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

LUIZ FERNANDO FERREIRA DE OLIVEIRA

Efeitos da administração sistêmica de *Bifidobacterium animalis subsp. lacti*s HN019 na periodontite experimental em ratos. Estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico

Ribeirão Preto
2021

LUIZ FERNANDO FERREIRA DE OLIVEIRA

Efeitos da administração sistêmica de *Bifidobacterium animalis subsp. lacti*s HN019 na periodontite experimental em ratos. Estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor no Programa de Periodontia.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Michel Reis Messora

Ribeirão Preto

2021

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Oliveira, Luiz Fernando Ferreira de,

Efeitos da administração sistêmica de *Bifidobacterium animalis subsp. lacti*s HN019 na periodontite experimental em ratos. Estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico. Ribeirão Preto, 2021.
116p.: il; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP - para obtenção do grau de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Messora, Michel Reis

Versão Corrigida

1. Resposta do hospedeiro. 2. Periodontite. 3. Ratos. 4. Imunologia. 5. *Bifidobacterium.*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Luiz Fernando Ferreira de

Título: Efeitos da administração sistêmica de *Bifidobacterium animalis subsp. lacti*s HN019 na periodontite experimental em ratos. Estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor no Programa de Periodontia.

Área de concentração: Periodontia

Aprovado em ___/___/___

PRESIDENTE DA BANCA

Prof. Dr._____

Instituição:_____

BANCA EXAMINADORA

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus,

"Se nada mudar, **invente**, e quando mudar, **entenda**.
Se ficar difícil, **enfrente**, e quando ficar fácil, **agradeça**.
Se a tristeza rondar, **alegre-se**, e quando ficar alegre, **contagie**.
E quando recomeçar, **acredite**. Você pode tudo.
Tudo consegue pelo amor, e pela fé que você tem em **Deus**!"

À minha esposa ***Luíza,***

Amor, há tempos quero expressar a minha gratidão e alegria por estar ao seu lado. Você é uma pessoa maravilhosa, grande companheira, a mulher que eu amo. Passamos por momentos muito difíceis e você demonstrou ser capaz de ultrapassar qualquer obstáculo que surgir em nossas vidas, isso me enche de orgulho. Sem você nada disso seria possível e em nenhum momento a vejo fora do que faço.

"De almas sinceras a união sincera Nada há que impeça: amor não é amor Se quando encontra obstáculos se altera, Ou se vacila ao mínimo temor. Amor é um marco eterno, dominante, Que encara a tempestade com bravura; É astro que norteia a vela errante, Cujo valor se ignora, lá na altura."

(William Shakespeare)

Aos meus filhos ***Samuel e Alice,***

Vocês são meus maiores presente já recebidos, encheram minha vida de alegrias. Com vocês me tornei uma pessoa melhor. Agradeço a vocês que me mostraram o verdadeiro sentido da vida, o amor incondicional e verdadeiro.

"Nasceu-te um filho. Não conhecerás, jamais, a extrema solidão da vida."

(Jorge de Sena)

Aos meus pais ***Carlos*** *e* ***Iraíde,***

Pouco me restam palavras para agradecer tudo que fazem por mim, vocês foram meus primeiros professores, me ensinaram a andar, falar, atravessar uma rua, enfim me ensinaram o viver. Agradeço a vocês que nunca em momento algum deixaram de acreditar em mim, a vocês que sempre estiveram presentes em todos momentos da minha vida, momentos bons e até mesmo momentos ruins. Sou o que sou hoje graças a vocês que me ensinaram a ser uma pessoa de verdade e me mostraram que a maior virtude do ser humano é o caráter. Podem ter certeza de que o meu maior espelho sempre foi vocês. Serei eternamente grato a tudo que vocês sempre fizeram por mim. Muito obrigado meus pais.

Meu amor por vocês transcende qualquer medida...

Aos meus avós **Vanildo** e **Irinéia** (*in memoriam*),

Tamanha é a falta que vocês me fazem. Sempre demonstraram alegria e amor a cada conquista minha. Sei que vocês sempre estiveram perto de mim em todas as vezes que senti alegria e também em momentos de medo e tristeza, vocês são meus anjos da guarda. Muito obrigado vovô e vovó.

Ao meu avô **José** (*in memoriam*),

Palavras me faltam para dizer como foi importante a sua presença em minha vida. Você foi um grande incentivador. Alguém que sempre acreditou em mim e me apoiou em todas as **minhas** decisões. Como você faz falta neste momento, para vibrar mais esta conquista comigo. Mas sinto sua presença sempre comigo, torcendo por mim. Muito obrigado por tudo vovô.

*À minha avó **Nenís**,*

Como é grande a importância que você tem em minha vida. O amor que sinto por você é imensurável, sempre tive de você a maior força e torcida. Muito obrigado por tudo vovó.

Amo vocês...

Aos meus irmãos **Ana Luiza** e **Leandro**,

A vocês dois agradeço pela verdadeira amizade, amizade essa que supera até mesmo momentos de discórdia, sempre demonstrando que o laço que temos é o maior de todos: o de sermos irmãos. Sempre serei grato por tudo que vocês fizeram por mim. Muito obrigado meus irmãos.

"Ser irmão é ser o quê? Uma presença a decifrar mais tarde, com saudade?
Com saudade de quê? De uma pueril vontade de ser irmão futuro, antigo e sempre?"

(Carlos Drummond de Andrade)

Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. **Michel Reis Messora**,

Você tem minha sincera gratidão pelo apoio contínuo ao meu estudo, por sua paciência, motivação e imenso conhecimento.

Meu amigo, você sempre esteve ao meu lado, me mantendo motivado durante esta longa jornada. Suas palavras de incentivo foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Muito além de um professor, você ocupa um lugar especial em minha vida, esteve ao meu lado em momentos de muito significado. Você fez parte de decisões importantes, eu o tive como referência para poder toma-las. Minha admiração por você é enorme.

"Você que reconhece o professor de verdade, eu conheço o mestre da verdade que todo discípulo sonha acompanhar, ouvir, conhecer, aprender e amar."

(Carlos Estrela)

Agradecimentos

A caminhada foi longa e dura, se hoje estou aqui, foi porque me apoiei em ombros fortes. Desta forma, agradeço:

Ao professor **Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza,**
Seriedade, ética e competência...
Valores incorruptíveis que acompanham o Sr. como profissional...
Aprendi muito com o Sr. durante todos estes anos.
Cada conselho vindo do Sr. foi sempre recebido com muito carinho.

Ao professor Dr. **Márcio Grisi,**
Exemplo de profissional de profunda humanidade...
Agradeço pela oportunidade de convívio...
Grande mestre que acrescentou muito em minha formação nestes anos de pós-graduação.

Aos professores do programa de pós-graduação em Periodontia: Prof. Dr. **Mário Taba Júnior,** Profª. Drª. **Daniela Palioto e** Prof. Dr. **Arthur Belém Novaes Júnior,**
Obrigado por tudo que aprendi durante estes anos de convívio, me orgulho muito em ter feito parte da PG Perio FORP/USP, graças a todos vocês.

Aos professores do Centro Universitário de Lavras, em especial ao **Prof. Dr. Douglas Campideli Fonseca,**
Obrigado por participarem diretamente na minha formação, vocês foram minhas primeiras referências. Obrigado por todo incentivo e apoio.

"As palavras são anões. Os exemplos são gigantes!!!"
(Provérbio suíço)

A todos professores colaboradores deste projeto registro aqui meus agradecimentos:

À professora Drª. **Flávia Chaves Furlaneto Messora,**
Obrigado por toda ajuda na elaboração deste artigo. Agradeço também por toda convivência em todos estes anos de pós-graduação e pela oportunidade de ter participado de trabalhos de sua orientação, tudo isso me enriqueceu muito.

Ao professor Dr. **Sérgio Luís Souza Salvador,**
Obrigado pela ajuda em toda parte microbiológica do projeto que foi desenvolvida na Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto-USP, não poderia nunca deixar de agradecer por todos estes anos de ótima convivência que tornaram etapas indispensáveis deste projeto possíveis de serem realizadas. Tenha certeza que aprendi muito com o Sr.

Ao professor Dr. **Edilson Ervolino,**
Obrigado por toda ajuda com as análises imunohistoquímicas que foram realizadas no Departamento de Ciências Básicas da UNESP campus de Araçatuba. Agradeço por toda atenção para comigo durante todos os dias que passei em Araçatuba para a realização das reações imuhistoquímicas. Agradeço, não só pela ajuda, mas também por toda preocupação sempre demonstrada.

Ao professor Dr. **Renato Casarin,**
Obrigado por toda ajuda e atenção com as análises imunoenzimáticas.

A professora Dra. **Luciene Figueiredo,**
Agradeço a Sra. e demais profissionais da Universidade de Guarulhos pela recepção e realização dos exames microbiológicos.

Sou muito grato a todos vocês...

A todos amigos e técnicos que de alguma forma colaboraram com etapas indispensáveis deste projeto, registro aqui meus agradecimentos:

À técnica **Marina Del Arco,**
Agradeço por toda ajuda com o preparo e cultivo do HN019 no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto.

À técnica **Izilvânia Barros,**
Agradeço pela recepção e realização dos exames microbiológicos na Universidade de Guarulhos.

Ao amigo pós-graduando **Pedro Henrique Felix,**
Muito obrigado, meu amigo, por toda convivência e ajuda em todas etapas deste projeto. Você foi um grande contribuinte e um apoio importante durante toda minha pós graduação. Agradeço por toda paciência, atenção e força que prestou nos momentos mais difíceis. Você foi essencial durante toda a jornada. Muito obrigado!

Aos amigos pós-graduandos **Gisele Aparecida da Silva e André Luís Gomes Moreira,** Agradeço a vocês por toda ajuda nas execuções das etapas deste projeto, e igualmente pelo apoio durante toda minha pós graduação. Vocês foram indispensáveis e sou muito grato a vocês.

Aos amigos pós-graduandos **Gustávo Henrique Apolinário, Marcos Invernici, Paula Pessôa, Milla Sprone Tavares,**
A meus amigos e amigas**,** que participaram de etapas indispensáveis para que todos os dados necessários pudessem ser obtidos. A competência, dedicação e carinho foram essenciais nesta etapa da minha vida e serei grato para sempre por isso. Muito obrigado.

As alunas de iniciação científica **Laura Caxeta, Marcela, Marina e Laura Novaes,**
Obrigado por todos os momentos de trabalho e por toda ajuda em todas etapas deste projeto. A ajuda de vocês foi indispensável para toda a conclusão do trabalho. Saibam que aprendi muito com vocês e sou muito grato por tudo.

Aos amigos e amigas das turmas de mestrado e doutorado **Gabriel Bastos, Felipe Dantas, Sergio Lago, Carla Silva, Milena Irie, Camila Costa, Jéssica Carvalho, Cristine D'Almeida, Mariana Salles, Kelly Vargas, Felipe Santos, Umberto Ramos e Carolina Rego,**
Companhias em todos os momentos... Amizades que ficarão distantes, mas serão reais**.** Obrigado pela troca de experiências, pelo convívio, pelas alegrias e incertezas. Obrigado por todos esses momentos vividos e partilhados juntos.

Aos amigos e amigas da UNESP campus Araçatuba **Luan Felipe Toro, Leticia Chaves Ferreira, Fernanda Furuse Ventura dos Santos, Cristian Statkievcz, Tiago Esgalha da Rocha e Luy de Costa,**
Agradeço por toda ajuda na realização das reações de imunohistoquimíca que foram realizadas no laboratório de ciências básicas da UNESP campus Araçatuba, agradeço principalmente pela calorosa e agradável recepção. Saibam que foram dias prazerosos de trabalho ao lado de vocês. Muito obrigado por tudo.

À todos os funcionários da FORP em especial à **Tatiana, Dulce, Daniela, Carla Daniela, Joana, Sebastião, Fabíola e Adriana,**
Obrigado por todo carinho e disponibilidade, vocês tornaram estes anos mais fácil e prazeroso.

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

Resumo

RESUMO

OLIVEIRA, LFF. **Efeitos da administração sistêmica de *Bifidobacterium animalis subsp. lacti*s HN019 na periodontite experimental em ratos. Estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico.** 2021. 116f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Este estudo avaliou os efeitos da administração sistêmica de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (HN019) na periodontite experimental em ratos. 32 ratos foram alocados nos grupos CS, DPS, CS-HN019 e DPS-HN019. No dia 0 do experimento, os animais dos grupos CS-HN019 e DPS-HN019 começaram a administração diariamente de *B. lactis* HN019 na água contendo $1x10^9$ UFC/mL até o final do experimento (28 dias). No dia 14 os animais dos grupos DPS e DPS-HN019 receberam as ligaduras de seda ao redor dos primeiros molares inferiores (PMIs). Todos os animais foram submetidos à eutanásia no dia 28 do experimento. O tecido gengival, soro sanguíneo, hemi-mandíbulas e biofilme bucal foram coletados para avaliação dos seguintes parâmetros: i) microarquitetura óssea e volume ósseo (microtomografia computadorizada por transmissão de raios X – micro-CT); ii) níveis do osso alveolar na área de furca (análise histomorfométrica); iii) microbiota bucal (*checkerboard DNA-DNA hybridization*); iv) expressão de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição (análise imunoenzimática - Multiplex e reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa em tempo real); iii) padrão de imunomarcação para beta defensinas (BD), receptores do tipo *Toll* (TLR) e grupamentos de diferenciação (CD) (reações imunohistoquímicas). O grupo DPS-HN019 apresentou menor porosidade óssea, bem como maior volume ósseo quando comparado ao Grupo DPS ($p < 0,05$). O Grupo DPS-HN019 apresentou menor percentual de espécies semelhantes à *F. periodonticum* e maior percentual de espécies semelhantes à *A. gereneseriae, A.israelli e S. gordonii* quando comparado ao Grupo DPS. Nas análises de parâmetros imunoinflamatórios, no tecido gengival os resultados mostram valores aumentados na razão IL-1b/IL-10, IL-1b/IL-4, GROKC/IL-10, RANKL/OPG no Grupo DPS quando comparado ao grupo DPS-HN019 ($p <0,05$). Nas razões IL-10/TNFα, IL-6/TNFα, MCSF/TNFα, IL-4/ TNFα, TGFβ/TNFα estão reduzidas no grupo DPS quando comparado ao Grupo DPS-HN019 ($p <0,05$). A razão IL-4/TNFα se mostrou aumentada no CS-HN019 quando comparado ao grupo CS ($p <0,05$). No soro os resultados mostram valores aumentados na razão IL-1β/IL-4, IL-1β/IL-10 no soro do Grupo DPS quando comparado ao grupo DPS-HN019 ($p <0,05$). O grupo DPS-HN019 apresentou maior imunomarcação de BDs quando comparado ao grupo DPS ($p <0,05$). Em relação TLR e CD não houve diferença entre os grupos. Os dados histomorfométricos mostram uma menor área sem osso (ASOL) no grupo DPS-HN019 quando comparado ao grupo DPS ($p <0,05$). O uso sistêmico de *B. lactis* HN019 modifica os parâmetros imunoinflamatórios e microbiológicos, promovendo um efeito protetor contra a perda óssea alveolar em ratos com periodontite experimental.

Palavras-chave: Resposta do hospedeiro; Periodontite; Ratos; Imunologia, *Bifidobacterium.*

Abstract

ABSTRACT

OLIVEIRA, LFF. **Effects of systemic administration of Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 in experimental periodontitis in rats. Histological, microtomographic, immunological and microbiological study.** 2021. 116f. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2021.

This study evaluated the effects of systemic administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (HN019) in experimental periodontitis (DP) in rats. 32 rats were allocated to groups CS, CS-HN019, DPS and DPS-HN019. On day 0 of the experiment, the animals in the CS-HN019 and DPS-HN019 groups received daily administration of B. lactis HN019 in water containing $1x10^9$ CFU / mL until the end of the experiment (28 days). On day 14, animals in the DPS and DPS-HN019 groups received silk ligatures around the lower first molars (LFM). All animals were euthanized on day 28 of the experiment. Gingival tissue, blood serum, hemi-mandibles and oral biofilm were collected to assess the following parameters: i) bone microarchitecture and bone volume (X-ray transmission computerized microtomography - micro-CT); ii) alveolar bone levels in the furcation area (histomorphometric analysis); iii) oral microbiota (checkerboard DNA-DNA hybridization); iv) expression of inflammatory cytokines and transcription factors (immunoenzymatic analysis - Multiplex and real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction); iii) immunostaining pattern for beta defensins (BD), Toll-like receptors (TLR) and differentiation clusters (CD) (immunohistochemical reactions). The DPS-HN019 group had lower bone porosity as well as greater bone volume when compared to the DPS group ($p < 0.05$). The DPS-HN019 Group had a lower percentage of species similar to *F. periodonticum* and a higher percentage of species similar to *A. gereneseriae*, *A.israelli* and *S. gordonii* when compared to the DPS Group. In the analysis of immunoinflammatory parameters, in the gingival tissue, the results show increased values in the ratio IL-1β/IL-10, IL-1β/IL-4, GROKC/IL-10, RANKL/OPG in the DPS group when compared to the DPS- group HN019 ($p<0.05$). In the IL-10/TNFα, IL-6/TNFα, MCSF/TNFα, IL-4/ TNFα, TGFβ/TNFα ratios are reduced in the DPS group when compared to the DPS-HN019 group ($p <0.05$). The IL-4/TNFα ratio was increased in CS-HN019 when compared to the CS group ($p < 0.05$). In serum, the results show increased values in the ratio IL-1β/IL-4, IL-1β/IL-10 in the serum of the DPS Group when compared to the DPS-HN019 group ($p <0.05$). The DPS-HN019 group showed higher immunostaining of BDs when compared to the DPS group ($p < 0.05$). In relation to TLR and CD there was no difference between groups. Histomorphometric data show a smaller area without bone (ASOL) in the DPS-HN019 group when compared to the DPS group ($p < 0.05$). The systemic use of B. lactis HN019 modifies immunoinflammatory and microbiological parameters, promoting a protective effect against alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis.

Key words: Host response; periodontitis; Rats; immunology; *Bifidobacterium.*

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental. DP = doença periodontal; PROB = probiótico; d = dias..... **61**

Figura 2 - Posicionamento em mesa operatória e instalação de fio de seda ao redor dos primeiros molares inferiores nos animais dos grupos DPS e DPS-HN019..... **62**

Figura 3 - Medidas volumétricas realizadas na região de bifurcação do 1º molar inferior em cortes microtomográficos visualizados no eixo axial. (**A**) A região de interesse a ser analisada (ROI) foi delimitada por um retângulo que tangenciava as quatro raízes do 1º molar inferior. (**B**) As imagens foram binarizadas para separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (*grayscale threshold* 0-255). Foto cedida por Oliveira (2016)..... **72**

Figura 4 - Imagem ilustrativa da região de bifurcação dos animais para cálculo da Área Sem Osso e Ligamento Periodontal – ASOL (delimitada por linhas vermelhas). Coloração: Hematoxilina e Eosina. CO = crista óssea; JCE Junção cemento esmalte; IE Inserção Conjuntiva; PMI = primeiro molar inferior; SMI = segundo molar inferior; TF = Teto da bifurcação..... **73**

Figura 5 - Proporções médias de 40 espécies bacterianas no biofilme dos animais dos grupos com periodontite experimental e tratados (Grupo DPS-HN019 – linhas azuis) ou não (Grupos DPS – linhas vermelhas) com administração sistêmica de *B. Lactis* HN019. % de contagem de sondas de DNA = porcentagem da contagem de DNA de cada espécie em relação à contagem total de DNA das 40 espécies bacterianas avaliadas. *Diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p < 0,05$)..... **76**

Figura 6- Quantificação de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019* nas amostras de biofilme dos animais dos grupos CS-HN019 e DPS-HN019 antes e após a administração da terapia probiótica. *Diferença significativa entre os grupos (Teste anova seguido de post-hoc de Tukey, $p < 0,05$)..... **77**

Figura 7- Padrão de imunomarcação para BD-1 (A, D, G e J), BD-2 (B, E, H e K) e BD-3 (C, F, I e L) na região de bifurcação do 1º molar inferior nos grupos CS (A-C), CS-HN019 (D-F), DPS (G-I), DPS-HN019 (J-L). Abreviações e símbolos: LP = ligamento periodontal; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original = 1000x. Barras de escala: 25 µm..... **78**

Figura 8 - Padrão de imunomarcação para TLR-2 e TLR-4 no periodonto do primeiro molar inferior (osso alveolar e ligamento periodontal) de ratos submetidos ao tratamento com HN019. Fotomicrografias evidenciando a imunomarcação para TLR2 (A, C, E, G) e TLR4 (B,D,F,H). Grupos CS (A, B), CS-HN019 (C, D), DPS (E, F) e DPS-HN019 (G, H). Abreviações e símbolos: LP = ligamento periodontal; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm..... **79**

Figura 9 - Padrão de imunomarcação para CD4 (A, D, G e J), CD8 (B, E, H e K) e CD57 (C, F, I e L) na região de bifurcação do 1o molar inferior nos grupos CS (A-C), DPS (D-F), CS-HN019 (G-I), DPS-HN019 (J-L). Abreviações e símbolos: LP = ligamento periodontal; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original = 1000x. Barras de escala: 25 µm..... **80**

Figura 10- Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos dos escores atribuídos aos grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019 na análise do padrão de imunomarcação para BD-1 (**A**), BD-2 (**B**) e BD-3 (**C**). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (Kruskal-Wallis, Dumn, p < 0,05)..... **81**

Figura 11 - Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos dos escores atribuídos aos grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019 na análise do padrão de imunomarcação para TLR-2 (A), TLR-4 (B). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (Kruskal-Wallis, Dumn, p < 0,05)..... **82**

Figura 12 - Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos dos escores atribuídos aos grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019 na análise do padrão de imunomarcação para CD-4 (A), CD-8 (B), CD-57 (C). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (Kruskal-Wallis, Dumn, p < 0,05)..... **82**

Figura 13 - Médias, Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de razões de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no tecido gengival atribuídos aos diferentes grupos experimentais, bem como os resultados das comparações entre os grupos.. A) IL1B/IL6, B) IL-1B/IL-10, C) IL-1B/IL-4, D) GROKC/IL-10, E) RANKL/OPG. * Diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, p < 0,05..... **84**

Figura 14 - Médias, Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de razões de citocinas anti-inflamatórias e pro-inflamatórias no tecido gengival atribuídos aos diferentes grupos experimentais, bem como os resultados das comparações entre os grupos. A) IL-10/TNFα, B) IL-6/TNFα, C) MCSF/TNFα, D) IL-4/ TNFα, E) TGFb/TNFα. * Diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, p < 0,05)..... **85**

Figura 15 - Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de razões de citocinas anti-inflamatórias e pro-inflamatórias no soro sanguíneo atribuídos aos diferentes grupos experimentais, bem como os resultados das comparações entre os grupos. A) IL-1B/IL-4, B) IL-1B/IL-10, C) IL-4/TNFα, D) IL-10/TNFα . * Diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, p < 0,05)..... **86**

Figura 16- Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos da expressão gênica de **A**) INF-γ, **B**) IL17 e **C**) FOXP3 nos grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dumn, p < 0,05)..... **87**

Figura 17 - Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais dos grupos CS (**A, B**), CS-HN019 (**C, D**), DPS (**E, F**) e DPS-HN019 (**G, H**). Vista da superfície vestibular externa (**A, C, E e G**). Secção sagital da superfície interna (**B, D, F e H**). CTVox® (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do pixel = 7,96 µm..... **88**

Figura 18 - Médias e desvios-padrão do volume ósseo (A) porosidade óssea (B), espaçamento trabecular (C) e superfície óssea (D), com comparações entre os grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, p < 0,05). VO = volume ósseo; PO = porosidade óssea; Tb.Sp = espaçamento trabecular; Tb.N = número de trabéculas..... **89**

Figura 19 - Tecidos periodontais na região de bifurcação do primeiro molar inferior dos grupos CS (**A, B**), CS-HN019 (**C, D**), DPS (**E, F**) e DPS-HN019 (**G, H**). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x (**A, C, G,** F); 20x (**B, D, F, H**). OA = osso alveolar; TF = teto da bifurcação; setas pretas = vasos sanguíneos; cabeça de seta preta preenchida = osteoblastos; asterisco = fibras colágenas desconexas com a presença de edema intersticial; cabeça de seta branca preenchida = cementoclastos; cabeça de seta não preenchida = fibras colágenas interpostas entre o osso alveolar e o cemento radicular..... **91**

Figura 20- Médias e desvios-padrão da área sem osso (ASO) para os grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019, com comparações entre os grupos. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$)..... **92**

.

