Impact of periodontal therapy on systemic markers of inflammation in patients with metabolic syndrome: A randomized clinical trial. **Diabetes Obes Metab**, 22, n. 11, p. 2120-2132, Nov 2020.

MONTERO, E.; MOLINA, A.; CARASOL, M.; FERNÁNDEZ-MESEGUER, A. *et al.* The association between metabolic syndrome and periodontitis in Spain: Results from the WORALTH (Workers' ORAL health) Study. **J Clin Periodontol**, 48, n. 1, p. 37-49, Jan 2021.

MUÑOZ AGUILERA, E.; SUVAN, J.; BUTI, J.; CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M. *et al.* Periodontitis is associated with hypertension: a systematic review and meta-analysis. **Cardiovasc Res**, 116, n. 1, p. 28-39, Jan 1 2020.

- NARAYAN, K. M. V.; BOYLE, J. P.; GEISS, L. S.; SAADDINE, J. B. *et al.* Impact of recent increase in incidence on future diabetes burden: U.S., 2005-2050. **Diabetes care**, 29, n. 9, p. 2114-2116, 2006.
- NIBALI, L.; TATARAKIS, N.; NEEDLEMAN, I.; TU, Y.-K. *et al.* Clinical review: Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 98, n. 3, p. 913-920, 2013.
- NISSEN, L.; SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; BELIBASAKIS, G. N. Lactobacillus salivarius and L. gasseri down-regulate Aggregatibacter actinomycetemcomitans exotoxins expression. **Annals of microbiology**, 64, p. 611-617, 2014.
- OHNISHI, T.; BANDOW, K.; KAKIMOTO, K.; MACHIGASHIRA, M. *et al.* Oxidative stress causes alveolar bone loss in metabolic syndrome model mice with type 2 diabetes. **Journal of periodontal research**, 44, n. 1, p. 43-51, 2009.
- OLIVEIRA, L. F.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H.; FURLANETO, F. A. *et al.* Benefits of Bifidobacterium animalis subsp. lactis Probiotic in Experimental Periodontitis. **J Periodontol**, 88, n. 2, p. 197-208, Feb 2017.
- OLIVEIRA, L. F. F.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H. F.; FURLANETO, F. A. C. *et al.* Benefits of Bifidobacterium animalis subsp. lactis Probiotic in Experimental Periodontitis. **Journal of periodontology**, 88, n. 2, p. 197-208, 2017.
- OPPERMANN, R. V.; HAAS, A. N.; ROSING, C. K.; SUSIN, C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. **Periodontol 2000**, 67, n. 1, p. 13-33, Feb 2015.
- OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011.
- OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 82, n. 1-4, p. 279-289, Aug 2002.
- PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontology 2000**, 14, p. 9-11, 1997.
- PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; CHINCHOLKAR, S. B. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. **Applied biochemistry and biotechnology**, 162, n. 1, p. 166-180, 2010.
- PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; CHINCHOLKAR, S. B. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. **Appl Biochem Biotechnol**, 162, n. 1, p. 166-180, Sep 2010.
- PLAZA-DÍAZ, J.; FERNÁNDEZ-CABALLERO, J.; CHUECA, N.; GARCÍA, F. *et al.* Pyrosequencing analysis reveals changes in intestinal microbiota of healthy adults who received a daily dose of immunomodulatory probiotic strains. **Nutrients**, 7, n. 6, p. 3999-4015, May 26 2015.
- POLAK, D.; SHAPIRA, L. An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. **J Clin Periodontol**, 45, n. 2, p. 150-166, Feb 2018.
- RAMOS-JUNIOR, E. S.; LEITE, G. A.; CARMO-SILVA, C. C.; TAIRA, T. M. *et al.* Adipokine Chemerin Bridges Metabolic Dyslipidemia and Alveolar Bone Loss in Mice. **J Bone Miner Res**, 32, n. 5, p. 974-984, May 2017.



REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr**, 127, n. 5 Suppl, p. 838s-841s, May 1997.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov 1993.