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das cepas bacterianas avaliadas na análise microbiológica por meio do *checkerboard DNA-DNA hybridization*..... **64**

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µl	Microlitro
ATCC	*Americam Type Culture Collection*
$C_4H_4O_4$	Ácido maleico
cm	Centímetro
CO_2	Dióxido de carbono
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
et al	*et alia*
GL	°Gay Lussac
EUA	Estados Unidos da América
SP	São Paulo
H&E	Hematoxilina e Eosina
H_2	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
Kg	Quilograma
Kv	Quilovolt
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ms	Milissegundo
N_2	Nitrogênio
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nm	Nanômetro

pg	Picograma
pH	Potencial hidrogiônico
rpm	Rotações por minuto
SSC	Solução salina citratada
RAR	Raspagem e alisamento radicular
B.Lactis	*Bifidobacterium animalis lactis* HN019
IL	Interleucina
COX	Ciclooxigenase
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
FDA	Food and Drug Administration
MMP	Metaloproteinases da matriz
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
PI-3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
GSK-3	Glicogênio sintase quinase-3
TLR	Receptores de reconhecimento de padrões ou receptores do tipo Toll
PAMM	Padrões moleculares associados a microrganismos
NF-κB	Factor nuclear kappa B
ZO-2	Proteína de junção celular
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente
PCR	Reação em cadeia da polimerase
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Fator nuclear kappa beta
L. reuteri	Terapia probiótica
BANA	N-benzoil-DL-argi-nina-2-naftilamida
ON	Óxido nítrico
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócito

RANTES	Células T normais expressas e secretadas, reguladas por ativação
GROKC	Quimioatraente de queratinócitos oncogene regulado pelo gene de crescimento
BD	Beta-defensina(s)
CD	Grupamento de diferenciação
FOXP3	Foxhead box P3
micro-CT	Microtomografia computadorizada
DALYs	Disability-adjusted life year
UNESCO	Organização das Nações Unidas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
VO	Volume Ósseo
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
DO	Densidade óptica
DP	Doença periodontal
PROB	Probiótico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
UFC	Unidades formadoras de colônias
NAM	N-acetil murâmico
ROCHE	Anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina
Mb	Megabases
VOI	Volume de interesse
PO	Porosidade Óssea
Tb.Sp	Espaçamento de trabéculas
Tb.N	Número trabecular
qPCR	Polimerase em tempo real

PBS	Tampão fosfato salino
ELISA	Enzimáticos convencionais
RNA	Ácido ribonucleico
CCI	Coeficiente de correlação intraclasse
ANOVA	Análise de variância
ASOL	Área Sem Osso e Ligamento Periodontal –
CO	Crista óssea
JCE	Junção cemento esmalte
IE	Inserção Conjuntiva
PMI	Primeiro molar inferior
SMI	Segundo molar inferior
TF	Teto da bifurcação
FDA	Food and Drug Administration
E2	Prostaglandina

Lista de Simbolos

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
α	Alfa
<	Menor
®	Marca registrada
=	Igual
±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
+	Mais
δ	Delta

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **40**

2. REVISÃO DE LITERATURA **42**

3. PROPOSIÇÃO **56**

3.1 Objetivo Geral 57

3.2 Objetivos Específicos 57

4. MATERIAL E MÉTODOS **58**

4.1 Modelo experimental 59

4.2 Cálculo do tamanho da amostra 59

4.3 Preparo da cultura bacteriana e administração aos animais 60

4.4 Indução da periodontite experimental 61

4.5 Eutanásia e coleta de material para análises 62

4.6 Avaliação microbiológica 62

4.6.1 Checkerboard DNA-DNA hybridization 63

4.6.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) 65

4.7 Análise imunohistoquímica 67

4.8 Análise imunoenzimática 69

4.9 Análise da expressão gênica 70

4.10 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT) 71

4.11 Análise histomorfométrica e histopatológica 72

4.12 Variáveis de resultado 73

4.13 Análise estatística 73

5. RESULTADOS **75**

5.1 Avaliação microbiológica 76

5.2 Análise imunohistoquímica 77

5.3 Análise imunoenzimática – Tecido gengival 83

5.4 Análise imunoenzimática – Soro 86

5.5 Análise de expressão gênica 87

5.6 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT) 87

5.7 Análise histomorfométrica e histopatológica 89

6. DISCUSSÃO **93**

7. CONCLUSÃO **99**

REFERÊNCIAS **101**

ANEXOS **111**

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma condição altamente prevalente na população mundial e possui um caráter destrutivo dos tecidos de suporte dentário (DARVEAU, 2010; KASSEBAUM et al., 2017). De acordo com dados epidemiológicos, a prevalência das formas severas de periodontite praticamente dobrou nos últimos 25 anos no mundo todo (KASSEBAUM et al., 2017).

O tratamento da periodontite envolve a terapia "padrão-ouro" que é a raspagem e alisamento radicular (RAR). Embora essa terapia seja eficaz em reduzir o número de agentes patogênicos periodontais, é incapaz de obter a sua erradicação completa, predispondo pacientes as recidivas de doenças e à disseminação bacteriana por via sistêmica (MOMBELLI et al., 2000). Dessa forma, diferentes terapias adjuvantes têm sido propostas, especialmente protocolos antimicrobianos têm sido utilizados como recurso adjuvante para melhor controle da doença (FERES et al., 2015; MOMBELLI et al., 2011; MOMBELLI, 2018).

Considerando as limitações da raspagem e alisamento radicular no tratamento da doença periodontal (BEREZOW & DARVEAU, 2011), a recolonização de bolsas periodontais após realização da RAR (QUIRYNEN et al., 2001), a participação de vários mecanismos referentes ao sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro na patogênese da doença e os efeitos colaterais decorrentes do uso sistêmico de antibióticos (seleção de bactérias resistentes e desordens gastrintestinais), o uso de probióticos como uma nova terapia adjuvante para a periodontite tem despertado o interesse da comunidade científica odontológica, desde que os mesmos podem modular a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e modificar o ambiente bacteriano (OLIVEIRA et al. 2017, INVERNICI et al. 2018; INVERNICI et. al 2020).

Nenhum estudo *in vivo* investigou ainda a administração sistêmica de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 (*B.Lactis*) na periodontite em condições normosistêmicas e/ou a ação preventiva desse probiótico. O propósito deste estudo foi avaliar microbiologicamente, histomorfometricamente, microtomograficamente e imunologicamente os efeitos da administração sistêmica de *B. lactis* HN019 em ratos com periodontite experimental.

2. Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

A cavidade bucal é o segundo maior nicho microbiano após o trato gastrointestinal, com mais de 700 espécies bacterianas (DIAZ et al., 2016). Em indivíduos periodontalmente saudáveis, populações microbianas coexistem em equilíbrio com o hospedeiro. A mudança nesse equilíbrio está ligada ao desenvolvimento da periodontite (DIAZ et al., 2016; GRAVES et al., 2019). A periodontite é uma doença inflamatória crônica, que em casos severos, pode levar à perda dentária (GRAVES et al., 2000). Entre as doenças bucais, a doença periodontal ainda é a condição mais prevalente na população mundial (DARVEAU et al., 2010; KASSEBAUM et al., 2017). A prevalência das formas severas de periodontite praticamente duplicou de 1990 a 2015 no mundo todo (KASSEBAUM et al., 2017). Além disso, a doença periodontal não afeta apenas a cavidade bucal. A literatura tem demonstrado fortes ligações da doença periodontal com outras condições inflamatórias crônicas sistêmicas, como a síndrome metabólica (DAUDT et al., 2018; HAJISHENGALLIS, 2015; LAMSTER & PAGAN, 2016), diabetes mellitus (MIGUEL & INFANTE et al., 2018), doença cardiovascular (LOCKHART et al., 2012; TONETTI & VAN DYKE, 2013) e doença de Alzheimer (OLSEN & SINGHRAO, 2015).

De fato, o biofilme bacteriano é o fator etiológico primário para o início da inflamação gengival e subsequente destruição dos tecidos periodontais (SOCRANSKY et al., 1994). Entretanto, a presença isolada do biofilme responde por uma pequena proporção (20%) de variações na expressão da doença periodontal (GROSSI et al., 1994). Esse fato ressalta a importância da resposta do hospedeiro como um dos principais fatores implicados no desenvolvimento da destruição periodontal. Dessa forma, os conceitos atuais demonstram que a disbiose da microbiota bucal associada a uma resposta imunoinflamatória desordenada conduz à destruição dos tecidos periodontais (HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2012; MEYLE & CHAPPLE, 2015). Fatores de risco adquiridos e ambientais (ex.: diabetes mellitus, fumo e estresse), bem como algumas características geneticamente transmitidas (ex.: polimorfismos gênicos para a Interleucina [IL]-1) podem acentuar a resposta inflamatória decorrente da agressão bacteriana e, eventualmente, a suscetibilidade à doença periodontal (SALVI & LANG, 2005).

Reconhecendo a importância da resposta do hospedeiro na patogênese da doença periodontal, novas oportunidades de tratamento são constantemente investigadas como ferramentas adjuvantes às terapias mecânicas de controle do biofilme, com foco no controle da inflamação. Um dos agentes capazes de promover a modulação da resposta do hospedeiro

são os anti-inflamatórios não esteroidais, os quais agem por meio do bloqueio da produção de prostaglandina E2 (SALVI et al., 1997). Porém, os anti-inflamatórios não esteroidais bloqueiam tanto a enzima ciclooxigenase (COX)-1, expressa constitutivamente, quanto a enzima COX-2 induzida por inflamação, ambas responsáveis pela produção de prostaglandina E2 e com diferentes funções fisiológicas (DAY & GRAHAM, 2013). A COX-1, responsável pela síntese constitutiva das prostaglandinas, protege o trato gastrointestinal e afeta a homeostase plaquetária. Dessa forma, o uso crônico dessas substâncias promove complicações, como aumento do sangramento e desordens gastrointestinais. Portanto, o foco de investigações de anti-inflamatórios na Periodontia concentrou-se em inibir apenas COX-2 e poupar COX-1. No entanto, devido a sérios efeitos colaterais indesejados após o uso de inibidores de COX-2, incluindo um risco aumentado de eventos trombóticos cardiovasculares, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, esta linha de investigação na Periodontia estagnou-se (BELLO & HOLT, 2014).

Outra área que foi investigada para modulação da resposta do hospedeiro é a terapia anti-citocina, a qual tem sido usada na medicina para o controle de muitas condições inflamatórias crônicas (GOKHALE & PADHYE, 2013). A maioria desses agentes, anticorpos monoclonais ou proteínas receptoras modificadas, tem como alvo a IL-1 e o fator de necrose tumoral alfa (TNFα). Um desses agentes, Etanercepte® (um antagonista do receptor do TNFα) foi investigado em um modelo animal de periodontite para auxiliar no controle da inflamação, o que resultou em uma redução do infiltrado inflamatório de neutrófilos, dos níveis de óxido nítrico e da apoptose celular (DI PAOLA et al., 2007). No entanto, uma revisão sistemática da literatura relatou evidências limitadas para o uso desses agentes no controle da periodontite (HAN & REYNOLDS, 2012). Um dos principais problemas com a terapia anti-citocina é que uma redundância funcional de citocinas pode permitir que o hospedeiro ative vias alternativas de inflamação se apenas uma citocina específica for alvo de um agente terapêutico. Esses agentes também estão implicados no desenvolvimento de diversos efeitos colaterais (ATZENI F & SARZI-PUTTINI, 2009) e são extremamente caros, limitando, dessa forma, o seu uso como uma ferramenta adjuvante na terapia periodontal atualmente.

As pesquisas atuais para o tratamento das doenças periodontais concentram-se no desenvolvimento de terapias alinhadas com os conceitos que consideram essenciais a existência de inflamação "sob medida" e microbiota simbiótica como sinônimo de saúde bucal. Portanto, métodos químicos e mecânicos para controlar a microbiota bucal e modular a resposta do hospedeiro são combinados para a obtenção de resultados mais promissores. É

importante ressaltar que os patógenos-chave envolvidos na doença periodontal são microrganismos inflamofílicos, ou seja, sua nutrição é favorecida pelo processo inflamatório presente nos tecidos periodontais. Esse fato reforça a teoria que preconiza um controle da inflamação para se obter, consequentemente, um controle da infecção. Portanto, estratégias para prevenir e controlar a periodontite devem restaurar a homeostase entre o microbioma e a resposta do hospedeiro, influenciando a interação de células hospedeiras com patógenos-chave e/ou afetando a resposta imune desencadeada por periodontopatógenos (ALBUQUERQUE-SOUZA et al., 2019).

RAR, um método mecânico de controle da doença, é a terapia de escolha para a maioria dos clínicos e é amplamente considerada o "padrão-ouro" para o tratamento da periodontite. Embora a RAR possa reduzir o número de agentes patogênicos periodontais, é incapaz de obter a sua erradicação completa, predispondo pacientes a recidivas de doenças e à disseminação bacteriana por via sistêmica (MOMBELLI et al., 2000). Esse fato pode ser explicado pela habilidade das bactérias periodontopatogênicas para penetrarem e se instalarem em células epiteliais gengivais, cemento e dentina radicular, escapando assim da reação imunológica do hospedeiro e dos tratamentos mecânicos convencionais (ADRIAENS et al., 1988; TRIBBLE & LAMONT, 2010). A persistência de periodontopatógenos no interior de tecidos moles e duros contribui para a recorrência da periodontite e para a destruição progressiva dos tecidos de suporte dentário (SILVA et al., 2015; GIANNELLI et al., 2018), o que remete o clínico ao uso de terapias químicas, como antimicrobianos, associadas à RAR, para um tratamento efetivo dos pacientes/sítios não responsivos ao tratamento convencional.

Um produto já comercialmente disponível e aprovado para uso clínico pela Food and Drug Administration (FDA) é o Periostat®, o qual é constituído por baixas doses de doxiciclina. Há muito se sabe que as tetraciclinas, além de suas propriedades antibióticas, podem modular as atividades de metaloproteinases da matriz (MMP) derivadas do hospedeiro. Estas últimas participam da patogênese da doença periodontal promovendo a destruição de colágeno nos tecidos periodontais (RYAN & GOLUB, 2000). Mais recentemente, a literatura tem demonstrado resultados promissores decorrentes do uso do antibiótico macrolídeo azitromicina no tratamento da periodontite. É importante destacar que a azitromicina não possui apenas efeitos antibacterianos, mas também exerce propriedades anti-inflamatórias consideráveis (BARTOLD et al., 2013), o que a torna um método químico que tem ação nas duas principais vertentes que conduzem a patogênese das doenças periodontais: microbiota e resposta imunoiflamatória (HIRSCH et al., 2012). Uma revisão

sistemática com metanálise concluiu que o uso adjuvante da azitromicina promove efeitos adicionais na terapia periodontal não-cirúrgica, reduzindo profundidade de sondagem e sangramento à sondagem, bem como promovendo maior ganho de inserção clínica em bolsas profundas (ZHANG et al., 2015). Apesar desses resultados encorajadores, deve-se ter cautela no uso da azitromicina, uma vez que a mesma pode alterar permanentemente a composição do microbioma hospedeiro em outros locais do corpo humano (trata-se de um antibiótico e, portanto, bactérias patogênicas e comensais são atingidas por suas ações) (RAY & MURRAY, 2012). Além disso, o uso desse macrolídeo tem sido associado a um risco aumentado de morte em pacientes que apresentam maior susceptibilidade para doenças cardiovasculares (RAY & MURRAY, 2012). É importante destacar ainda a associação entre o uso de antibióticos e o surgimento de bactérias resistentes. O surgimento mundial de resistência a agentes antibacterianos é um problema crescente que torna urgente a necessidade de tratamentos alternativos para combater infecções bacterianas (HUOVINEN, 2001).

Considerando as limitações da RAR no tratamento da doença periodontal (BEREZOW & DARVEAU, 2011), a recolonização de bolsas periodontais após realização da RAR (QUIRYNEN et al., 2001), a participação de vários mecanismos referentes ao sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro na patogênese da doença e os efeitos colaterais decorrentes do uso sistêmico de antibióticos (seleção de bactérias resistentes e desordens gastrointestinais), o uso de probióticos como uma nova terapia adjuvante para a periodontite tem despertado o interesse da comunidade científica odontológica, desde que os mesmos podem modular a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e modificar o ambiente bacteriano. Na era pós-genômica, as novas metodologias de sequenciamento em larga escala, como metagenômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, estão permitindo a identificação de genes, RNA, proteínas e metabólitos capazes de auxiliarem na elucidação dos mecanismos pelos quais bactérias produtoras de ácido lático ajudam a manter a saúde humana, bem como as numerosas funções atribuídas a essas espécies.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, principalmente bactérias, seguros para o consumo e capazes de produzirem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades suficientes (HILL et al., 2014). Os microrganismos probióticos fornecem nutrientes, ajudam o hospedeiro a digerir alimentos, competem por espaço e nutrientes com patógenos potenciais e, também, participam da resposta imunoinflamatória do hospedeiro, uma vez que podem induzir a secreção de peptídeos antimicrobianos ou moléculas anti-inflamatórias por meio de uma interação com

diversas populações celulares (VUOTTO et al., 2014; TEITELBAUM & WALKER, 2002; PATEL & DENNING, 2013).

Os mecanismos de ativação da resposta imunitária da mucosa são iniciados por bactérias comensais. Essas últimas, em larga escala, podem também aumentar o risco de inflamação. Portanto, a resposta imunoinflamatória da mucosa para a microbiota presente necessita de um mecanismo regulador preciso. Neste contexto, a mucosa desenvolveu diversos mecanismos reguladores e anti-inflamatórios especializados para eliminar ou tolerar antígenos não perigosos, alimentos, aerossóis e microrganismos comensais (TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 2004), entre eles: defesa inata fortemente desenvolvida que assegura função adequada da barreira, existência de linfócitos especializados e presença de receptores para imunoglobulinas poliméricas (TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 2004).

As proteínas extracelulares de bactérias probióticas podem se difundir através da mucosa e interagir com células epiteliais e imunológicas. Como consequência dessa interação, um sinal é transmitido ao núcleo celular por meio de diferentes caminhos, envolvendo a ação de várias quinases, tais como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfoinositídeo 3-quinase (PI-3K) e glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) (HOARAU et al., 2008). Essas proteínas regulam certas vias e respostas celulares, incluindo a secreção de diferentes moléculas efetoras, como quimiocinas, citocinas e peptídeos antibacterianos (defensinas). Dessa forma, a resposta imunológica do hospedeiro pode ser modulada e a função de barreira do epitélio e da mucosa e pode ser potencializada pelo rearranjo das junções celulares (SÁNCHEZ et al., 2010). Participam, também, desses mecanismos os receptores de reconhecimento de padrões ou receptores do tipo Toll (TLR), os quais estão presentes em diversas populações de células responsáveis pela imunidade inata. Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados a microrganismos (PAMM). Os PAMM são estruturas comuns conservadas evolutivamente e essenciais para sobrevivência dos microrganismos. Quando há a interação PAMM-TLR ocorre liberação de sinais intracelulares que culminam na indução da transcrição de genes importantes para a ativação celular ou a indução da fagocitose (KAWAI & AKIRA, 2006; WALKER, 2008).

Os mecanismos exatos pelos quais as bactérias probióticas promovem seus efeitos não são totalmente compreendidos. Os probióticos têm a capacidade de atenuar a ativação do factor nuclear kappa B (NF-κB), de promover a super expressão de genes citoprotetores, de prevenir a apoptose e morte celular, de gerar espécies reativas de oxigênio importantes para a sinalização celular e de induzir a expressão de proteínas necessárias para a função de barreira da mucosa (PATEL & DENNING, 2013; BRON et al., 2011). Uma expressão aumentada de

ZO-2, uma proteína de junção celular, tem sido observada após a administração do probiótico Escherichia coli Nissle 1917 (ZYREK et al., 2007; UKENA et al., 2007).

É importante destacar que a resposta do hospedeiro é dependente da cepa utilizada, uma vez que a resposta imunológica está ligada ao tipo de proteína e ao perfil de glicose e carboidratos presentes na parede plasmática bacteriana, ao conteúdo de oligodesoxinucleotídeo presente no DNA bacteriano e aos metabólitos e outras moléculas produzidas pelo microrganismo probiótico (MORTAZ et al., 2013). De forma geral, acredita-se que os efeitos benéficos dos probióticos fundamentam-se, em parte, na capacidade de regular a produção de citocinas (anti e pró-inflamatórias) e de equilibrar os tipos de respostas de células T (MORTAZ et al., 2013; CROSS et al., 2004; GHADIMI et al., 2008).

Estudos pré-clínicos validados, tais como o uso de modelos animais com periodontite experimental, podem proporcionar novos dados importantes sobre a segurança e eficácia de probióticos (HOFFMAN et al., 2008), especialmente quando novas cepas estão sendo investigadas para o tratamento periodontal. Um microrganismo probiótico que desempenha benefícios à saúde do hospedeiro no ambiente intestinal pode não ser considerado um probiótico no ambiente bucal. Os estudos pré-clínicos realizados até o momento avaliaram os efeitos de bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, bem como de leveduras (*Sacharomyces cerevisiae*), na periodontite experimental.

Teughels et al. (2007), em seu estudo de prova de conceito, demonstraram que a irrigação de bolsas periodontais de cães com as bactérias *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis* logo após a RAR promoveu um atraso na recolonização por periodontopatógenos e reduziu a inflamação periodontal.

Bactérias do gênero *Bacillus* foram avaliadas em 3 estudos utilizando modelos de periodontite experimental (FOUREAUX et al., 2014; MESSORA et al., 2016; MESSORA et al., 2013). Esses estudos avaliaram os efeitos dos probióticos *Bacillus subitilis* e *Bacillus licheniformis* na doença periodontal induzida por ligadura em ratos. Os animais que receberam os microrganismos probióticos apresentaram menor perda de inserção e menor perda de osso alveolar quando comparados aos animais que não consumiram probióticos. Um achado interessante desse estudo foi o efeito da periodontite experimental no ambiente intestinal. Os animais com periodontite experimental e que não receberam probióticos apresentaram vilosidades do jejuno encurtadas e danificadas. Nos animais que consumiram probióticos, essas alterações estavam ausentes ou em menor magnitude. Foureaux et al. 2014 demonstraram que *B. subitilis* e *B. licheniformis* podem reduzir o número de células inflamatórias nos tecidos periodontais de ratos com doença periodontal induzida por ligadura

e submetidos ao estresse crônico por contenção física. É importante ressaltar que o estresse pode alterar a resistência dos tecidos periodontais por mecanismos endócrinos, resultando, principalmente, em aumento dos níveis de catecolaminas e corticosteroides, microcirculação reduzida na gengiva, redução do fluxo salivar e funcionamento anormal de células inflamatórias de defesa (neutrófilos e linfócitos), o que facilita a invasão bacteriana e os danos aos tecidos bucais. Messora et al. 2016 demonstraram que bactérias do gênero *Bacillus* podem ser uma potencial estratégia adjuvante no tratamento não cirúrgico da periodontite. Nesse estudo, ratos com doença periodontal induzida por ligadura foram tratados com RAR associada ou não à administração de *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Os animais que receberam a terapia mecânica e probiótica, quando comparados aos animais que receberam apenas a terapia mecânica, apresentaram menores perda de osso alveolar e de inserção conjuntiva, bem como número reduzido de células positivas para fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e menores escores referentes ao padrão de imunomarcação de citocinas pró-inflamatórias presentes nos tecidos periodontais.

Maekawa e Hajishengallis (2014) induziram periodontite em camundongos. Enquanto no grupo teste a doença foi tratada por meio de administrações tópicas de *Lactobacillus brevis*, no grupo controle foi administrada uma solução placebo. Os animais do grupo teste apresentaram menor perda óssea, menor expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-17) nos tecidos gengivais, maior contagem de microrganismos aeróbios e menor contagem de microrganismos anaeróbios quando comparados àqueles do grupo controle.

Garcia et al. (2016) avaliaram os efeitos da administração tópica de *Sacharomyces cerevisiae* como monoterapia ou como terapia adjuvante à RAR em ratos com doença periodontal induzida por ligadura. A doença periodontal experimental foi induzida por meio da colocação de ligaduras ao redor dos primeiros molares de 72 ratos. Após 7 dias, as ligaduras foram removidas e os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: grupo C (nenhum tratamento foi realizado), grupo SRP (foi realizada RAR), grupo PRO (foi realizada irrigação subgengival com probiótico) e grupo SRP/PRO (foi realizada RAR e irrigação subgengival com probiótico). Os animais foram submetidos à eutanásia aos 7, 15 ou 30 dias. Foram avaliadas as características histológicas dos tecidos periodontais, bem como o nível de perda óssea alveolar, número de células TRAP-positivas e padrão de imunomarcação para TNF-α, IL-1β e IL-10. Os autores concluíram que o uso local de probióticos não resultou em qualquer efeito adverso para os tecidos periodontais. Quando usados como monoterapia ou

como um recurso adjuvante à RAR, os microrganismos *Sacharomyces cerevisiae* foram efetivos para controlar a periodontite em ratos.

Considerando que contagens de espécies de *Bifidobacterium* no ambiente bucal podem estar associadas a saúde periodontal e ao progresso do tratamento em pacientes com periodontite (HOJO et al., 2007), OLIVEIRA et al. (2016) investigaram os efeitos da administração tópica de *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (*B. lactis*) HN019 na periodontite experimental em ratos. As análises microtomográficas realizadas demonstraram que os animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados por meio de irrigações subgengivais com microrganimos probióticos (grupo teste) apresentaram menores porosidade óssea, separação de trabéculas ósseas e perda de inserção conjuntiva, bem como maior volume ósseo que os animais que receberam irrigações subgengivais com uma solução sem probióticos (grupo controle). No grupo teste, as amostras de biofilme coletadas apresentaram maiores proporções de espécies semelhantes a *Actinomyces* e *Streptococcus* (espécies compatíveis com saúde periodontal), bem como menores proporções de espécies semelhantes à *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens* e *Prevotella intermedia* (espécies envolvidas na patogênese da periodontite) quando comparadas àquelas do grupo controle. As análises de amostras de biofilme por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) também confirmaram a presença da cepa probiótica HN019 nos animais do grupo teste. Considerando o perfil imunoinflamatório dos animais, o grupo teste apresentou maior expressão de osteoprotegerina (OPG) e de betadefensinas, bem como menores níveis de IL-1β e do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta (RANKL) nos tecidos gengivais quando comparado ao grupo controle.

Os estudos clínicos realizados até o momento investigaram os efeitos de probióticos, principalmente como terapia adjuvante, no tratamento da periodontite, administrados por meio de pastilhas, comprimidos, enxaguatórios bucais ou soluções para irrigação subgengival. Em alguns estudos clínicos, foram relatados resultados positivos dos efeitos adjuvantes da terapia probiótica, administrada por meio de pastilhas ou comprimidos, após a realização da raspagem e alisamento radicular no tratamento da doença periodontal (TEUGHELS et al., 2013; VIVEKANANDA et al., 2010; TEKCE et al., 2015). VIVEKANANDA et al. (2010) avaliaram os efeitos adjuvantes de *Lactobacillus reuteri* à RAR em pacientes com periodontite crônica. Os autores concluíram que o uso de probióticos pode ser recomendado durante a terapia não cirúrgica e na fase de manutenção do tratamento periodontal, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e inibitórios na formação da placa bacteriana. Esses resultados foram corroborados por Teughels et al. (2013), os quais demonstraram que o

uso de *L. reuteri*, como adjuvante à RAR, reduziu o risco de progressão da doença periodontal e o percentual de pacientes, dentes e sítios indicados para a terapia periodontal cirúrgica. Shah et al. (2013) avaliaram os efeitos do probiótico *Lactobacillus brevis* e da doxiciclina, isoladamente ou em associação, no tratamento de pacientes com periodontite agressiva. Os autores concluíram que a terapia com probióticos pode ser uma boa alternativa para o uso de antibióticos no tratamento dessa condição periodontal. Ince et al. (2015) avaliaram os efeitos clínicos e bioquímicos resultantes do uso da terapia probiótica (*L. reuteri*) adjuvante à RAR no tratamento de pacientes com periodontite crônica. A terapia combinada proporcionou maior redução de profundidade de sondagem e maior ganho de inserção clínica aos 12 meses pós operatórios quando comparada ao uso da RAR isoladamente. Os pacientes tratados com a terapia combinada também apresentaram menores níveis de MMP-8 e aumento de inibidor de MMP no fluido crevicular gengival. Tekce et al. (2015) demonstraram que a utilização do *Lactobacillus reuteri* adjuvante à RAR pode retardar a recolonização de bolsas periodontais em pacientes com periodontite crônica.

O uso de microrganismos probióticos em enxaguatórios bucais e em soluções para irrigação subgengival também proporcionou resultados satisfatórios como terapia adjuvante no tratamento da periodontite crônica (PENALA et al., 2016; TSUBURA et al., 2009). Penala et al. (2016) realizaram um estudo clínico controlado envolvendo 32 pacientes com periodontite crônica. Após a realização de RAR, os indivíduos foram aleatoriamente alocados nos grupos teste ou controle. Os indivíduos do grupo teste receberam 4 irrigações subgengivais e enxaguatórios bucais com *Lactobacillus salivarius* e *L. reuteri* durante 15 dias. No grupo controle, os indivíduos receberam irrigação subgengival e enxaguatórios bucais sem probióticos (placebo). O grupo teste, aos 3 meses pós operatórios, apresentou índice de placa, índice gengival modificado e índice de sangramento significativamente melhores que aqueles do grupo controle. Considerando as bolsas periodontais moderadas, uma maior redução de profundidade de sondagem foi observada no grupo teste quando comparado ao grupo controle. Os indivíduos tratados com probióticos também apresentaram maior redução microbiológica avaliada pelo teste do N-benzoil-DL-argi-nina-2-naftilamida (BANA) quando comparados àqueles que não consumiram probióticos. Tsubura et al. (2009) avaliaram os efeitos adjuvantes de enxaguatórios bucais contendo *B. subtilis* no tratamento da periodontite crônica. Nesse estudo clínico controlado aleatorizado, os indivíduos foram tratados com RAR e fizeram uso de um enxaguatório contendo ou não probióticos do gênero *Bacillus* durante 30 dias. Os autores demonstraram que os indivíduos que fizeram uso da solução contendo

microrganismos probióticos apresentaram escores do teste BANA significativamente menores do que aqueles que fizeram uso da solução placebo.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos adjuvantes de bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium* no tratamento não cirúrgico da periodontite em um estudo clínico controlado aleatorizado (INVERNICI et al., 2018). Neste estudo, 41 pacientes com periodontite generalizada foram tratados com terapia probiótica associada à RAR (Grupo Teste) ou apenas RAR (Grupo Controle). Os pacientes do Grupo Teste consumiram pastilhas, 2 vezes ao dia, contendo 10^9 UFC de *B. lactis* HN019 durante 4 semanas, iniciando o consumo logo após o término do tratamento periodontal não cirúrgico. Os pacientes do Grupo Controle receberam pastilhas placebo (sem probiótico). Foram avaliados parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos no início do estudo (baseline), bem como aos 30 e 90 dias após o tratamento periodontal não cirúrgico. Na avaliação dos parâmetros clínicos periodontais, o Grupo Teste apresentou menor quantidade de bolsas periodontais moderadas e profundas que o Grupo Controle, bem como menor quantidade de pacientes apresentando 3 ou mais sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 6 mm ou profundidade de sondagem igual a 5 mm e sangramento à sondagem positivo, o que denota menos risco de progressão da doença periodontal e menor necessidade de tratamento periodontal adicional (cirurgias periodontais, por exemplo) nos pacientes tratados com RAR e terapia probiótica. Enquanto 58% das bolsas do Grupo Teste, diagnosticadas no baseline com valores de profundidade de sondagem maior ou igual a 7 mm, foram reduzidas para valores de profundidade de sondagem menor ou igual a 3 mm aos 90 dias, apenas 22,2% das bolsas profundas do Grupo Controle foram reduzidas dessa forma. Na análise microbiológica, o Grupo Teste apresentou proporções significativamente menores de espécies microbianas dos complexos vermelho e laranja (periodontopatógenos), bem como maiores proporções de espécies do complexo azul (espécies compatíveis com saúde) quando comparado ao Grupo Controle. Na análise imunológica, o Grupo Teste apresentou menor razão (valores ajustados ao baseline) de citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular gengival do que o Grupo Controle. Apenas o Grupo Teste apresentou valores de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, significativamente maiores que aqueles do baseline aos 30 dias. Foi observado ainda que o tecido gengival dos pacientes do Grupo Teste apresentou maiores expressões de beta defensina, um peptídeo antimicrobiano importante para a proteção dos tecidos periodontais, quando comparado ao Grupo Controle aos 30 dias. Esses achados demonstram a interação da bactéria probiótica com os tecidos gengivais dos pacientes tratados, fortalecendo a barreira epitelial contra as agressões microbianas para a promoção de um estado imunoinflamatório

vigilante e compatível com saúde (Invernici et al., 2018). Em outro estudo de Invernici et al. (2020) com trinta pacientes recrutados e divididos em dois grupos: o grupo Teste (RAR + Probiótico, n = 15) ou Controle (RAR + Placebo, n = 15). O grupo teste apresentou menor índice de placa (30 dias) e menor sangramento gengival marginal (90 dias) quando comparado ao grupo controle. Expressões mais altas de BD-3, TLR4 e CD-4 foram observadas nos tecidos gengivais no grupo Teste do que no grupo Controle. *B. lactis* HN019 reduziu a adesão de *P. gingivalis* a células epiteliais orais e apresentou potencial antimicrobiano contra periodontopatógenos.

Até o presente momento, a maioria dos estudos clínicos investigou os efeitos de probióticos no tratamento da periodontite (INVERNICI et al., 2018; TINOCO et al., 2019; AKRAM et al., 2019; TEUGHELS et al., 2013; VIVEKANANDA et al., 2010; SHAH et al., 2013; ÍNCE et al., 2015; TEKCE et al., 2015; PENALA et al., 2016; TSUBURA et al., 2009). Seu mecanismo de ação foi avaliado em situações de doença já instalada. Os potenciais efeitos preventivos dessa terapia no desenvolvimento de doença periodontal foram pouco explorados. Lee et al. 2015, usando um modelo de gengivite experimental proposto por Löe et al. em 1965, demonstraram que o consumo de *L. brevis* CD2 antes da interrupção dos procedimentos de higiene bucal diminuiu a formação de óxido nítrico (ON) nos tecidos gengivais, atrasando o desenvolvimento da gengivite. De fato, a redução de ON é capaz de atenuar o desenvolvimento da gengivite, agindo como um modulador da resposta imunológica do hospedeiro (Paquette et al., 2006). Um efeito semelhante em termos de modulação da resposta do hospedeiro foi demonstrado por Staab et al., 2009. Os autores avaliaram os efeitos preventivos de *Lactobacillus casei* no desenvolvimento da gengivite. Nesse estudo, os indivíduos que consumiram o probiótico antes da interrupção dos procedimentos de higiene bucal (modelo de gengivite experimental) apresentaram, no fluido crevicular gengival, menores níveis de elastase e de MMP-3, os quais são importantes marcadores inflamatórios envolvidos na degradação dos tecidos periodontais. Yuki et al., 2019 sugeriram que o consumo regular de leite bovino fermentado com *Lactobacillus rhamnosus* L8020 pode reduzir o risco de doença periodontal em indivíduos com deficiência intelectual, os quais apresentam dificuldades na adesão de bons protocolos de higiene bucal. Kuru et al. (2017) concluíram que o uso iogurte suplementado com probiótico *B. lactis* DN173010 pode ter um efeito positivo no acúmulo de placa bacteriana e nos parâmetros inflamatórios gengivais em indivíduos que abstiveram-se das práticas de higiene bucal (modelo de gengivite experimental).

No que se refere aos efeitos preventivos de probiótico na perda óssea alveolar, há uma escassez de estudos pré-clínicos (FOUREAUX et al., 2014; MESSORA et al., 2016; MESSORA et al., 2013; GATEJ et al 2017; CARDOSO et al., 2020). Messora et al. (2016) observaram que o consumo prévio de *B. subtilis* and *B. licheniformis* minimizou os danos promovidos pela periodontite induzida experimentalmente em ratos. Animais que consumiram a terapia probiótica antes da indução da periodontite apresentaram volume ósseo na região de bifurcação aproximadamente 50% maior que aqueles de animais não tratados previamente com probióticos. Gatej et al. (2017) investigaram o papel de *L. rhamnosus* na perda óssea alveolar e inflamação local e sistêmica em camundongos com periodontite experimental. A doença periodontal experimental foi induzida por inoculação oral com *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* por um período de 44 dias. O probiótico *L. rhamnosus* foi administrado por inoculação oral ou gavagem oral antes e durante a indução da doença. Os autores observaram que a administração probiótica previamente à indução da doença periodontal via gavagem oral ou via inoculação oral reduziu significativamente a perda óssea alveolar e a inflamação gengival. Cardoso et al. (2020) avaliaram os efeitos da administração sistêmica do probiótico B. lactis HN019 (HN019) no desenvolvimento da periodontite induzida por ligadura em ratos com artrite reumatóide experimental. Foi observado que administração sistêmica prévia de *B. lactis* HN019 promoveu efeito protetor contra a destruição do tecido periodontal, diminuindo a perda óssea, modulado mediadores inflamatórios e aumentando a proporção de bactérias compatíveis com a saúde periodontal.

Embora a literatura apresente resultados promissores, é importante considerar que os achados obtidos com probióticos não podem ser generalizados (TEUGHELS et al., 2011), uma vez que eles são dependentes da cepa, dosagem, frequência e forma de administração usadas. Diferentemente dos resultados obtidos em estudos clínicos que utilizaram *L. reuteri* e *L. brevis* (TEUGHELS et al., 2013; VIVEKANANDA et al. 2010; TEKCE et al., 2015), não foram observadas vantagens clínicas decorrentes do uso de *L. rhamnosus* e bactérias do gênero *Streptococcus* como adjuvante à RAR no tratamento de pacientes com periodontite crônica (LALEMAN et al., 2015; MORALES et al., 2016). A utilização de *L. casei* como monoterapia também não proporcionou benefícios clínicos em indivíduos com periodontite crônica generalizada (IMRAN et al., 2015).

Considerando que i) a doença periodontal possui um caráter imunoinflamatório polimicrobiano, ii) as atuais abordagens preventivas/terapêuticas para periodontite deveriam considerar uma combinação de ações antimicrobiana e anti-inflamatória, iii) probióticos

podem modular a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e a constituição do seu microbioma, reduzindo o risco de desenvolvimento e gravidade das doenças periodontais, iv) os efeitos de probióticos são cepa-dependentes, v) poucos estudos pré-clínicos avaliaram os efeitos preventivos de probióticos na perda de osso alveolar, o objetivo desse estudo foi avaliar se o consumo prévio do probiótico *B. Lactis* HN019 pode alterar a susceptibilidade do hospedeiro no desenvolvimento da periodontite. É importante destacar que nenhum estudo ainda avaliou os efeitos preventivos decorrentes do uso sistêmico de *B. Lactis* HN019 na perda de osso alveolar. Essa abordagem investigativa é importante para o estabelecimento de novas estratégias preventivas para as doenças periodontais, uma vez que a prevalência das formas severas de periodontite praticamente dobrou de 1990 a 2015 no mundo todo (KASSEBAUM et al., 2017). O número de pessoas com condições bucais não tratadas no planeta aumentou de 2,5 bilhões em 1990 para 3,5 bilhões em 2015, com aumento de 64% nos indicadores DALYs (disability-adjusted life year). Maiores esforços e abordagens potencialmente diferentes são necessárias se o objetivo das políticas voltadas para saúde bucal é reduzir o nível de doenças bucais e minimizar seu impacto até 2020 (KASSEBAUM et al., 2017).

3. Proposição

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da administração sistêmica de *B. lactis* HN019 na prevenção e desenvolvimento da periodontite experimental induzida por ligadura em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar em ratos, com ou sem periodontite experimental, tratados ou não com *B. Lactis* HN019:

- Microbiota presente em amostras de placa bacteriana por meio de checkerboard DNA-DNA hybridization e identificação de *B. lactis* HN019 por qPCR;
- Expressão de citocinas pró-inflamatorias IL-1β, TNF-α, fator estimulador de colônias de macrófagos M-CSF, RANK-L. Quimioatraente de queratinócitos oncogene regulado pelo gene de crescimento GROKC e anti-inflamatórias IL-10, IL-4, IL-6, fator de crescimento transformador beta (TGF-β e Osteoprotegerina OPG por meio de imunoensaios enzimáticos LuminexTM xMAP®) de tecido gengival e soro;
- Expressão de beta defensina BD-1, BD-2, BD-3, TLR-2, TLR-4, grupamento de diferenciação CD-4, CD-8 e CD-57 nos tecidos periodontais por meio de reações imunohistoquímicas;
- Expressão gênica de IL-17, INF-γ e foxhead box P3 (FOXP3) nos tecidos periodontais por meio de Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa em Tempo Real (qRT-PCR);
- Perda óssea alveolar por meio de análise histomorfométrica e análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT);
- Conteúdo do infiltrado inflamatório periodontal, extensão da inflamação, padrão do tecido conjuntivo e perfil do osso alveolar presente na região de bifurcação do 1º molar inferior por meio de análise histopatológica.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Modelo experimental

A pesquisa foi realizada respeitando-se os princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivissecção dos mesmos (Lei 11.794/2008), a Declaração Universal dos Direitos dos Animais da UNESCO (Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e a legislação em vigor (Lei 9605/1998). Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP) (Protocolo 13.1.136.53.5).

Foram utilizados 32 ratos, machos (*Rattus norvegicus*, *albinus,* Wistar), com idade entre 3 e 4 meses, pesando entre 250 e 300g (Biotério da FORP-USP). Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno autoclaváveis e submetidos a um período de 7 dias de aclimatação com o ambiente e com equipe de execução do projeto. A sala foi climatizada a uma temperatura de 22 ± 2°C e com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Antes do estudo começar, os ratos foram identificados por um código numérico. De acordo com uma tabela numérica gerada com uso de um *software* em computador, cada rato foi alocado em um dos seguintes grupos:

- **Grupo CS** – ratos sem doença periodontal induzida por ligadura e sem administração de probiótico;
- **Grupo CS-HN019** – ratos sem doença periodontal induzida por ligadura e com administração sistêmica de *B. Lactis HN019*;
- **Grupo DPS** – ratos com doença periodontal induzida por ligadura e sem administração de probiótico;
- **Grupo DPS-HN019** – ratos com doença periodontal induzida por ligadura e com administração sistêmica de *B. Lactis HN019*.