RICCIA, D. N. D.; BIZZINI, F.; PERILLI, M. G.; POLIMENI, A. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. **Oral diseases**, 13, n. 4, p. 376-385, 2007.

RICOLDI, M. S. T.; FURLANETO, F. A. C.; OLIVEIRA, L. F. F.; TEIXEIRA, G. C. *et al.* Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. **PLoS One**, 12, n. 6, p. e0179946, 2017.

RINTTILA, T.; KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS, L. *et al.* Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **J Appl Microbiol**, 97, n. 6, p. 1166-1177, 2004.

RIZZO, M.; CAPPELLO, F.; MARFIL, R.; NIBALI, L. *et al.* Heat-shock protein 60 kDa and atherogenic dyslipidemia in patients with untreated mild periodontitis: a pilot study. **Cell stress & chaperones**, 17, n. 3, p. 399-407, 2012.

ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; NUCCITELLI, S.; CARNEVALI, P. *et al.* Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of gammadeltaT and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Inflamm Bowel Dis**, 15, n. 10, p. 1526-1536, Oct 2009.

ROY SARKAR, S.; MITRA MAZUMDER, P.; BANERJEE, S. Probiotics protect against gut dysbiosis associated decline in learning and memory. **J Neuroimmunol**, 348, p. 577390, Nov 15 2020.

SANCHEZ-MUNIZ, F. J.; MACHO-GONZALEZ, A.; GARCIMARTIN, A.; SANTOS-LOPEZ, J. A. *et al.* The Nutritional Components of Beer and Its Relationship with Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. **Nutrients**, 11, n. 7, Jul 10 2019.

SÁNCHEZ, B.; DELGADO, S.; BLANCO-MÍGUEZ, A.; LOURENÇO, A. *et al.* Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Mol Nutr Food Res**, 61, n. 1, Jan 2017.

SANZ, M.; MARCO DEL CASTILLO, A.; JEPSEN, S.; GONZALEZ-JUANATEY, J. R. *et al.* Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. **J Clin Periodontol**, 47, n. 3, p. 268-288, Mar 2020.

SEMINARIO-AMEZ, M.; LÓPEZ-LÓPEZ, J.; ESTRUGO-DEVESA, A.; AYUSO-MONTERO, R. *et al.* Probiotics and oral health: A systematic review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 22, n. 3, p. e282-e288, May 1 2017.

SGOLASTRA, F.; PETRUCCI, A.; GATTO, R.; MONACO, A. Efficacy of Er:YAG laser in the treatment of chronic periodontitis: systematic review and meta-analysis. **Lasers in medical science**, 27, n. 3, p. 661-673, 2012.

SHAH, M. P.; GUJJARI, S. K.; CHANDRASEKHAR, V. S. Evaluation of the effect of probiotic (inersan(R)) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, 7, n. 3, p. 595-600, 2013.