4.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do 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

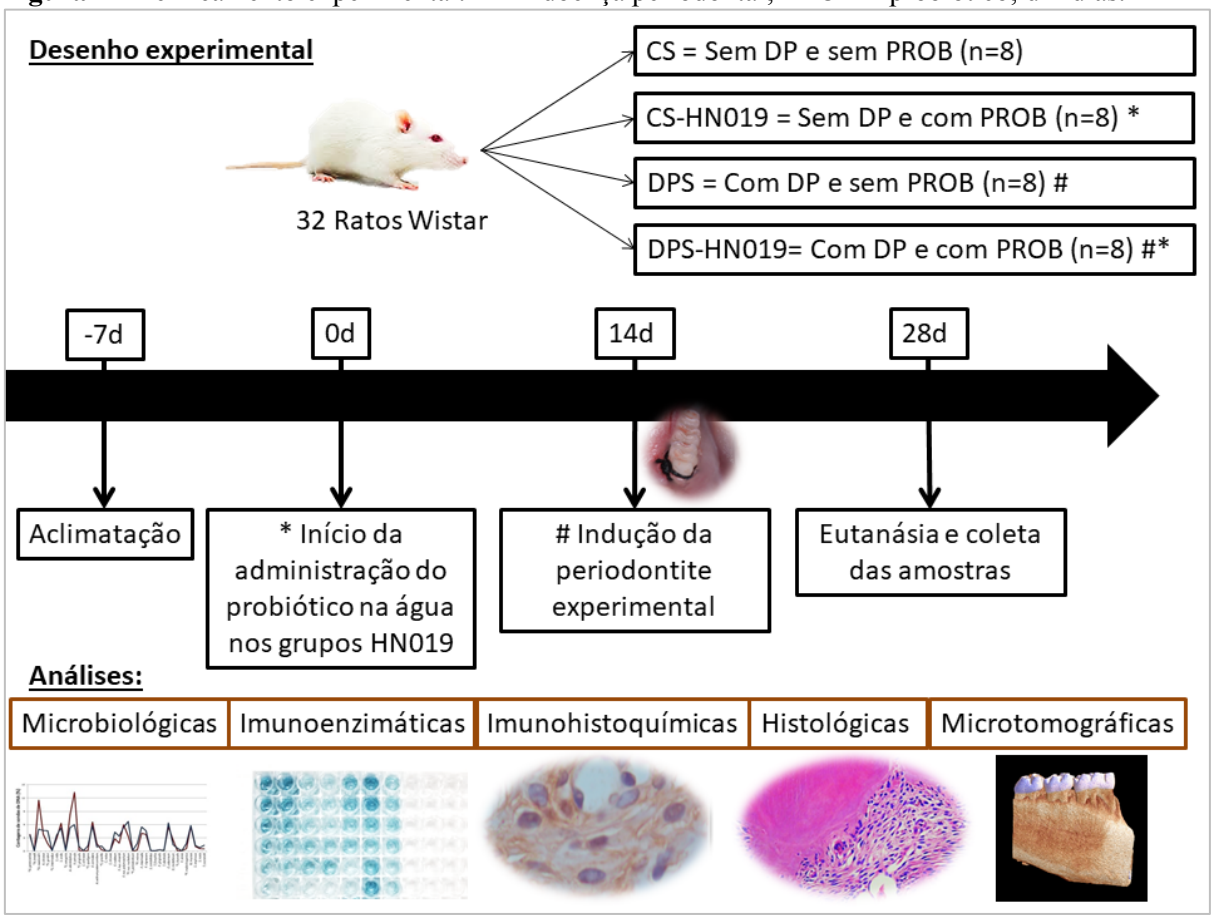
considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão entre os grupos DP e C do estudo de Oliveira et al. (2017), reconhecendo a diferença significante de 5% (δ) entre os grupos, intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), desvio padrão (σ) de 23%, as mudanças na média do Volume Ósseo (VO) como variável primária e $[Z\alpha\ (1.96) + Z\beta\ (0.84)]^2 = 7.84$. O cálculo da amostra por grupo foi baseado na fórmula: $n \geq \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$. O número mínimo necessário foi de 8 animais por grupo experimental.

4.3 Preparo da cultura bacteriana e administração aos animais

B. lactis HN019 (HOWARUTM Bifido, E. I. Dupont® de Nemoursand Company, Wilmington, DE, EUA) foi cultivado em meio MRS Agar (Man, Rogosa and Sharpe - D TMLactobacilli MRS Broth, Sparks, MD, EUA) por 48 horas a 37°C sob condições de anaerobiose (GASPAKTM EZ Anaerobe Container System with indicator, Sparks, MD, EUA). A seguir, com auxílio de alça bacteriológica estéril, 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 10^9, em solução salina tamponada fosfatada (PBS), com pH 7,0 e acrescida de 2,0% de carboximetilcelulose (Chitprasert et al., 2012). 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 37oC. 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. Desta forma, a DO de 2,898 correspondeu ao inóculo padronizado com $1,9 \times 10^9$ UFC/mL (Bauroel et al., 2012).

Nos Grupos CS-HN019 e DPS-HN019, a água probiótica dos animais foi acrescida das culturas previamente preparadas de *B. lactis* HN019 em garrafas com 60 mL, de forma a atingir as doses de 1×10^9 UFC/mL. A água probiótica foi renovada a cada 24 horas. A administração sistêmica das cepas probióticas não ultrapassou 4 semanas, sendo iniciada duas semanas antes da colocação das ligaduras nos grupos DP, conforme desenho experimental (Figura 1).

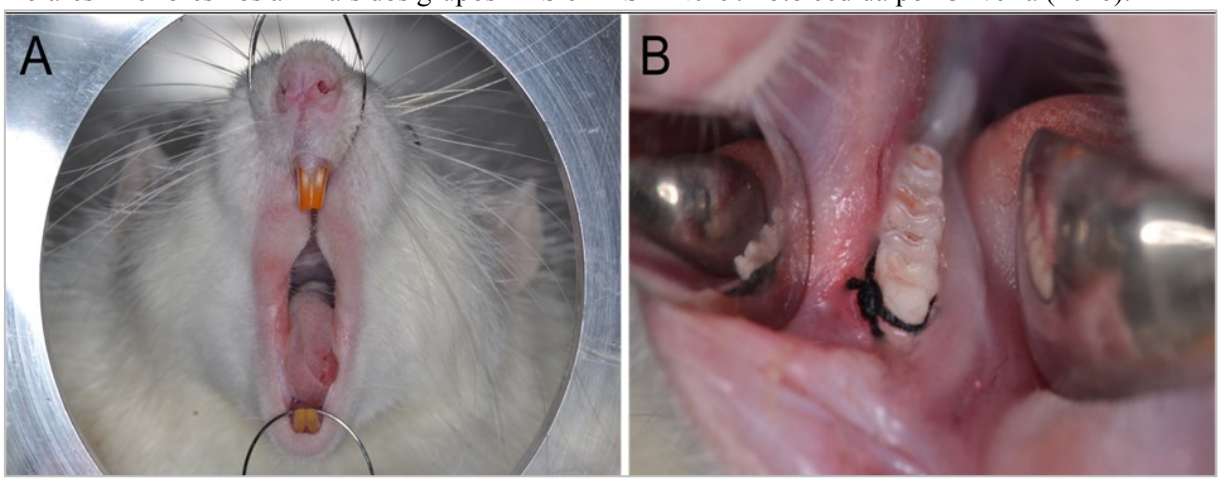
Figura 1 - Delineamento experimental. DP = doença periodontal; PROB = probiótico; d = dias.



4.4 Indução da periodontite experimental

Para a colocação da ligadura nos grupos DP, foi seguida a metodologia descrita por Oliveira et al. (2016). 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 10 mg/Kg (Xilazina) e 80 mg/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 um 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 (Figura 2). A presença das ligaduras nos animais foi verificada periodicamente. Caso fosse observado perda da ligadura, um novo animal era preparado para o estudo. Todos os animais foram pesados no início do experimento e logo antes da eutanásia.

Figura 2 - Posicionamento em mesa operatória e instalação de fio de seda ao redor dos primeiros molares inferiores nos animais dos grupos DPS e DPS-HN019. Foto cedida por Oliveira (2016).



4.5 Eutanásia e coleta de material para análises

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 28 dias após início do experimento. A eutanásia 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). Foram coletadas as hemi-mandíbulas direita e esquerda dos animais, biópsias gengivais e ligaduras (grupos com periodontite experimental).

4.6 Avaliação microbiológica

Nos grupos DPS e DPS-HN019, as ligaduras foram removidas logo após a eutanásia dos animais e colocadas em tubos *eppendorf* contendo TE (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6). Nos grupos CS e CS-N019, amostras de biofilme subgengival foram coletadas com uma cureta periodontal estéril (5-6, Mine-five, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e também colocadas em solução TE conforme já descrito por Oliveira (2016). Posteriormente, 0,1 mL NaOH (0,5 M) foram adicionados em cada tubo *eppendorf* e as amostras foram homogeneizadas e armazenadas a −20 °C. As amostras foram enviadas à Universidade de Guarulhos para contagens de 40 espécies bacterianas usando o método *checkerboard DNA-DNA hybridization* (SOCRANSKY et al., 2004), conforme descrição de Sampaio et al. (2009). A detecção e quantificação do *B. Lactis* HN019 nas amostras coletadas foram feitas por qPCR utilizando *primers* específicos com base nas metodologias propostas por Junick & Blant (2012).

4.6.1 Checkerboard DNA-DNA hybridization

Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC ou do *Forsyth Institute* (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de Mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35ºC sob condição de anaerobiose (80% N_2, 10% CO_2, 10% H_2). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrilado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrilado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de Mycoplasma suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das duas espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrífuga de 1,5mL contendo 1mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3500g por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com dodecilsulfato de sódio (SDS - C12H25NaO4S, Synth®, Labsynth, Diadema, SP, Brasil) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15mg/mL de lisozima (Sigma) e 5mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado. As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do kit *random primer digoxigenin labeling* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA). As espécies avaliadas (Tabela 1) foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal.

Tabela 1- Relação das cepas bacterianas avaliadas na análise microbiológica por meio do *checkerboard DNA-DNA hybridization*

Complexo Azul	Complexe Roxo	Complexo Verde	Complexo Amarelo
Actinomyces gerencseriae	*Actinomyces odontolyticus*	*Capnocytophaga gingivalis*	*Streptococcus gordonii*
Actinomyces israelli	*Veillonella parvula*	*Capnocytophaga ochracea*	*Streptococcus intermedius*
Actinomyces naeslundii		*Capnocytophaga sputigena*	*Streptococcus mitis*
Actinomyces viscosus		*Eikenella corrodens*	*Streptococcus oralis*
		Aggregatibacter actinomycetemcomitans	*Streptococcus sanguinis*
Complexo Laranja	**Complexo Vermelho**	**Especies "não-orais"**	
Campylobacter gracilis	*Tannerella forsythia*	*Eubacterium saburreum*	
Campylobacter rectus	*Porphyromonas gingivalis*	*Gemella morbillorum*	
Campylobacter showae	*Treponema denticola*	*Leptotrichia buccalis*	
Eubacterium nodatum		*Propionybacterium acnes*	
Parvimonas micra		*Prevotella melaninogenica*	
Prevotella intermedia		*Neisseria mucosa*	
Prevotella nigrescens		*Streptococcus anginosus*	
Streptococcus constellatus		*Selenomonas noxia*	
Fusobacterium Periodonticum		*Treponema Socranskii*	
Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum			
Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum			
Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii			

As suspensões de biofilme subgengival foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônio a 5M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1g e 10g de DNA de cada espécie, respectivamente. A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 vezes de solução salina citratada (SSC) (1 vez de SSC= 150mM NaCl - Vetec), 15M de citrato de sódio – pH 7,0 (J.T.Baker, Estado de México, México), 25mM de fosfato de sódio – pH 6,5 (Na_2HPO_4, Labsynth) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 g/mL, em 130 µL de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 vezes de SSC, 20mM de

Na_2HPO_4 (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C.

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetics), lavada por 40 minutos a 65ºC numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na_2HPO_4, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ($C_4H_4O_4$, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína - pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada duas vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCL, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20 - pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

Para a detecção dos sinais, a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection Reagent (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado e calibrado que desconhecia os grupos experimentais e terapias utilizadas no presente estudo. A leitura foi realizada duas vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas duas linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias (duas últimas das 30 canaletas do *Minislot*). Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a 10^5 células; 3 entre 10^5 e 10^6 células; 4 a aproximadamente 10^6 células; e 5 equivaleu a mais de 10^6 células. Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas (OLIVEIRA et al. 2016).

4.6.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A detecção e quantificação do *B. lactis* HN019 nas amostras coletadas foram feitas por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizando primers específicos com base nas metodologias propostas por Junick & Blant (2012). Para análise com qPCR, foram

coletadas amostras de biofilme subgengival nos dias 0 e 28 dos grupos CS-HN019 e DPS-HN019.

Após a coleta, as amostras foram armazenadas em tubos eppendorfs de 1,5 mL contendo 150 µL de tampão TE (Merck, Whitehouse Station, Nova Jersey, EUA) e mantidas em freezer a -80 °C até o início dos experimentos. A extração do DNA genômico foi realizada por meio do kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germantown, Maryland, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Posteriormente, a concentração e a pureza do DNA genômico foram avaliadas por espectrofotometria em aparelho Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A leitura foi realizada em dois diferentes comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm, para obtenção da concentração de DNA/µL e detecção de contaminação das amostras por proteínas.

A técnica de qPCR foi realizada por meio do sistema SYBRGreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, EUA), no aparelho StepOne Plus™ Real-Time (Thermo Fisher Scientific). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 13 µL, quantidade de DNA genômico correspondente a 10 ng e primers específicos (0,1 ug/uL) para amplificar o gene groEL: Bifidobacterium B_ani-forward (5'-CACCAATGCGGAAGACCAG- 3') e B_ani-reverse (5'-GTTGTTGAGAATCAGCGTGG-3') (JUNICK & BLAUT 2012). Para cada reação, foram utilizados: a) 7 µL do reagente SYBR Green Master Mix (Invitrogen) contendo fluoróforo SYBR Green, a enzima polimerase AmpliTaq Gold, dNTPs com dUTP e o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, além dos demais componentes de tampão; b) 2,5 µL de DNA genômico (10 ng); c) 2,5 µL de água Milli-Q RNAse/DNase free (Thermo Fisher Scientific); d) 0,5 µL primer forward (0,1 µg/µL) e e) 0,5 µL primer reverse (0,1 µg/µL). A reação de amplificação seguiu o protocolo: a) 95°C por 3 minutos; b) 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; c) 72°C por 10 minutos; d) 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

Para a quantificação absoluta dos dados, foi necessária a construção de uma curva padrão a partir da extração de DNA genômico de cultura pura de *B. lactis* HN019 (HOWARUTM Bifido). A cepa bacteriana foi cultivada em meio MRS Agar (Man, Rogosa and Sharpe - D TMLactobacilli MRS Broth, Sparks, MD, EUA) por 48 horas a 37°C sob condições de anaerobiose (GASPAKTM EZ Anaerobe Container System with indicator, Sparks, MD, EUA). A seguir, com auxílio de uma 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^{-9}, 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 UFC/mL.

O DNA genômico de um inóculo a 10^8 UFC/mL foi extraído e sua concentração determinada como descrito anteriormente. A partir desta concentração, em ng/µL, e conhecendo o tamanho do genoma da cepa, 2,25 megabases (Mb), foi possível aplicar a fórmula abaixo e descobrir o número de cópias de bactéria (moléculas)/µL (JUNICK & BLAUT 2012):

> Número de cópias de genoma de bactéria/µL (moléculas/µL) = concentração do DNA genômico (ng/µL) / *2,47 (fentograma - fg/molécula) *[2,25 Mb × massa média de 1 par de base - bp (660 g/mol)] / constante de Avogadro (6,022 × 1023 moléculas/mol) = 2,47 fg/molécula.

Após os cálculos, foi realizada uma diluição seriada a partir do ponto mais concentrado (108 moléculas/µL) sendo possível estabelecer a curva padrão com os pontos: 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 e 10^0 moléculas/µL. O intervalo considerado aceitável para a eficiência das curvas foi de 90-110%. Por meio do software StepOnePlus™ Software v2.3 foi possível obter o número de cópias de genoma de bactéria/µL presente em cada amostra analisada. Três amostras negativas (água) foram submetidas à reação com o primer utilizado.

4.7 Análise imunohistoquímica

As hemi-mandíbulas esquerdas foram dissecadas, fixadas em formol neutro a 10% por 48 horas e descalcificadas por meio de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 4% durante 90 dias, conforme metodologia já descrita por Oliveira (2016). Após este período, as peças foram desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados, então, cortes seriados com 4 µm de espessura, no plano mésio-distal. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão *Diva Decloaker* (Biocare

Medical, Inc., Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (*Decloaking Chamber*, Biocare Medical, Inc., Concord, CA, EUA), a 95°C, por 10 minutos. Entre cada uma das etapas da reação imunohistoquímica, foram feitas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M - pH 7,4. As secções histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e em 1% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio da peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos, respectivamente. Lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram divididas em oito lotes. Cada lote foi submetido à incubação, durante 24 horas, com um dos seguintes anticorpos primários: anti-BD-1 (M-69, sc-25573; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA), anti-BD-2 (orb10531; Biorbyt, San Francisco, CA, EUA), anti-BD-3 (I-16, sc-10860; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA), anti-TLR-2 (orb11487; Biorbyt, San Francisco, CA, EUA), anti-TLR-4 (orb11489; Biorbyt, San Francisco, CA, EUA), anti-CD-4 (C-18, sc-1140; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA), anti-CD-8 (orb10325; Biorbyt, San Francisco, CA, EUA) e anti-CD-57 (V-18, sc-49197; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos primários foram diluídos em *Dako Antibody Diluent* (Dako North America, Inc., Carpinteria CA, EUA). Nas etapas subsequentes foi utilizado o *Universal LSAB™+ Kit/HRP* (Dako North America, Inc., Carpinteria CA, EUA). As secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado durante 2 horas e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte por 1 hora. Na revelação foi utilizado como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (Liquid DAB+, Dako North America, Inc., Carpinteria CA, EUA) e os cortes histológicos foram contra-corados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente, suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

Os cortes histológicos foram analisados qualitativamente sob iluminação de campo claro em microscópio óptico por investigador que desconhecia os grupos experimentais. A imunomarcação foi definida como um precipitado de coloração acastanhada nas células e/ou matriz extracelular. Foram analisadas três regiões: região mesial do 1º molar inferior, região interproximal entre o 1º e 2º molares inferiores e região de bifurcação do 1º molar inferior. Nas três regiões, em um aumento 400 x, foram analisadas área de 600 x 800 μm, cujo limite coronal era o tecido epitelial (regiões mesial e interproximal) ou o teto da bifurcação (região de bifurcação). Foi realizada uma análise semi-quantitativa do padrão de imunomarcação conforme os seguintes escores: ESCORE 0 - padrão nulo de imunomarcação nas três regiões; ESCORE 1 - baixo padrão de imunomarcação (até um terço das áreas analisadas apresentando imunorreatividade); ESCORE 2 - moderado padrão de imunomarcação (aproximadamente

dois terços das áreas analisadas apresentando imunorreatividade) e ESCORE 3 - alto padrão de imunomarcação (quase toda a extensão das áreas analisadas apresentando imunorreatividade). O grupo controle foi empregado como ponto de referência para se definir o padrão basal de imunorreatividade, a partir do qual os escores foram atribuídos aos demais grupos experimentais.

4.8 Análise imunoenzimática

As hemi-mandíbulas direitas tiveram seu tecido gengival removido para realização de imunoensaios enzimáticos *(*ELISA e LuminexTM xMAP®*)*. Com bisturi estéril, a gengiva foi removida da região vestibular e lingual dos primeiros molares inferiores de cada animal conforme descrito por Oliveira (2016). Para análise, os tecidos gengivais coletados foram lavados em PBS associado a um coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich). Em seguida, os tecidos foram imersos em nitrogênio líquido e macerados manualmente com gral e pistilo. Os tecidos macerados foram novamente colocados em solução PBS associada a inibidores de proteases e homogeneizados mecanicamente (Ultra-Stirrer ULTRA 80-II, Eikonal do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min em uma temperatura de 4º C. O sobrenadante obtido foi coletado e armazenado a -80º C. Os níveis das citocinas IL-1β, GROCK, RANK-L, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-4, OPG, TGF-β e M-SCF foram determinados por meio da tecnologia Luminex™ xMAP®.

Adicionalmente, foi coletado sangue por meio de punção cardíaca no momento da eutanásia e acondicionados em tubos de centrifugação. As amostras foram centrifugadas e amostras séricas separadas para a realização dos imunoensaios para detecção e quantificação dos níveis de IL-1β, IL-4, TNF-α e IL-10.

Para quantificação de citocinas, utilizou-se kits disponíveis comercialmente (RECYTMAG-65K-05, RBN-31K-1RANKL, RBN-31K-1OPG – Milliplex Map, Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) em um analisador MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a placa filtro foi umedecida com o *washing buffer* e, em seguida, a solução foi aspirada dos poços. *Beads* magnéticos revestidos com os anticorpos monoclonais para os 14 analitos foram adicionados aos poços. As amostras e padrões foram transferidas para os poços e incubadas overnight 4°C. Os poços foram lavados novamente e uma mistura de anticorpos secundários biotinilados foi adicionada. Após a incubação por uma hora, adicionou-se aos poços a Estreptavidina R- ficoeritrina, sendo este conjunto incubado por mais uma hora. Após lavagem para a remoção de reagentes não-ligados, foi acionado

sheath fluid (Luminexs, MiraiBio, Alameda, CA, EUA) aos poços. As placas foram, então, analisadas pelo MAGPIX®, obtendo-se a intensidade de fluorescência média. Amostras abaixo do limite de detecção foram registradas como zero. Todas as amostras foram analisadas individualmente e os níveis de citocinas foram estimados a partir de uma curva polinomial de quinto grau utilizando-se o software xPONENT® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA).

Foi determinado o valor de proteína total de cada amostra por meio de imunoensaios 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 650 nm (TP-Reader, ThermoPlate®, São Paulo, SP, Brasil) e os valores foram expressos em ng/dL. Após a normalização dos dados, foram calculadas razões entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em todos os grupos experimentais.

4.9 Análise da expressão gênica

As hemi-mandíbulas direitas tiveram seu tecido gengival removido para realização de análise de expressão dos genes IL-17, INF-γ e FOXP3 por meio de qRT-PCR. Com bisturi estéril, a gengiva foi removida da região vestibular e lingual dos primeiros molares inferiores de cada animal, conforme descrito por Oliveira (2016). Os blocos de tecido obtidos foram colocados em microtubos esterilizados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 ºC. O ácido ribonucleico (RNA) foi isolado das biópsias gengivais pelo kit de extração *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Inc., Madison, WI, EUA) conforme protocolo do fabricante, incluindo tratamento com a enzima DNAse para eliminar qualquer resíduo DNA genômico. Um micrograma do RNA total isolado foi transcrito reversamente para DNA complementar (cDNA) com o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Inc., Forster City, CA, EUA), o qual possui random hexamers, conforme protocolo do fabricante. A análise da expressão gênica dos genes selecionados foi realizada por qRT-PCR utilizando *TaqMan GenEx Assay* (Applied Biosystems, Inc., Forster City, CA, EUA). Para isto, cada cDNA foi amplificado utilizando o gene constitutivo β-actina como controle endógeno para a normalização. A amplificação foi realizada no *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA) por 40 ciclos, conforme protocolo do fabricante. A fluorescência foi coletada para cada ciclo de amplificação e os dados analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para quantificação da expressão relativa (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

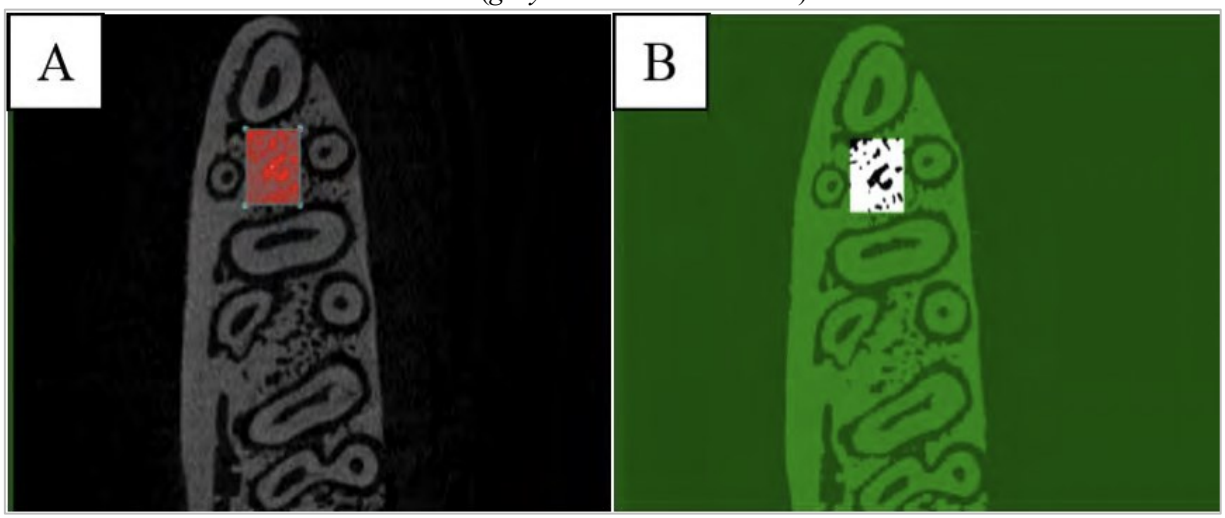
4.10 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT)

Espécimes não desmineralizados (hemi-mandíbulas direitas) foram escaneados por um sistema de micro-CT de feixe cônico (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raio-X foi operado com um potencial de aceleração de 60 kV, corrente de 165 µA e tempo de exposição de 650 ms por projeção. As imagens foram produzidas com um tamanho de *voxel* de 6x6x6 µm e analisadas conforme descrição de Oliveira et al. (2017).

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

As análises volumétricas foram realizadas com o *software CT-Analyser*® na região de bifurcação do 1º molar inferior (Figura 3). As imagens foram visualizadas no eixo coronal e o intervalo de cortes analisados seguiu os seguintes parâmetros: i) utilizou-se como ponto de partida para a análise o corte microtomográfico no qual as quatro raízes do 1º molar inferior estavam completamente separadas; ii) o corte microtomográfico final foi determinado como aquele em que não era possível visualizar mais o osso inter-radicular na região de bifurcação do 1º molar inferior. O retângulo foi a figura geométrica escolhida para representar a região de interesse a ser analisada. Esta forma geométrica foi adequada por interpolação à área a ser medida e posterior determinação do volume de interesse (VOI). Em seguida, procedeu-se a binarização da imagem para a separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (limite inferior - 65 e limite superior - 255; *grayscale threshold* 0-255). Este padrão de binarização foi usado para todas as amostras. Os seguintes parâmetros foram determinados na análise volumétrica: a) VO: percentual do VOI preenchido com tecido ósseo; b) Porosidade Óssea (PO): percentual de porosidades presentes no tecido ósseo determinado no VOI; c) Espaçamento de trabéculas (Tb.Sp): espaçamento (µm) entre as trabéculas ósseas presentes no VOI; d) Número trabecular (Tb.N): número (μm^{-1}) de trabéculas ósseas presentes no VOI.

Figura 3 - Medidas volumétricas realizadas na região de bifurcação do 1º molar inferior em cortes microtomográficos visualizados no eixo axial. (**A**) A região de interesse a ser analisada (ROI) foi delimitada por um retângulo que tangenciava as quatro raízes do 1º molar inferior. (**B**) As imagens foram binarizadas para separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (*grayscale threshold* 0-255).



Fonte: Oliveira (2016)

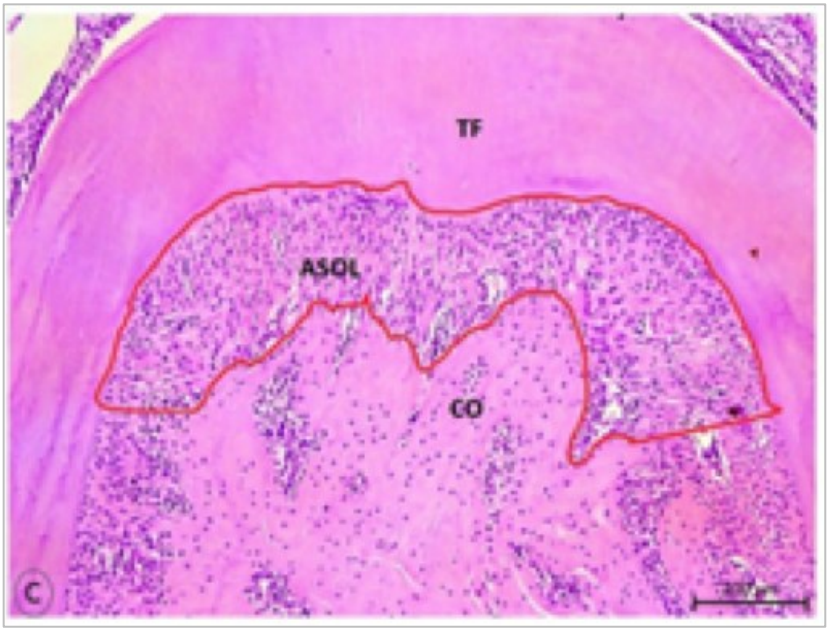
4.11 Análise histomorfométrica e histopatológica

As hemi-mandíbulas esquerdas foram dissecadas, fixadas em formol neutro a 10% por 48 horas e descalcificadas por meio de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético a 4% durante 90 dias. Após este período, as peças foram desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Secções seriadas de parafina (4 µm de espessura) foram obtidas na direção mésio-distal e dispostas em lâminas histológicas. Para a coloração, das lâminas foi utilizada a técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E). Os cortes foram analisados com microscopia de luz para estabelecer a perda óssea e de inserção conjuntiva através medidas histométricas, além de análise histopatológica.

Para análise histométrica, foram selecionadas duas lâminas representando a porção vestíbulo-lingual mais central da hemi-mandibula. As imagens foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz. Medições padronizadas foram determinadas histometricamente com o auxílio de um sistema de análise de imagens digitalizadas e software específico (ImageLab 2000, Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

Na região de bifurcação do 1o molar inferior, foi também calculada a área sem osso ou ligamento periodontal (Figura 4) em mm^2. Para cada animal, foi obtida uma média dos valores dos dois cortes analisados.

Figura 4 - Imagem ilustrativa da região de bifurcação dos animais para cálculo da Área Sem Osso e Ligamento Periodontal – ASOL (delimitada por linhas vermelhas). Coloração: Hematoxilina e Eosina. CO = crista óssea; JCE Junção cemento esmalte; IE Inserção Conjuntiva; PMI = primeiro molar inferior; SMI = segundo molar inferior; TF = Teto da bifurcação.



Fonte: Oliveira (2016).

4.12 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, histomorfométrico, microbiológicos, imunoenzimáticos e imunohistoquímicos analisados, bem como os dados de expressão gênica obtidos foram definidos como variáveis secundárias.

4.13 Análise estatística

As análises foram realizadas com o *software* Bioestat (BioEstat, Versão 5.3. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brazil). O animal foi considerado como a unidade estatística. Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram agrupados e apresentados como médias e desvios-padrão (variáveis contínuas) ou medianas, desvios interquartílicos e valores máximos e mínimos (variáveis ordinais). A distribuição dos dados foi verificada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos para análises das diferenças intergrupos. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados com distribuição não normal.

Todas as avaliações histométricas, imunohistoquímicas, microbiológicas e microtomográficas foram realizadas por examinadores calibrados. Para calibração dos examinadores um terço da amostra foi avaliada em dois períodos de tempo com um intervalo de 48 horas. O coeficiente de correlação intraclasse (CCI) foi utilizado para determinar a reprodutibilidade dos examinadores nas duas avaliações realizadas. Valores de CCI maiores que 90% foram considerados para assegurar a calibração dos examinadores.

A significância das diferenças entre os grupos para as variáveis histométricas e microtomográficas, bem como para os valores de expressão gênica foi determinada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Para análise dos dados imunohistoquímicos, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn.

Na análise dos dados obtidos na avaliação imunoenzimática, os valores de cada citocina foram expressos em pg/mL. Os níveis finais das citocinas analisadas foram obtidos pela razão entre os valores inicialmente obtidos com sistema MAGPIX® e os valores de peso das biópsias gengivais. Em cada animal, foi calculada a média e o desvio-padrão dos níveis de todas as citocinas analisadas e a razão entre citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada pela ANOVA seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Na análise dos dados obtidos na avaliação microbiológica, os níveis de cada espécie bacteriana foram calculados pela transformação dos escores obtidos na leitura dos filmes radiográficos após a realização do *checkerboard DNA-DNA hybridization* em valores absolutos: escore 1 = 10.000 células; escore 2 = 100.000 células; escore 3 = 500.000 células; escore 4 = 1.000.000 células e escore 5 = 10.000.000 células. Em cada animal, foi calculada a proporção das contagens (x 10^5) de cada bactéria analisada em relação à quantidade total de bactérias. Foi calculada, então, a proporção média de cada espécie nos diferentes grupos. As diferenças intergrupos foram avaliadas pelo Teste t. Para análise de qPCR na detecção de *B. Lactis* HN019 a significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste t para comparações entre antes e depois e ANOVA seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações gerais.

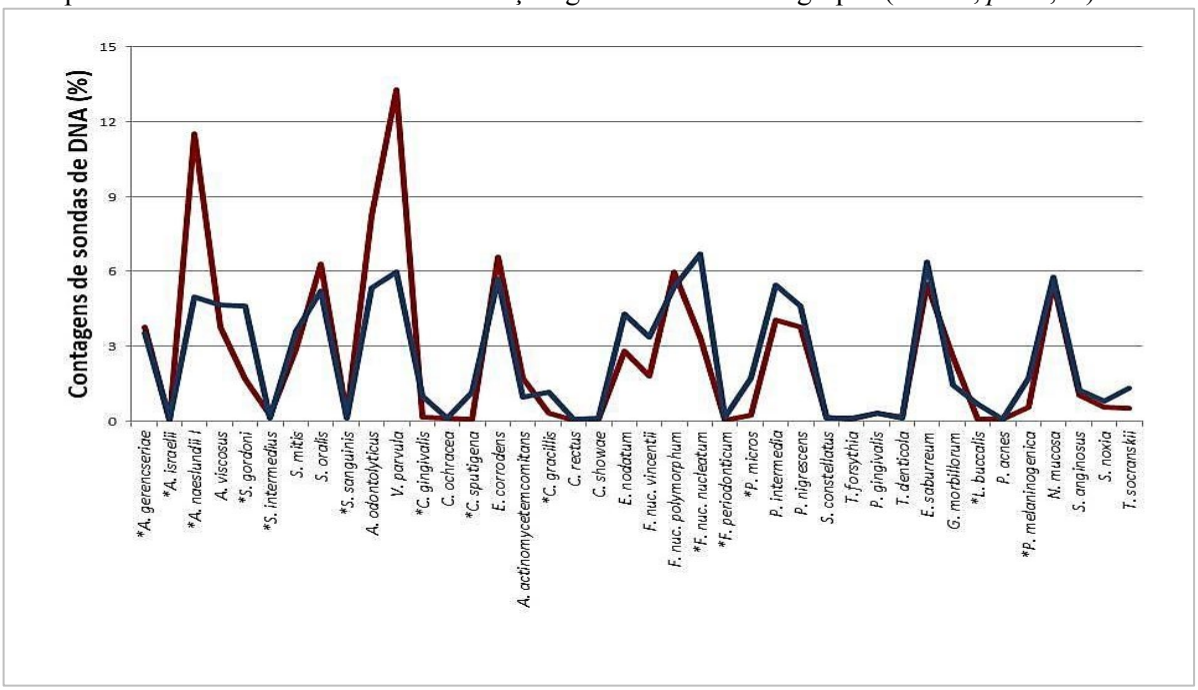
5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação microbiológica

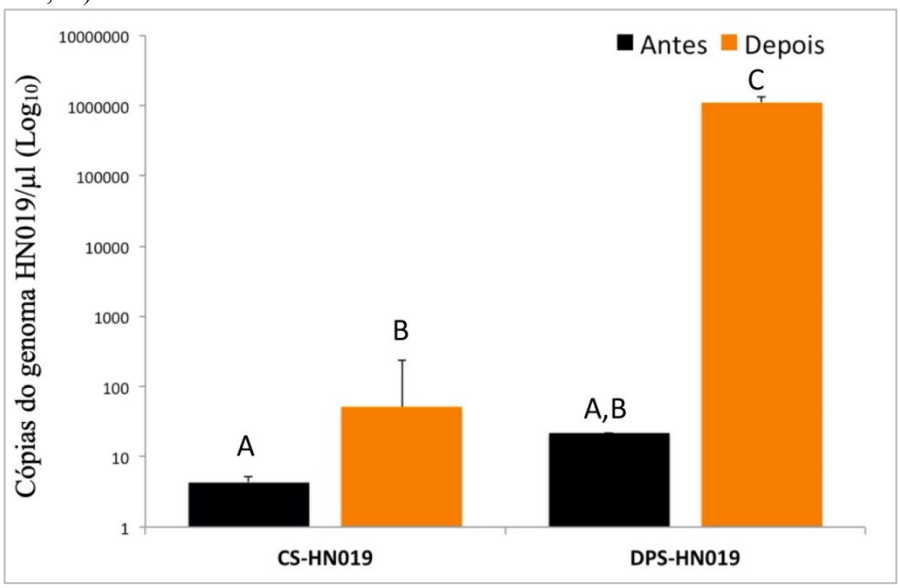
A figura 5 apresenta o percentual de sondas de DNA das 40 espécies bacterianas analisadas nos grupos DPS e DPS-HN019, bem como os resultados das comparações entre os grupos. O Grupo DPS-HN019 apresentou menor percentual de espécies semelhantes à *F. periodonticum* e maior percentual de espécies semelhantes à *A. gereneseriae, A.israelli e S. gordonii* quando comparado ao Grupo DPS.

Figura 5 - Proporções médias de 40 espécies bacterianas no biofilme dos animais dos grupos com periodontite experimental e tratados (Grupo DPS-HN019 – linhas azuis) ou não (Grupos DPS – linhas vermelhas) com administração sistêmica de *B. Lactis* HN019. % de contagem de sondas de DNA = porcentagem da contagem de DNA de cada espécie em relação à contagem total de DNA das 40 espécies bacterianas avaliadas. *Diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p < 0,05$).



Na figura 6, pode ser verificada a quantidade de cópias do genoma de *B. lactis* HN019 presente no biofilme subgengival dos grupos CS-HN019 e DPS- HN019 antes e após a administração da terapia probiótica.

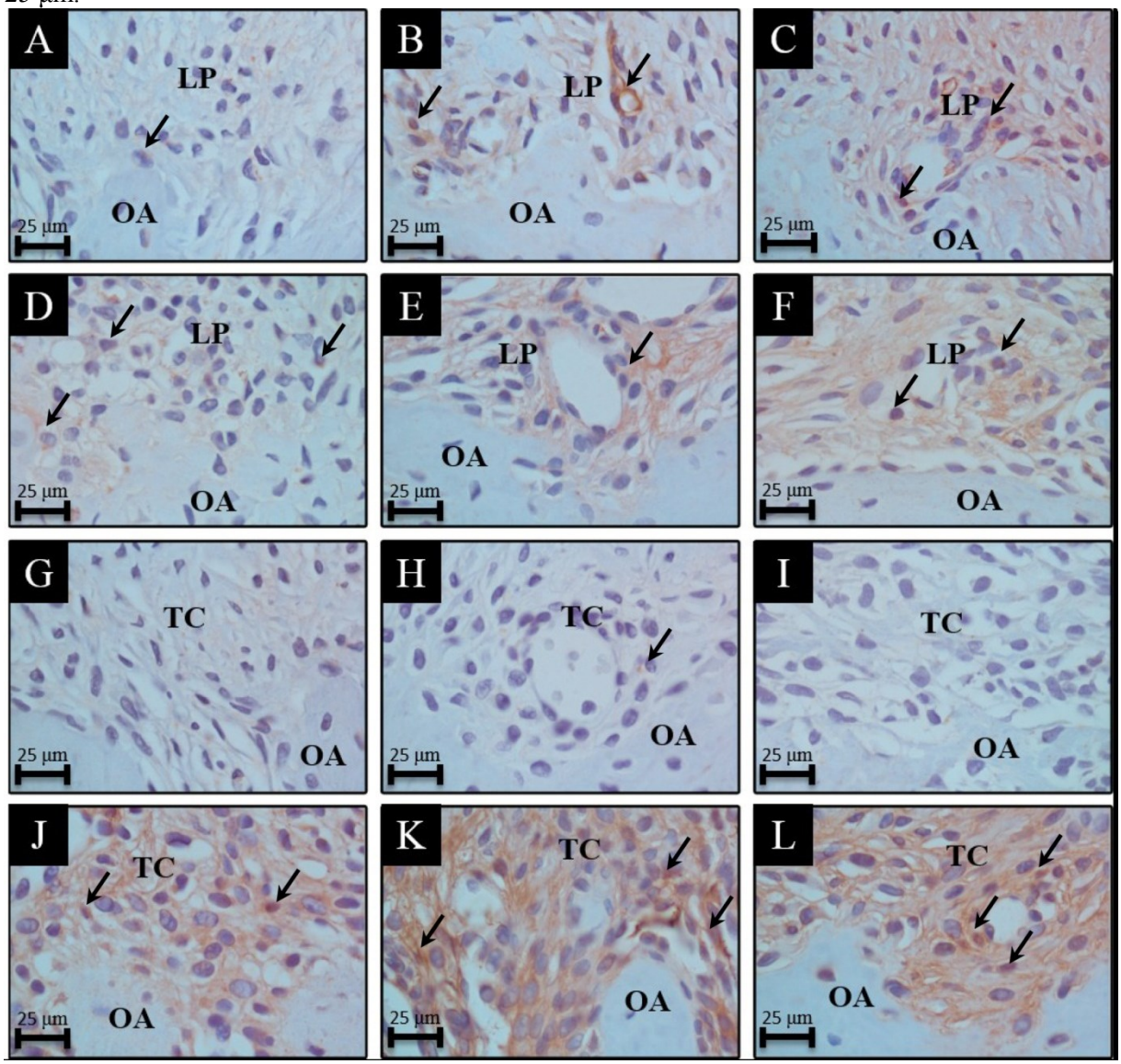
Figura 6- Quantificação de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019* nas amostras de biofilme dos animais dos grupos CS-HN019 e DPS-HN019 antes e após a administração da terapia probiótica. *Diferença significativa entre os grupos (Teste anova seguido de post-hoc de Tukey, $p < 0,05$).



5.2 Análise imunohistoquímica

As BD foram detectadas em células do periodonto de proteção e do periodonto de inserção. Houve variação qualitativa e quantitativa na imunorreatividade para BD-1, BD-2 e BD-3 nos diferentes grupos experimentais (Figura 7). A imunorreatividade para BD-1 e BD-3 pode ser detectada em queratinócitos, fibroblastos gengivais, vasos sanguíneos gengivais, fibroblastos do ligamento periodontal, osteoblastos e osteócitos (no caso da BD-1, apenas naqueles situados próximo da superfície da matriz óssea; no caso da BD-3, naqueles situados em toda matriz do óssea) do osso alveolar. A imunorreatividade para BD-2 pode ser detectada em queratinócitos, fibroblastos gengivais, vasos sanguíneos gengivais, fibroblastos do ligamento periodontal, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos do osso alveolar.

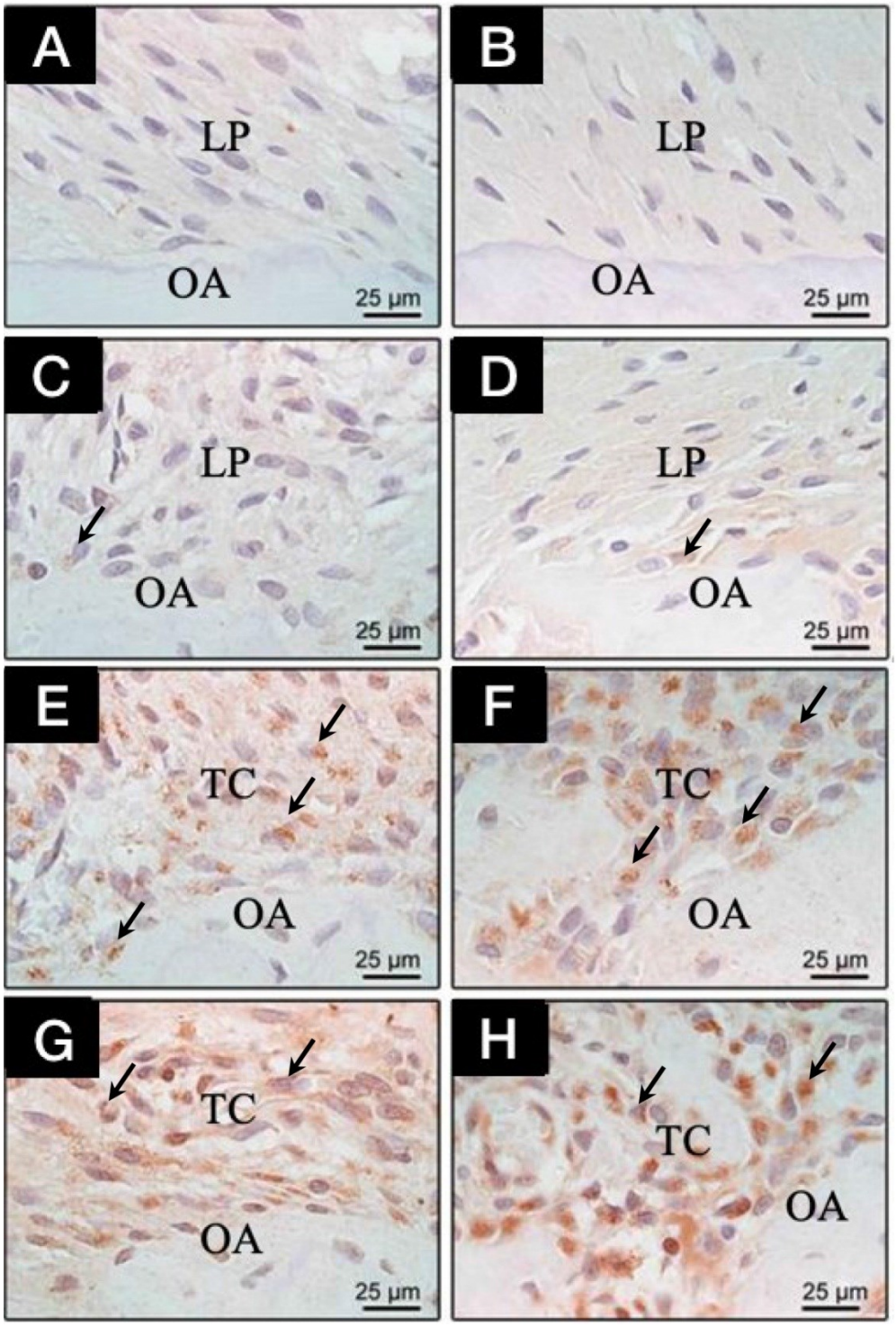
Figura 7- Padrão de imunomarcação para BD-1 (A, D, G e J), BD-2 (B, E, H e K) e BD-3 (C, F, I e L) na região de bifurcação do 1º molar inferior nos grupos CS (A-C), CS-HN019 (D-F), DPS (G-I), DPS-HN019 (J-L). Abreviações e símbolos: LP = ligamento periodontal; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original = 1000x. Barras de escala: 25 µm.