- SHARAFEDTINOV, K. K.; PLOTNIKOVA, O. A.; ALEXEEVA, R. I.; SENTSOVA, T. B. *et al.* Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients--a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. **Nutrition journal**, 12, p. 138-138, 2013.
- SHIMAUCHI, H.; MAYANAGI, G.; NAKAYA, S.; MINAMIBUCHI, M. *et al.* Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of clinical periodontology**, 35, n. 10, p. 897-905, 2008.
- SHIN, H. S.; BAEK, D. H.; LEE, S. H. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* on the bioactivity of periodontopathogens. **J Gen Appl Microbiol**, 64, n. 2, p. 55-61, May 21 2018.
- SLIEPEN, I.; VAN DAMME, J.; VAN ESSCHE, M.; LOOZEN, G. *et al.* Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. **Journal of dental research**, 88, n. 11, p. 1026-1030, 2009.
- SLOTS, J.; RAMS, T. E. New views on periodontal microbiota in special patient categories. **Journal of clinical periodontology**, 18, n. 6, p. 411-420, 1991.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. **Journal of periodontology**, 63 Suppl 4, p. 322-331, 1992.
- SPEAKMAN, J.; HAMBLY, C.; MITCHELL, S.; KRÓL, E. The contribution of animal models to the study of obesity. **Lab Anim**, 42, n. 4, p. 413-432, Oct 2008.
- SRIVASTAVA, M. C.; SRIVASTAVA, R.; VERMA, P. K.; GAUTAM, A. Metabolic syndrome and periodontal disease: An overview for physicians. **J Family Med Prim Care**, 8, n. 11, p. 3492-3495, Nov 2019.
- STAAB, B.; EICK, S.; KNOFLER, G.; JENTSCH, H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. **Journal of clinical periodontology**, 36, n. 10, p. 850-856, 2009.
- STAMATOVA, I.; MEURMAN, J. H. Probiotics and periodontal disease. **Periodontology 2000**, 51, p. 141-151, 2009.
- SUSIN, C.; DALLA VECCHIA, C. F.; OPPERMANN, R. V.; HAUGEJORDEN, O. *et al.* Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **J Periodontol**, 75, n. 7, p. 1033-1041, Jul 2004.
- SZKARADKIEWICZ, A. K.; STOPA, J.; KARPINSKI, T. M. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. **Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis**, 62, n. 6, p. 495-500, 2014.
- TAKEMURA, N.; OKUBO, T.; SONOYAMA, K. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. **Exp Biol Med (Maywood)**, 235, n. 7, p. 849-856, Jul 2010.
- TANG, E.; KHAN, I.; ANDREANA, S.; ARANY, P. R. Laser-activated transforming growth factor-beta1 induces human beta-defensin 2: implications for laser therapies for periodontitis and peri-implantitis. **J Periodontal Res**, 52, n. 3, p. 360-367, Jun 2017.
- TARRIDE, J.-E.; LIM, M.; DESMEULES, M.; LUO, W. *et al.* A review of the cost of cardiovascular disease. **The Canadian journal of cardiology**, 25, n. 6, p. e195-202, 2009.

TAUBMAN, M. A.; VALVERDE, P.; HAN, X.; KAWAI, T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. **J Periodontol**, 76, n. 11 Suppl, p. 2033-2041, Nov 2005.

TEUGHEL, W.; DURUKAN, A.; OZCELIK, O.; PAUWELS, M. *et al.* Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. **Journal of clinical periodontology**, 40, n. 11, p. 1025-1035, 2013.

TEUGHEL, W.; LOOZEN, G.; QUIRYNEN, M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? **Journal of clinical periodontology**, 38 Suppl 1, p. 159-177, 2011.

TOMA, I.; MCCAFFREY, T. A. Transforming growth factor-beta and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. **Cell Tissue Res**, 347, n. 1, p. 155-175, Jan 2012.

TOMARO-DUCHESNEAU, C.; SAHA, S.; MALHOTRA, M.; JONES, M. L. *et al.* Effect of orally administered *L. fermentum* NCIMB 5221 on markers of metabolic syndrome: an in vivo analysis using ZDF rats. **Applied microbiology and biotechnology**, 98, n. 1, p. 115-126, 2014.

TOMOSADA, Y.; VILLENA, J.; MURATA, K.; CHIBA, E. *et al.* Immunoregulatory effect of bifidobacteria strains in porcine intestinal epithelial cells through modulation of ubiquitin-editing enzyme A20 expression. **PLoS One**, 8, n. 3, p. e59259, 2013.

TONETTI, M. S.; CHAPPLE, I. L. Biological approaches to the development of novel periodontal therapies--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**, 38 Suppl 11, p. 114-118, Mar 2011.

TORUMTAY, G.; KIRZIOGLU, F. Y.; OZTURK TONGUC, M.; KALE, B. *et al.* Effects of periodontal treatment on inflammation and oxidative stress markers in patients with metabolic syndrome. **J Periodontol Res**, 51, n. 4, p. 489-498, Aug 2016.

TSUBURA, S.; MIZUNUMA, H.; ISHIKAWA, S.; OYAKE, I. *et al.* The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, 28, n. 11, p. 1353-1356, 2009.