A imunomarcação para TLR-2 e TLR-4 estava presente tanto no periodonto de proteção quanto no periodonto de inserção (Figura 8). No periodonto de proteção, a imunomarcação para TLR-2 e TLR-4 estava presente em fibroblastos gengivais e células inflamatórias, sendo que as células imunorreativas se mostravam raras nos grupos controle (sem periodontite experimental) e em maior número nos grupos com periodontite experimental. Alguns queratinócitos do estrato basal também se mostraram imunorreativos. No periodonto de inserção, a marcação para TLR-2 e TLR-4 estava presente predominantemente em fibroblastos do ligamentoperiodontal em todos os grupos experimentais. Nos grupos com periodontite experimental, a imunomarcação estava presente

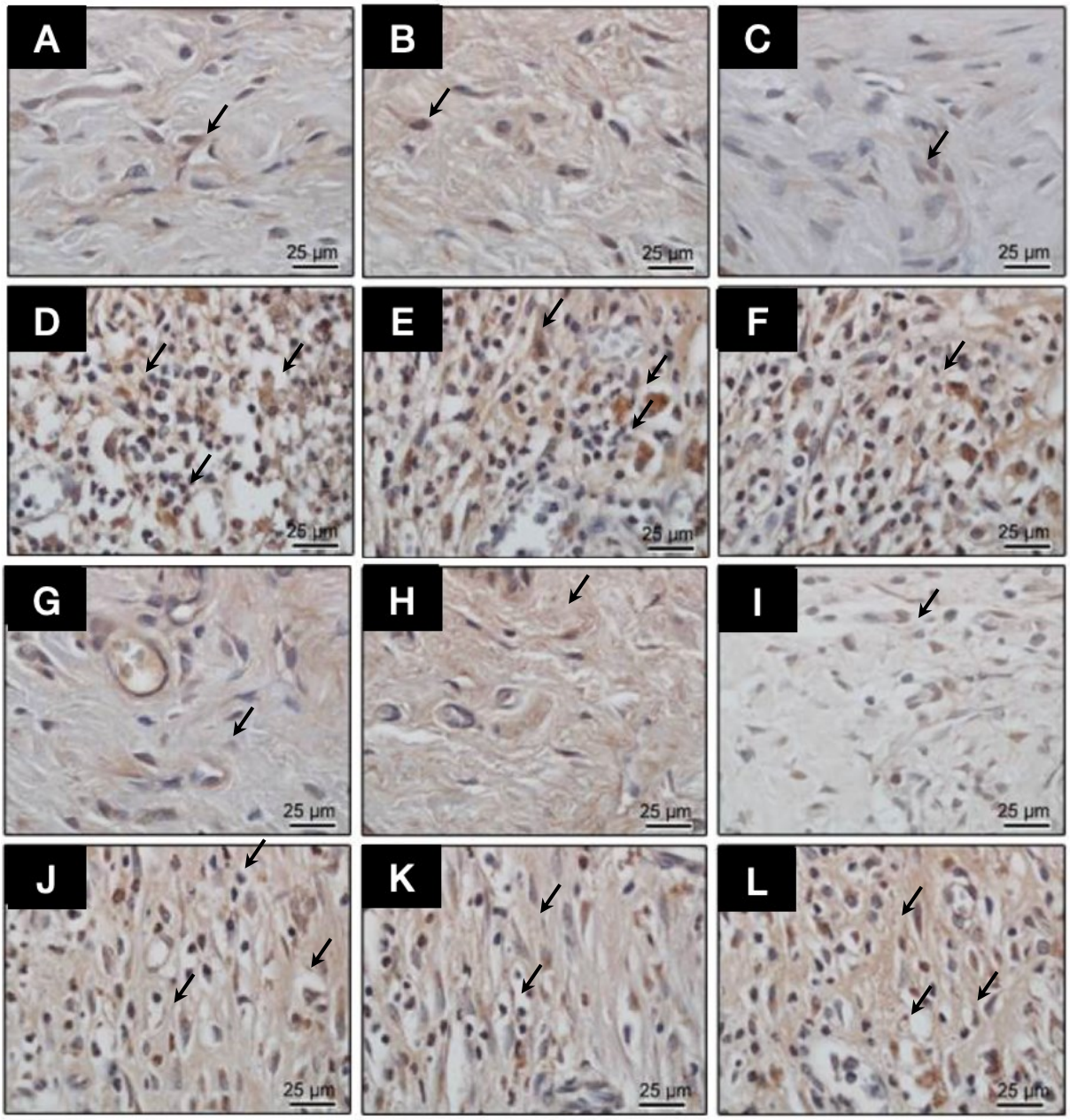
tanto em fibroblastos quanto em células inflamatórias. Alguns osteoclastos se mostravam TLR2 e TLR-4 imunorreativos, especialmente nos grupos com periodontite experimental.

Figura 8 - Padrão de imunomarcação para TLR-2 e TLR-4 no periodonto do primeiro molar inferior (osso alveolar e ligamento periodontal) de ratos submetidos ao tratamento com HN019. Fotomicrografias evidenciando a imunomarcação para TLR2 (A, C, E, G) e TLR4 (B,D,F,H). Grupos CS (A, B), CS-HN019 (C, D), DPS (E, F) e DPS-HN019 (G, H). Abreviações e símbolos: LP = ligamento periodontal; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.



A imunomarcação para CD-4, CD-8 e CD-57 estava presente em células inflamatórias localizadas na lâmina própria da gengiva e no ligamento periodontal (Figura 9). Nos grupos controle (sem periodontite experimental), as células imunomarcadas eram esparsas e difusamente distribuídas. Nos grupos com periodontite experimental, as células imunorreativas se concentravam nos focos inflamatórios presentes no tecido conjuntivo da gengiva e do ligamento periodontal em quantidades que variavam entre os diferentes grupos.

Figura 9 - Padrão de imunomarcação para CD4 (A, D, G e J), CD8 (B, E, H e K) e CD57 (C, F, I e L) na região de bifurcação do 1o molar inferior nos grupos CS (A-C), DPS (D-F), CS-HN019 (G-I), DPS-HN019 (J-L). Abreviações e símbolos: LP = ligamento periodontal; OA = osso alveolar; TC = tecido conjuntivo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original = 1000x. Barras de escala: 25 µm.



As medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos dos escores atribuídos aos diferentes grupos experimentais para a expressão de BD-1, BD-2, BD-3, CD-4, CD-8, CD-57, TLR-2 e TLR-4, bem como os resultados das comparações entre os grupos podem ser observado nas Figuras 10-12. Na análise de BD, o Grupo DPS-HN019 apresentou maior padrão de imunomarcação para BD-1, BD-2 e BD-3 quando comparado ao grupo DPS ($p < 0,05$). O Grupo DPS apresentou padrão de imunomarcação para BD-1, BD-2 e BD-3 semelhante ao Grupo CS. Não foram observadas diferenças significativas no padrão de imunomarcação para TLR-2, TLR-4, CD4, CD8 e CD57 entres os grupos DPS e DPS-HN019. Ambos os grupos DPS e DPS-HN019 apresentaram maior padrão de imunomarcação para todos os TLR e CD analisados, exceto para CD-8, quando comparados ao Grupo CS.

Figura 10- Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos dos escores atribuídos aos grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019 na análise do padrão de imunomarcação para BD-1 (**A**), BD-2 (**B**) e BD-3 (**C**). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (Kruskal-Wallis, Dumn, p < 0,05).

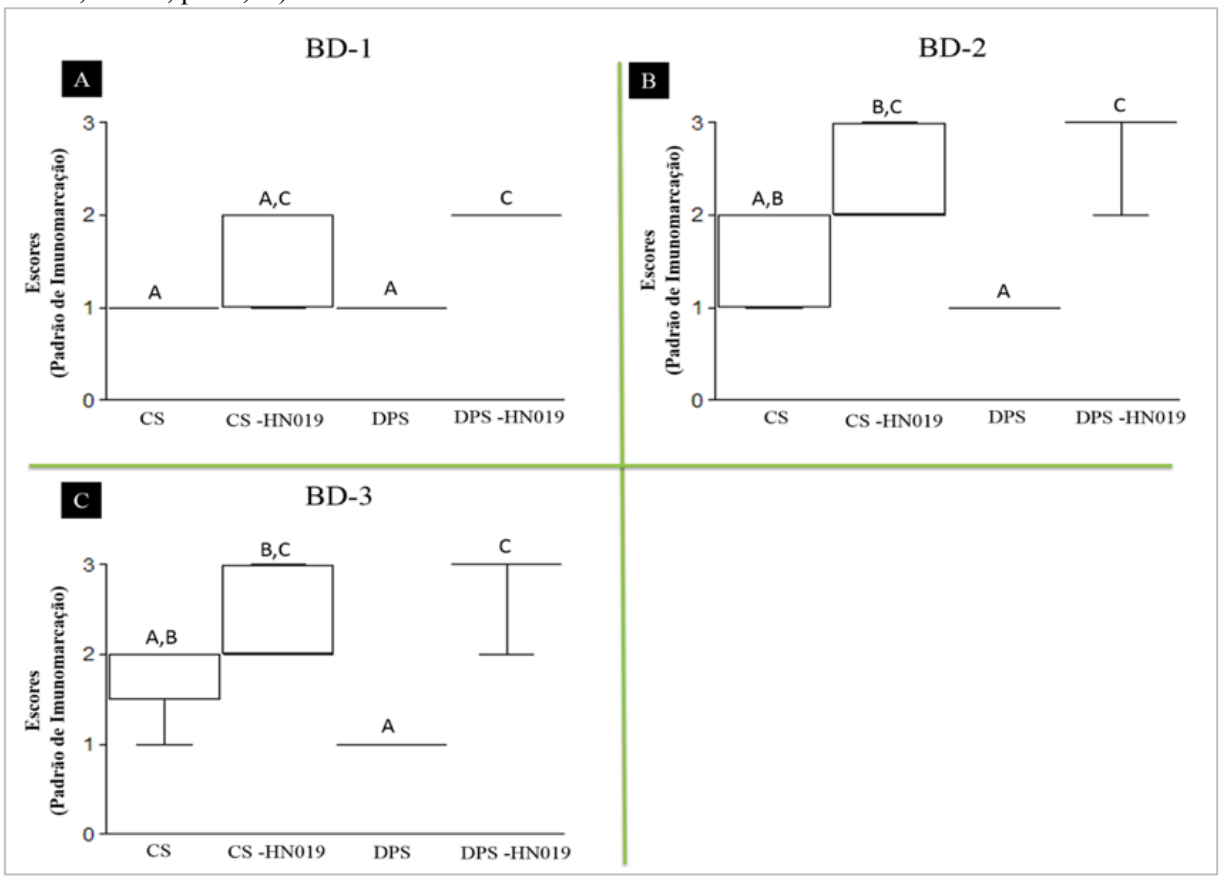


Figura 11 - Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos dos escores atribuídos aos grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019 na análise do padrão de imunomarcação para TLR-2 (A), TLR-4 (B). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (Kruskal-Wallis, Dumn, $p < 0,05$)

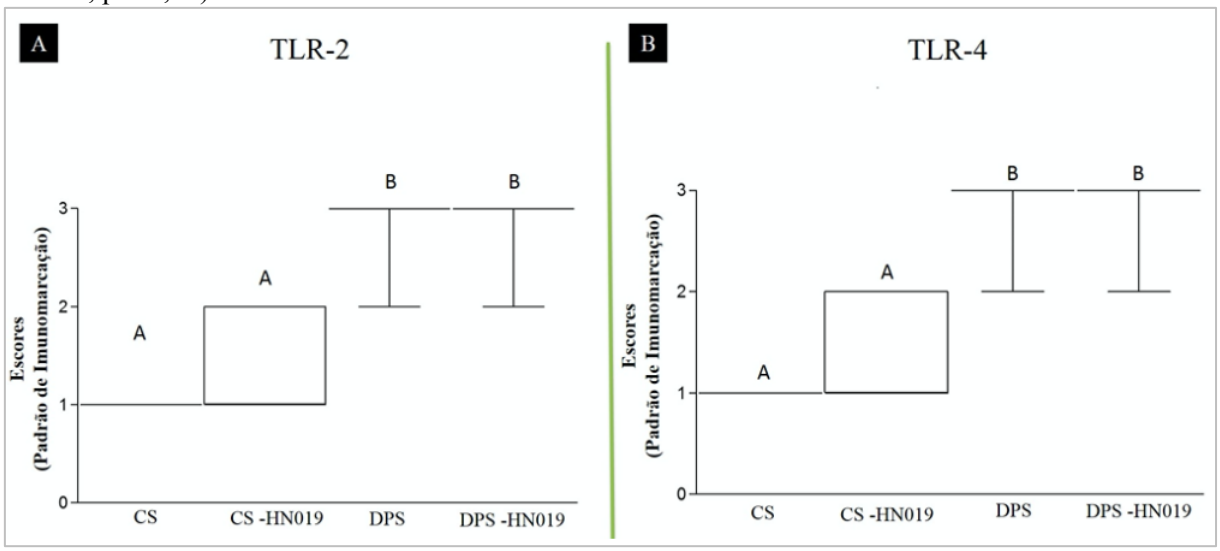
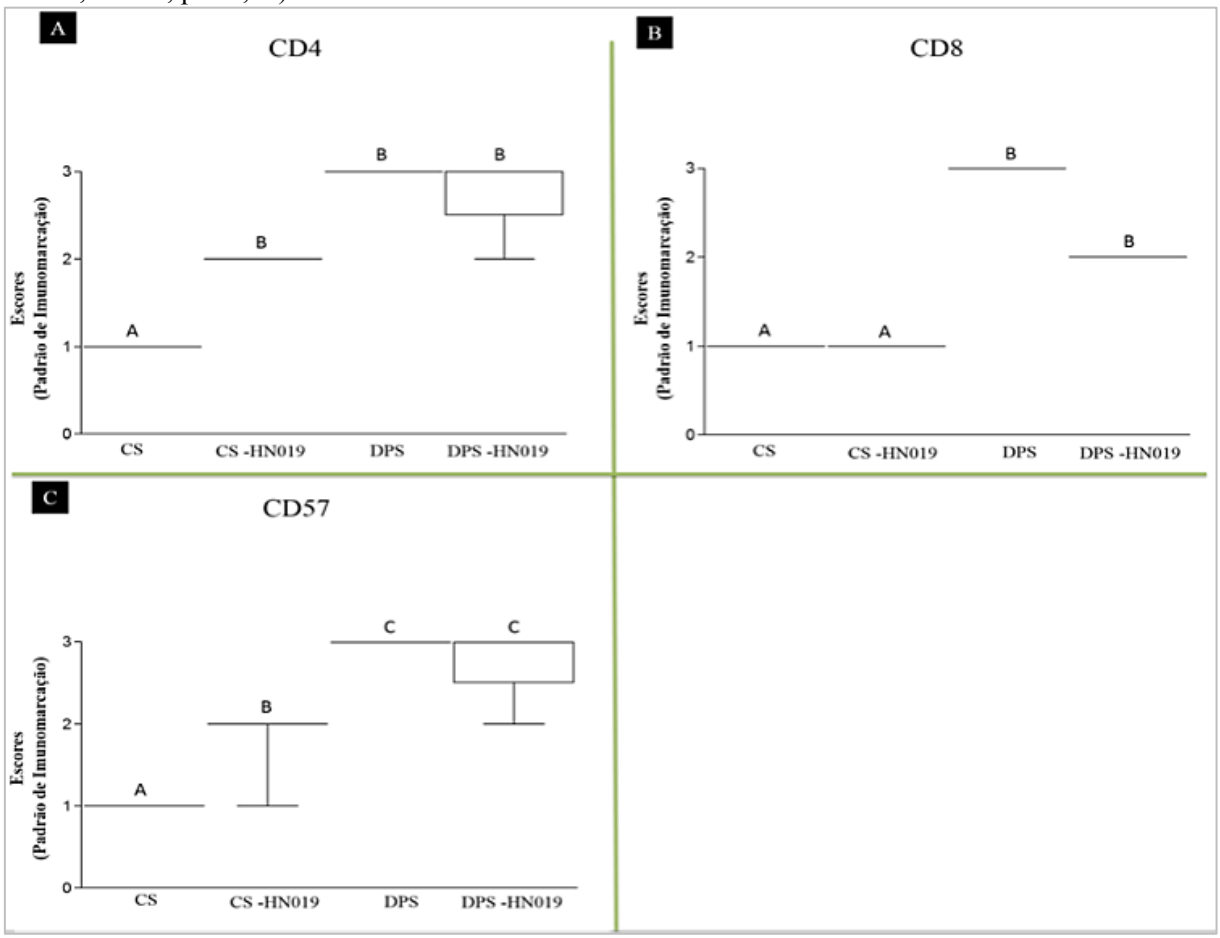


Figura 12 - Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos dos escores atribuídos aos grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019 na análise do padrão de imunomarcação para CD-4 (A), CD-8 (B), CD-57 (C). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (Kruskal-Wallis, Dumn, $p < 0,05$).



5.3 Análise imunoenzimática – Tecido gengival

As Figuras 13 e 14 demonstram as medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de razões de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no tecido gengival atribuídos aos diferentes grupos experimentais (IL1B/IL6, IL-1B/IL-10, IL-1B/IL-4, GROKC/IL-10, IL-10/TNFα, IL-6/TNFα, MCSF/TNFα, IL-4/ TNFα, TGFb/TNFα, RANKL/OPG) bem como os resultados das comparações entre os grupos.

A Figura 13 demonstra valores aumentados na razão IL-1b/IL-10, IL-1b/IL-4, GROKC/IL-10, RANKL/OPG no Grupo DPS quando comparado ao grupo DPS-HN019 (Figura 14) ($p < 0,05$), o que sugere um perfil predominantemente pró-inflamatório neste grupo. Na Figura 15, podem ser observados valores reduzido nas razões IL-10/TNFα, IL-6/TNFα, MCSF/TNFα, IL-4/ TNFα, TGFb/TNFα no Grupo DPS quando comparado ao Grupo DPS-HN019 ($p < 0,05$), o que indica um perfil predominantemente anti-inflamatório no grupo DPS-HN019. A razão IL-4/TNFα se mostrou aumentada no grupo CS-HN019 quando comparado ao grupo CS ($p < 0,05$).