TÜRKOĞLU, O.; BARIŞ, N.; TERVAHARTIALA, T.; ŞENARSLAN, Ö. *et al.* Evaluation of systemic levels of neutrophilic enzymes in patients with hypertension and chronic periodontitis. **J Periodontol**, 85, n. 7, p. 908-916, Jul 2014.

TWETMAN, S.; DERAWI, B.; KELLER, M.; EKSTRAND, K. *et al.* Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. **Acta odontologica Scandinavica**, 67, n. 1, p. 19-24, 2009.

VAN DYKE, T. E.; BARTOLD, P. M.; REYNOLDS, E. C. The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. **Front Immunol**, 11, p. 511, 2020.

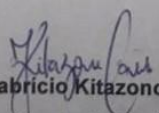
VEIGA, P.; PONS, N.; AGRAWAL, A.; OOZEER, R. *et al.* Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. **Sci Rep**, 4, p. 6328, Sep 11 2014.

VIRTO, L.; CANO, P.; JIMENEZ-ORTEGA, V.; FERNANDEZ-MATEOS, P. *et al.* Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. **J Periodontol**, 89, n. 2, p. 176-185, Feb 2018.

- WANG, J.; TANG, H.; ZHANG, C.; ZHAO, Y. *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **The ISME journal**, 9, n. 1, p. 1-15, 2015.
- WANG, L. X.; LIU, K.; GAO, D. W.; HAO, J. K. Protective effects of two *Lactobacillus plantarum* strains in hyperlipidemic mice. **World J Gastroenterol**, 19, n. 20, p. 3150-3156, May 28 2013.
- WOLFF, L.; DAHLEN, G.; AEPPLI, D. Bacteria as risk markers for periodontitis. **Journal of periodontology**, 65, n. 5 Suppl, p. 498-510, 1994.
- WU, Y. H.; TAYA, Y.; KURAJI, R.; ITO, H. *et al.* Dynamic microstructural changes in alveolar bone in ligature-induced experimental periodontitis. **Odontology**, 108, n. 3, p. 339-349, Jul 2020.
- ZAHRADNIK, R. T.; MAGNUSSON, I.; WALKER, C.; MCDONELL, E. *et al.* Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. **Journal of applied microbiology**, 107, n. 2, p. 682-690, 2009.
- ZENG, L.; DANG, T. A.; SCHUNKERT, H. Genetics links between transforming growth factor beta pathway and coronary disease. **Atherosclerosis**, 253, p. 237-246, Oct 2016.
- ZHANG, C.; DERRIEN, M.; LEVENEZ, F.; BRAZEILLES, R. *et al.* Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. **Isme j**, 10, n. 9, p. 2235-2245, Sep 2016.
- ZHANG, C.; WARD, J.; DAUCH, J. R.; TANZI, R. E. *et al.* Cytokine-mediated inflammation mediates painful neuropathy from metabolic syndrome. **PLoS One**, 13, n. 2, p. e0192333, 2018.
- ZMORA, N.; ZILBERMAN-SCHAPIRA, G.; SUEZ, J.; MOR, U. *et al.* Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. **Cell**, 174, n. 6, p. 1388-1405.e1321, 2018/09/06/ 2018.



## Anexo 1 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</small>		<b>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</b>	
<b>CEUA</b>		<b>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</b>	
<small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>		<small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	
<b>CERTIFICADO CEUA – FORP/USP</b>			
<p>Certificamos que o projeto intitulado “Efeitos da terapia com <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> HN019 na periodontite experimental associada à Síndrome Metabólica. Estudo microtomográfico, histomorfométrico, imunoenzimático e genético em ratos”, Protocolo nº 2017.1.886.58.9, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Michel Reis Messora – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 18/04/2018, com alterações em 15/06/2018.</p>			
Vigência do Projeto	18/04/2018 a 18/04/2020		
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Sprague-Dawley		
Nº de animais	72		
Peso/Idade	3 semanas		
Sexo	Macho		
Origem	Biotério Central – PUSP-RP		
<p>Ribeirão Preto, 15 de junho de 2018.</p>			
<p> <b>Prof. Dr. Fabricio Kitazono de Carvalho</b> Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais</p>			