Figura 13 - Médias, Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de razões de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no tecido gengival atribuídos aos diferentes grupos experimentais, bem como os resultados das comparações entre os grupos.. A) IL1B/IL6, B) IL-1B/IL-10, C) IL-1B/IL-4, D) GROKC/IL-10, E) RANKL/OPG. * Diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

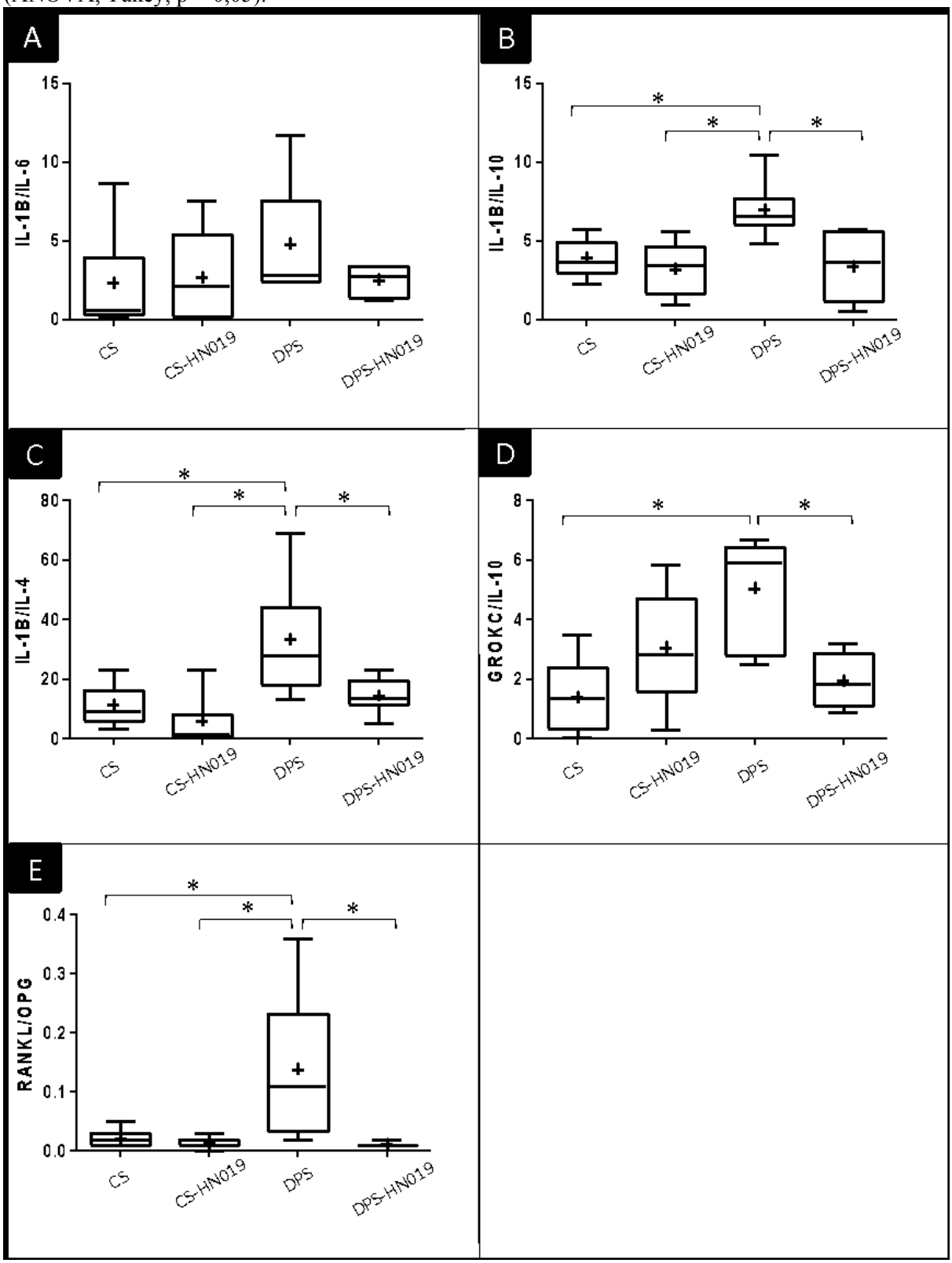
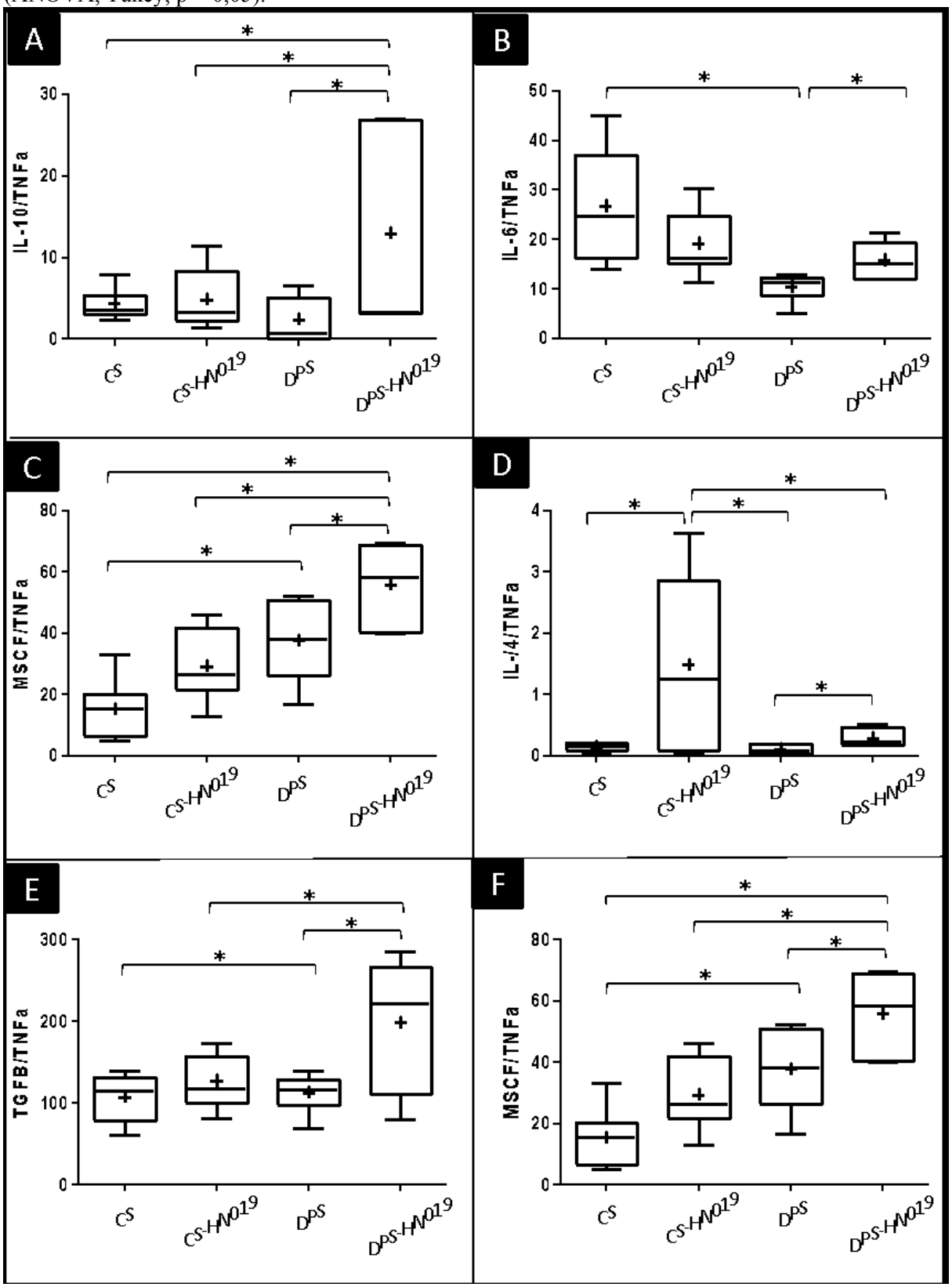


Figura 14 - Médias, Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de razões de citocinas anti-inflamatórias e pro-inflamatórias no tecido gengival atribuídos aos diferentes grupos experimentais, bem como os resultados das comparações entre os grupos. A) IL-10/TNFα, B) IL-6/TNFα, C) MCSF/TNFα, D) IL-4/ TNFα, E) TGFb/TNFα. * Diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, p < 0,05).

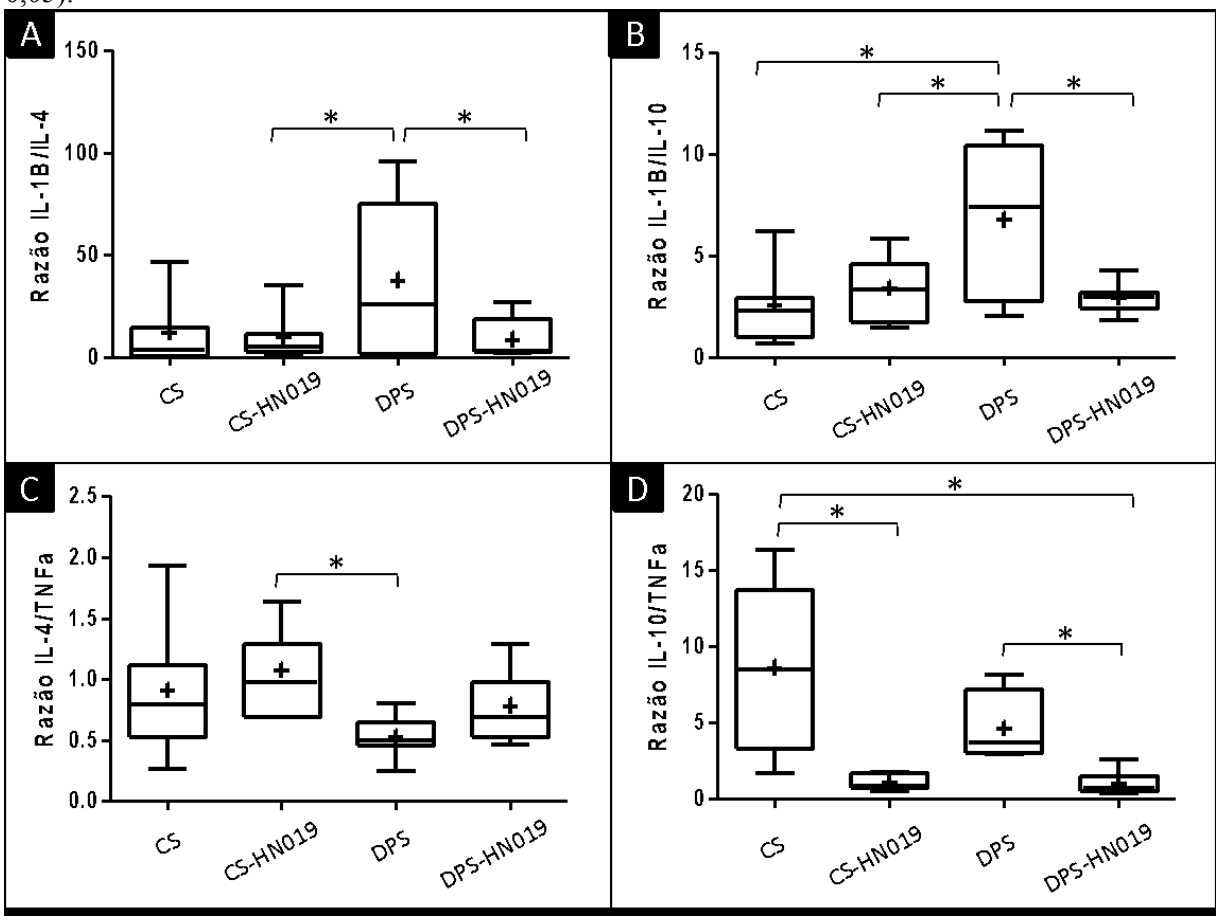


5.4 Análise imunoenzimática – Soro

A Figura 15 demontsra as medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de razões de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-1B/IL-4, IL-1B/IL-10, IL-4/TNFα e IL-10/TNFα) no soro sanguíneo dos animais nos diferentes grupos experimentais bem como os resultados das comparações entre os grupos.

Os resultados mostram valores aumentados na razão IL-1B/IL-4, IL-1B/IL-10 no soro do Grupo DPS quando comparado ao grupo DPS-HN019 ($p < 0,05$), indicando um perfil sistêmico predominantemente pró-inflamatório. A razão de IL-4/TNFα se demonstrou reduzida no Grupo DPS comprada ao Grupo CS-HN019 ($p < 0,05$). A razão IL-10/TNFα se demostrou reduzida nos grupos CS-HN019 e DPS-HN019 uando comparado ao Grupo CS ($p < 0,05$).

Figura 15 - Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de razões de citocinas anti-inflamatórias e pro-inflamatórias no soro sanguíneo atribuídos aos diferentes grupos experimentais, bem como os resultados das comparações entre os grupos. A) IL-1B/IL-4, B) IL-1B/IL-10, C) IL-4/TNFα, D) IL-10/TNFα . * Diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

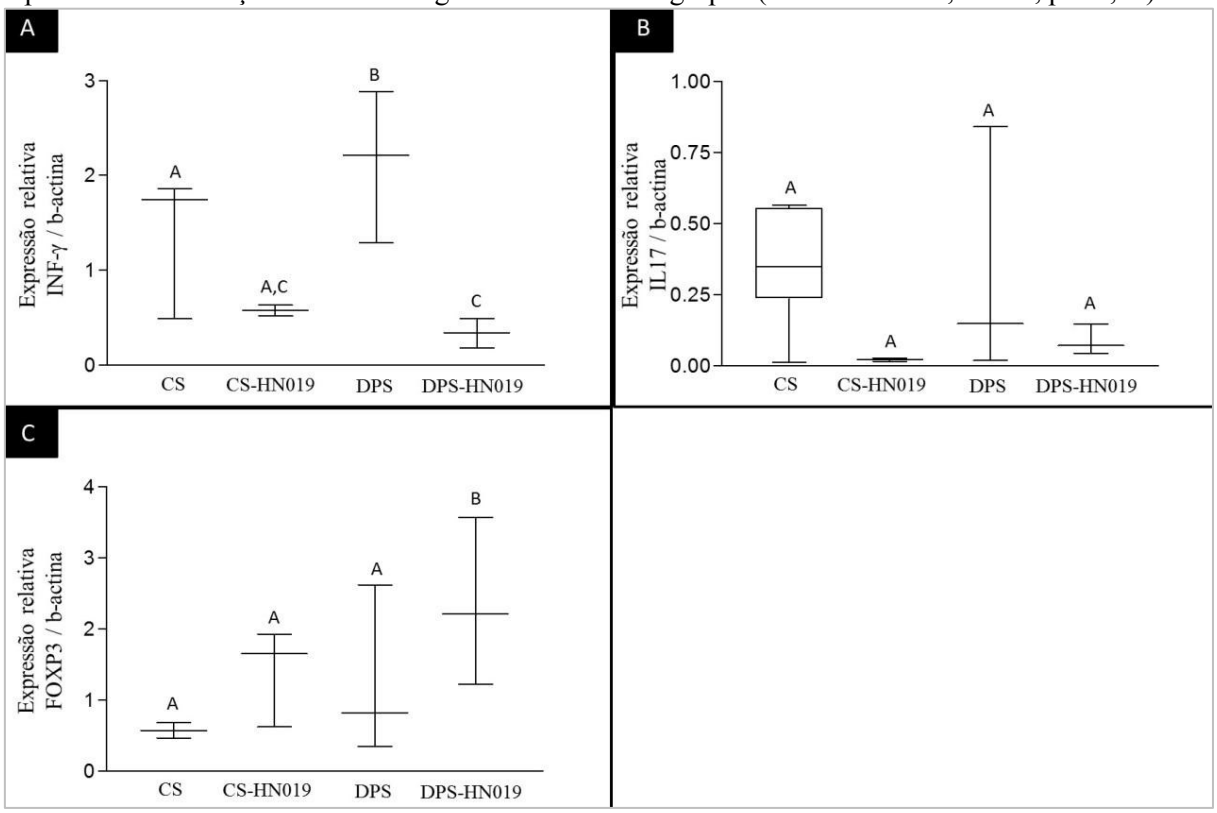


5.5 Análise de expressão gênica

A Figura 16 mostra as medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos de expressão relativa dos genes IL-17, INF-γ e Foxp3 obtidos por meio de qRT-PCR, bem como o resultado das comparações entre os grupos.

Os resultados mostram a expressão relativa aumentada de INF-y no Grupo DPS quando comparada ao Grupo DPS-HN019 ($p < 0,05$). Diferentemente, a expressão relativa de FOXP3 mostrou-se aumentada no Grupo DPS-HN019 quando comparado ao grupo DPS ($p < 0,05$).

Figura 16- Medianas, variações interquartílicas e valores máximos/mínimos da expressão gênica de **A**) INF-γ, **B**) IL17 e **C**) FOXP3 nos grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dumn, $p < 0,05$).



5.6 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT)

Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemimandíbulas dos animais dos grupos CS, CS-HN019, DPS, DPS-HN019 podem ser observadas na Figura 17.

Os valores de VO, PO, Tb.Sp e Tb.N obtidos na análise microtomográfica, bem como os resultados das comparações entre os grupos, podem ser observados na Figura 18. O Grupo DPS-HN019 apresentou menor PO, bem como maior VO quando comparado ao Grupo DPS ($p < 0,05$).

Figura 17 - Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais dos grupos CS (**A, B**), CS-HN019 (**C, D**), DPS (**E, F**) e DPS-HN019 (**G, H**). Vista da superfície vestibular externa (**A, C, E e G**). Secção sagital da superfície interna (**B, D, F e H**). CTVox® (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do pixel = 7,96 µm.

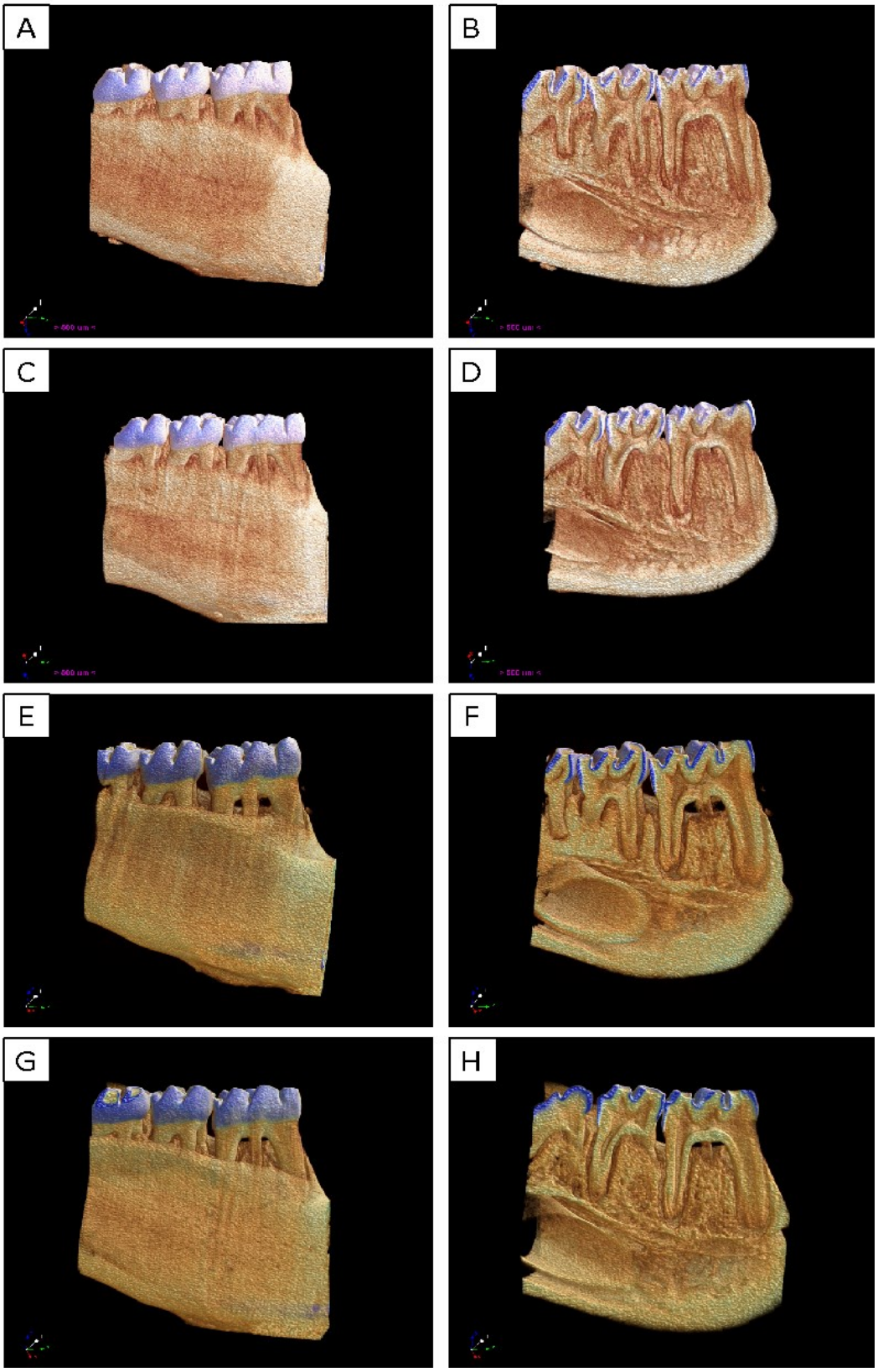
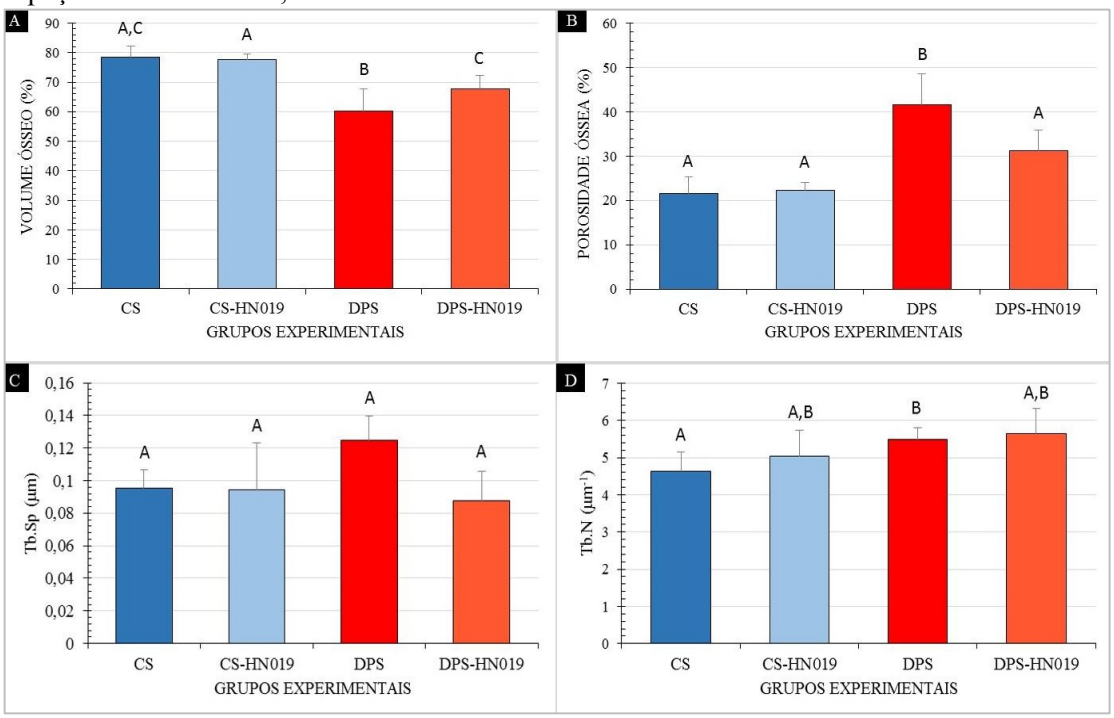


Figura 18 - Médias e desvios-padrão do volume ósseo (A) porosidade óssea (B), espaçamento trabecular (C) e superfície óssea (D), com comparações entre os grupos CS, CS-HN019, DPS e DPS-HN019. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). VO = volume ósseo; PO = porosidade óssea; Tb.Sp = espaçamento trabecular; Tb.N = número de trabéculas.



5.7 Análise histomorfométrica e histopatológica

Os grupos sem periodontite experimental apresentaram ligamento periodontal dentro dos padrões de normalidade, com grande quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e discreto infiltrado inflamatório. As fibras colágenas encontravam-se interpostas e estavam inseridas no cemento e osso alveolar. O tecido ósseo na região de bifurcação, rico em osteócitos, apresentou crista regular com aposição de osteoblastos (Figura 19 A-D).

Os grupos com periodontite experimental e não tratados com HN019 apresentaram tecido conjuntivo com poucos fibroblastos, fibras colágenas desorganizadas e desconexas com a presença de edema intersticial e moderado infiltrado inflamatório crônico. Em algumas regiões, o tecido conjuntivo apresentou intenso infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos. O tecido ósseo e cemento radicular na região de bifurcação apresentaram contorno irregular e áreas de reabsorção (Figura 19 E-F).

Os grupos com periodontite experimental e tratados com HN019, quando comparados aos grupos com periodontite experimental não tratados com as respectivas bactérias, apresentaram tecido conjuntivo com maior quantidade de fibroblastos, menor presença de edema intersticial, menor infiltrado inflamatório e fibras colágenas mais organizadas e interpostas entre o osso alveolar e o cemento (Figura 19 G-H). O tecido ósseo

na região de bifurcação apresentou contorno regular e arquitetura em platô decorrente do processo de reabsorção óssea. O cemento radicular apresentou contorno regular e ausência de áreas de reabsorção. Imagens histológicas representativas dos tecidos periodontais de todos os grupos experimentais podem ser visualizadas na Figura 19.

As médias e desvios-padrão da área sem osso na região de bifurcação, bem como o resultado das comparações entre os grupos podem ser observados nas Figura 20.

Figura 19 - Tecidos periodontais na região de bifurcação do primeiro molar inferior dos grupos CS (**A, B**), CS-HN019 (**C, D**), DPS (**E, F**) e DPS-HN019 (**G, H**). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x (**A, C, G,** F); 20x (**B, D, F, H**). OA = osso alveolar; TF = teto da bifurcação; setas pretas = vasos sanguíneos; cabeça de seta preta preenchida = osteoblastos; asterisco = fibras colágenas desconexas com a presença de edema intersticial; cabeça de seta branca preenchida = cementoclastos; cabeça de seta não preenchida = fibras colágenas interpostas entre o osso alveolar e o cemento radicular.

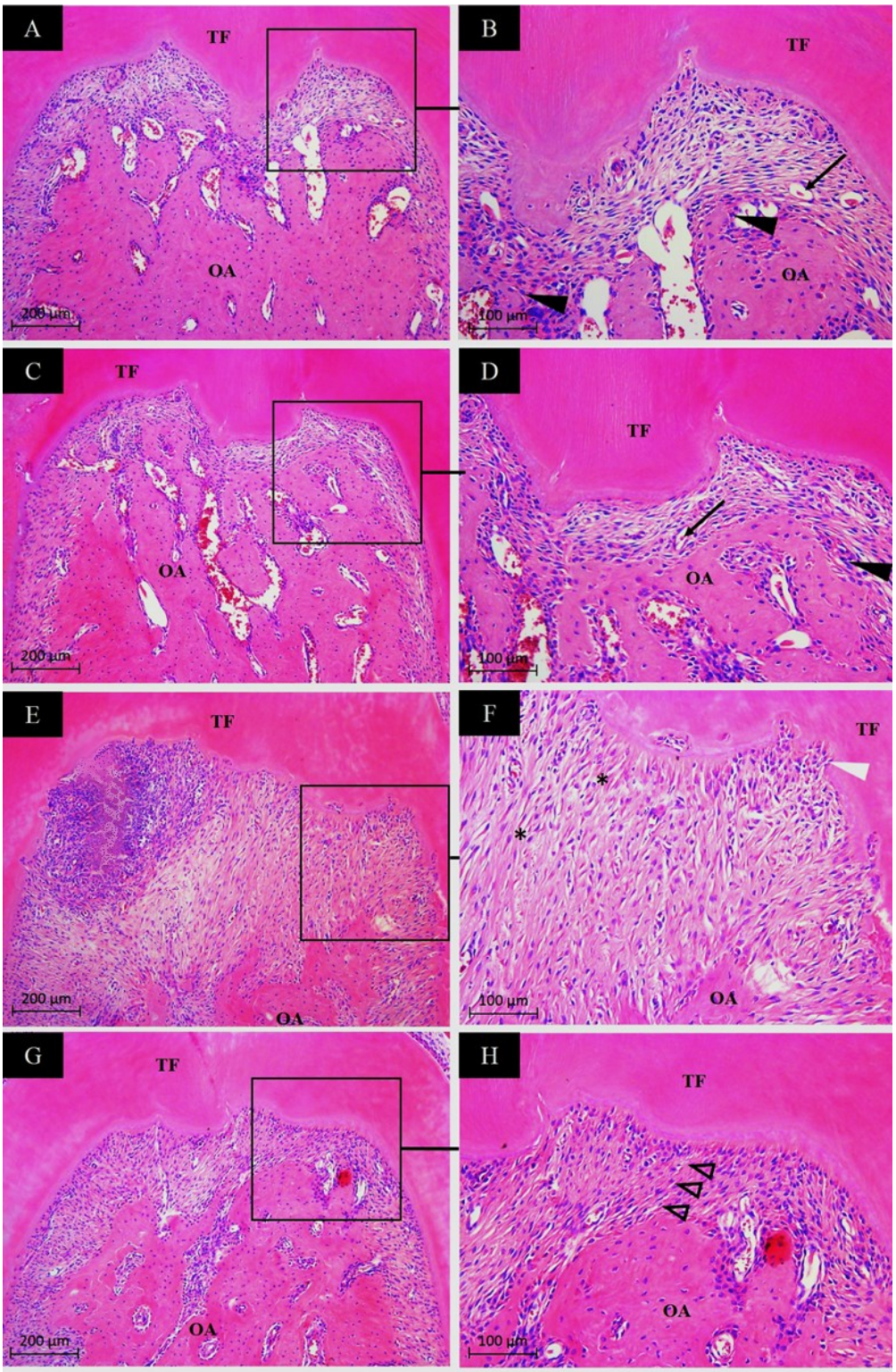
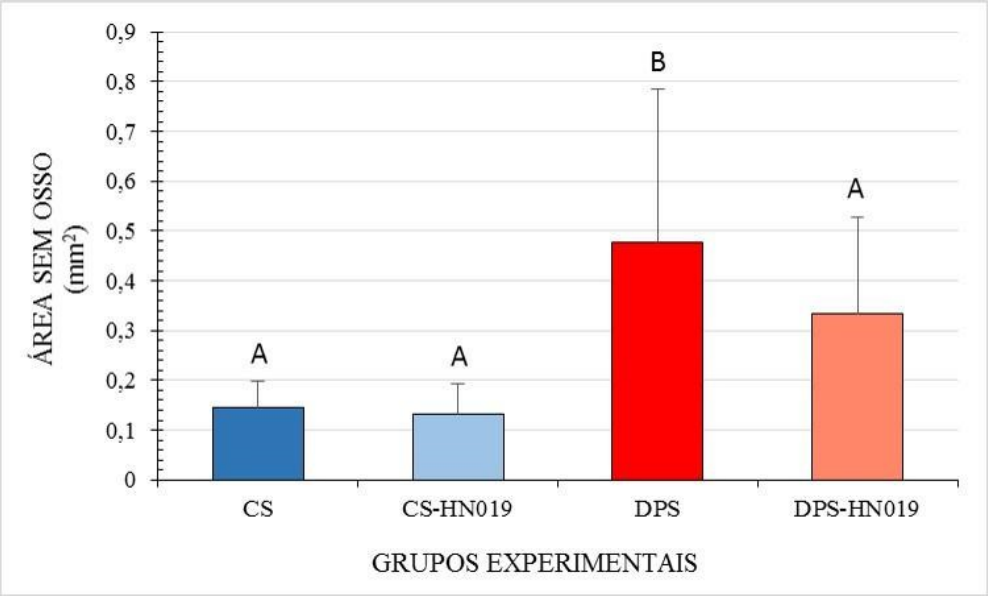


Figura 20- Médias e desvios-padrão da área sem osso (ASO) para os grupos CS, CS- HN019, DPS e DPS-HN019, com comparações entre os grupos. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).



6. Discussão

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo *in vivo* que avaliou os efeitos de *B. lactis* HN019, administrado sistemicamente, na prevenção e desenvolvimento da periodontite experimental em ratos. Considerando os dados microtomográficos e histomorfométricos, foi observada diminuição da perda óssea alveolar no grupo com periodontite experimental e tratado com probiótico (DPS-HN019) quando comparado ao grupo com periodontite experimental e sem tratamento com probiótico (DPS). A administração sistêmica prévia de probiótico reduziu em 10% a perda óssea alveolar nos animais que foram submetidos à indução da periodontite experimental. De fato, outros estudos em animais já demonstraram que a terapia probiótica pode ser efetiva na redução da perda óssea ocasionada pela periodontite experimental (OLIVEIRA et al. 2017, GATEJ et al. 2017, CARDOSO et al. 2020). Apesar dos resultados positivos, é importante destacar que a via e momento de administração da terapia probiótica podem impactar os resultados. Enquanto a terapia probiótia proporcionou uma redução de perda óssea alveolar de 10% em animais submetidos à indução da periodontite experimental, uma redução de 18% foi observada no estudo Oliveira et al. (2017). Neste estudo, os autores realizaram aplicações locais no momento de colocação das ligaduras para indução da periodontite experimental.

No presente estudo, o uso sistêmico de *B. lactis* HN019, de forma geral, não proporcionou alterações estatisticamente relevantes nos principais grupos bacterianos relacionados ao desenvolvimento da periodontite. Esse resultado microbiológico é bastante diferente daquele observado em estudo prévio de nosso grupo no qual foi realizada a aplicação tópica de *B. lactis* HN019 em sítios periodontais (OLIVEIRA et al., 2017). A aplicação tópica desta cepa bacteriana em sítios periodontais favoreceu o aumento de bactérias comensais e a redução de diversos periodontopatógenos (OLIVEIRA et al., 2017). De fato, a racionalidade para o uso de probióticos está fundamentada, principalmente, na sua habilidade em remodelar comunidades microbianas e, assim, promover o crescimento e sobrevivência de bactérias comensais potencialmente benéficas (WEICHERT et al., 2012). Ainda que as diferenças microbiológicas no aspecto quantitativo entre os grupos DPS-HN019 e DPS sejam discretas no presente estudo, é importante considerar que modulações qualitativas no biofilme podem ter ocorrido em função da menor perda de osso alveolar observada no grupo DPS-HN019 quando comparado ao grupo DPS. Ishikawa et al. (2020) demonstraram que probióticos podem reduzir a expressão de genes associados a fatores de virulência de *P. gingivalis* em modelos de biofilmes mono ou multi-espécies. Albuquerque-

Souza et al. (2019) demonstraram que bactérias probióticas podem modular a capacidade de *P. gingivalis* de aderir e invadir células epiteliais, além de regular a resposta imune inata. Invernici et al. (2020) demonstraram que *B. lactis* HN019 possui capacidade de se aderir a células epiteliais da mucosa bucal e reduz a adesão de *P. gingivalis*. Futuros estudos com análises de metaboloma e proteoma dos biofilmes formados nos animais tratados com probióticos serão interessantes para investigar essa hipótese de alterações qualitativas e não apenas quantitativas.

Um aumento significativo na quantidade de *B. lactis* HN019 foi observado nas amostras de biofilme dos animais após a administração da terapia probiótica (Grupos CS-HN019 e DPS-HN0190). Invernici et al. (2018) sugeriu uma possível translocação exógena de *B. lactis* HN019 para o biofilme subgengival, onde o grupo teste (*B. lactis* HN019) apresentou maior quantidade dessa bactéria mesmo 60 dias após descontinuação da terapia probiótica quando comparado ao controle (placebo). Esses resultados sugerem que a capacidade de *B. lactis* HN019 em interagir com a microbiota residente, além de sua capacidade de interação com células epiteliais da mucosa bucal como demonstrado por estudos prévios (HAUJIOKA et al. 2006; INVERNICI et al. 2020).

É importante destacar que probióticos podem modular a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e, dessa forma, atuarem no controle e prevenção da doença periodontal. Vários estudos já demonstraram que algumas citocinas, como interleucina IL-12, IL-1β, IFN-γ, IL-6 e TNF-α, estão envolvidas nas respostas imunes Th1 e induzem, principalmente, uma reação imunológica mediada por células. Em contraste, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 estão envolvidas nas respostas imunes Th2 e promovem imunidade humoral devido à produção de fatores de crescimento e diferenciação de células B (O'GARRA 1998, VAN DER BROEK et al. 2000, BELARDELLI e FERRANTINI 2002). Na DP, o perfil de citocinas pró-inflamatórias, principalmente mediado por IL-1β, TNF-a e INF-y, são determinantes para resposta destrutiva dos tecidos de suporte dentário, bem como, a ausência de citocinas antagônicas a esse processo, como IL-10 e IL-4, o que colabora para a perpetuação de um perfil inflamatório crônico no hospedeiro (RAMADAN et al., 2020). No presente estudo, foram demonstrados maiores níveis de IL-1β e TNFα em relação aos níveis de IL-10 e IL-4 no Grupo DPS quando comparado ao Grupo DPS-HN019. Os produtos característicos de citocinas das células Th1 e Th2 são mutuamente inibidores entre si para a diferenciação e funções efetoras do fenótipo recíproco. Assim, o IFN-γ inibe seletivamente a proliferação de células Th2, enquanto IL-4 e IL-10 inibem a síntese de citocinas pelas células Th1 (MOSMANN & SAD 1996, ESSNER et al. 1998). Todas essas citocinas desempenham um papel crucial nas respostas imunes e

inflamatórias, e o resultado da infecção pode ser atribuível ao equilíbrio na taxa relativa entre todas elas. Considerando os desfechos microtomográficos e histomorfométricos do presente estudo, pode-se inferir que no grupo DPS tenha ocorrido uma resposta predominantemente Th1, enquanto que no grupo DPS- HN019 uma resposta Th2 parece ter sido predominante e que exerceu um papel protetor na perda óssea alveolar.

No presente estudo também foi observada uma maior razão de IL-6 em relação aos níveis de IL-1β e TNFα no Grupo DPS quando comparado ao Grupo DPS-HN019. A IL-6 está envolvida na resposta de fase aguda, maturação das células B e diferenciação de macrófagos (DIEHL E RINCÓN, 2002). Entretanto, a literatura mostra que a IL-6 pode ter um efeito dual e controlar o perfil de diferenciação Th1/Th2 de acordo com as citocinas presentes no tecido. A IL-6 promove a diferenciação de Th2 e inibe simultaneamente a polarização de Th1 através de dois mecanismos moleculares independentes (DIEHL S. E RINCÓN , 2002). Dessa forma, a IL-6 parece estar favorecendo o perfil Th2 no grupo DPS-HN019 quando comparado ao grupo DPS. Ainda foi observado que o grupo DPS-HN019 apresentou uma maior razão de TGF- β/TNF-α e M-CSF/TNF-α quando comparado ao grupo DPS. Estudos demonstraram que TGF-β induz a polarização de macrófagos do tipo M2 que levaria a uma maior produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e atenuação do perfil pró-inflamatório (ZHANG et al., et al 2016). O M-CSF e o GM-CSF também induzem respostas opostas nos macrófagos. Enquanto o M-CSF direciona as células para um fenótipo anti-inflamatório, o GM-CSF promove um fenótipo pró-inflamatório (FLEETWOOD et al. 2009; MURRAY et al. 2014). Uma maior razão GRO/IL10 também foi observada no grupo DPS quando comparado ao grupo DPS-HN019. O CXCL1, também conhecido como GRO, é um forte quimioatraente para neutrófilos, que formam a primeira linha de defesa no sulco gengival (RAJARATHNAM et al. 2019; ATRI et al. 2018). Níveis aumentados de CXCL1 foram encontrados no fluido crevicular gengival (GCF) de locais periodicamente doentes, em comparação com locais saudáveis (KURTIS et al. 2005; SAKAI et al. 2006; GAMONAL et al. 2000). Todos esses dados, nos sugerem que os grupos DPS e DPS-HN019 apresentavam perfis imunoinflamatórios diferentes que levaram a uma maior destruição ou proteção na perda de osso alveolar.

Os resultados de expressão gênica mostraram maior expressão de FOXP-3 e menor expressão de INF-γ no grupo DPS-HN019 quando comprado ao grupo DPS. A FOXP3 mantém a tolerância do organismo a auto-antígenos, induzindo a diferenciação de Tregs e diminuindo a diferenciação de células Th17 o que poderia gerar um quadro hiper inflamatório. Dessa forma, a FOXP3 seria um controlador da inflamação (FASCHING et al.

2017). Em contrapartida, INF-y ajudaria no bloqueio de um perfil anti inflamatório (ESSNER et al. 1998). Esses dados sugerem que o perfil de resposta imunitária eram diferentes entre os grupos DPS e DPS-HN019 no tecido gengival.

A análise de citocinas diretamente relacionadas ao metabolismo ósseo demonstrou que o grupo DPS-HN019 apresentou razão RANKL/OPG significativamente menor quando comparado ao Grupo DPS. Esse resultado indica um efeito modulador da terapia probiótica nos processos de reabsorção e formação ósseas. Um aumento da razão RANKL/OPG favorece a reabsorção óssea por meio da osteoclastogênese e ativação de osteoclastos (KAJIYA et al., 2010). Esses resultados são corroborados por um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2017). É importante também ressaltar aqui que o grupo DPS-HN019 demonstrou menores níveis de TNF-α quando comparado ao grupo DPS. Durante o processo de reabsorção óssea ocorre o acoplamento entre RANK e o receptor de TNF-α (TNFr1), o que estimula a produção de RANK-L (ZHANG et al., 2001). De forma oposta a este mecanismo, as células B secretam OPG, um potente fator anti-osteoclastogênico que preserva a massa óssea (OZAKI et al., 2017). Esses resultados podem explicar os achados nos dados microtomográficos e histomorfométricos de menor reabsorção óssea no grupo DPS-HN019 quando comparado ao grupo DPS.

Os grupos tratados com *B. lactis* HN019 apresentaram maior expressão de BD nos tecidos periodontais do que aqueles não tratados. Esse resultado corrobora os achados prévios de nosso grupo em um estudo pré-clinico (OLIVEIRA et al., 2017) e clínico (Inivernici et al., 2020). De fato, os tecidos gengivais saudáveis apresentam maior expressão de BD-1, BD-2 e BD-3 do que os tecidos de sítios com periodontite (BRANCATISANO et al., 2001; LIU et al. 2014). No presente estudo, é possível que a exposição das células epiteliais ao *B. lactis* HN019, antes da indução da periodontite experimental e no decorrer do desenvolvimento da doença, tenha potencializado a expressão de BD. Essa hipótese pode ser aventada considerando que um aumento de BD-2 pode ocorrer quando células epiteliais gengivais são primeiramente expostas a bactérias benéficas ou comensais antes da exposição a periodontopatógenos (DOMMISCH et al., 2012). No presente estudo, a expressão de BD foi encontrada também em osteoblastos presentes nos tecidos de suporte periodontal. De fato, osteoblastos podem expressar BD quando estimulados por bactérias ou citocinas pró-inflamatórias (VAROGA et al., 2008; VAROGA et al., 2009). Nesse contexto, a maior expressão de BD nos grupos tratados com HN019 pode ser reflexo de uma ação antagonista dos peptídeos antimicrobianos ao processo de destruição óssea decorrente da inflamação. BD afetam a diferenciação e maturação de osteoblastos e podem, em casos de moderada

inflamação ou na presença de mediadores anti-inflamatórios, auxiliar na proteção do tecido ósseo (KRAUS et al., 2012). Além do mais, a BD-3 pode reduzir a resposta pró-inflamatória causada pela *P. gingivalis* (KOBAYASHI et al. 2017). Cui et al. (2017) demonstraram que BD-3 foi capaz de inibir o desenvolvimento da periodontite por meio da supressão da resposta inflamatória em macrófagos, reduzindo principalmente TNF-α.

Além dos possíveis efeitos diretos do probiótico HN019 sobre as células epiteliais da mucosa oral dos animais do presente estudo, pode-se aventar a hipótese de uma ação indireta de ambas as bactérias por meio da sensibilização de células da mucosa intestinal. Kobayashi et al. (2017) demonstraram que a administração de probióticos realizada por meio de gavagem promoveu a produção de BD em locais distantes, como na gengiva de camundongos. Ainda sobre a ação sistêmica de probióticos, Gatej et al. (2017) demonstraram que animais tratados previamente com probióticos por gavagem ou inoculação oral mostraram redução de marcadores de inflamação no soro. Os autores sugeriram uma possível ação preventiva de probióticos na reabsorção óssea alveolar, sendo essa ação parcialmente mediada pelos seus efeitos no intestino. No presente estudo, o grupo DPS demonstrou um maior perfil pró-inflamátorio sistêmico, caracterizado por valores aumentados nas razões IL-1B/IL-4 e IL-1B/IL-10 quando comparados àqueles do grupo DPS-HN019. Dessa forma, os resultados sugerem uma ação sistêmica de HN019 no perfil imunológico dos animais, o que pode ter indiretamente auxiliado na proteção dos tecidos periodontais contra os danos decorrentes da periodontite experimental. Uma análise do perfil microbiológico e imunoinflamatório do ambiente intestinal desses animais pode auxiliar na elucidação dos mecanismos sistêmicos da ação de probióticos nos tecidos periodontais.

Vale ressaltar que os efeitos dos probióticos são específicos à cepa e dependentes da dose em que são administrados (McFARLAND et al. 2018), e, portanto, os dados gerados no presente estudo não podem ser generalizados. Além disso, este trabalho apresenta limitações inerentes a um estudo experimental em ratos. Mais estudos envolvendo diferentes dosagens, regimes terapêuticos e vias de administração de B. lactis HN019, bem como avaliação dos efeitos sistêmicos da terapia (bacteremia e alterações na microbiota intestinal) são necessários. Novos estudos envolvendo técnicas de sequenciamento de DNA metagenômico e análise de transcriptoma serão úteis para avaliar o impacto da terapia probiótica no microbioma oral e intestinal e na resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro.

7. Conclusão

7. CONCLUSÃO

O uso sistêmico de *B. lactis* HN019 modifica os parâmetros imunoinflamatórios e microbiológicos, promovendo um efeito protetor contra a perda óssea alveolar em ratos com periodontite experimental.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Adriaens PA, DE BOEVER JA, LOESCHE WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. J Periodontol, 1988;(59):222–230.

2. Albuquerque-Souza E, Balzarini D, Ando-Suguimoto ES, Ishikawa KH, Simionato MR, Holzhausen M, Mayer MP. Probiotics alter the immune response of gingival epithelial cells challenged by Porphyromonas gingivalis. Journal of Periodontal Research, 2019; 54(2):115-127.

3. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. Int J Mol Sci, 2018;19:1801.

4. Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Anti-cytokine antibodies for rheumatic diseases. Curr Opin Investig Drugs. 2009;10(11):1204-11.

5. Bartold PM, Bois AH, Gannon S, Haynes DR, Hirsch RS. Antibacterial and immunomodulatory properties of azithromycin treatment implications for periodontitis. Inflammopharmacology. 2013;21(4):321-38.

6. Belardelli F, Ferrantini M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. Trends in Immunology, 2002;23:201–208.

7. Bello AE, Holt RJ. Cardiovascular Risk with Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: Clinical Implications. Drug Safety. 2014;(37):897–902.

8. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. Periodontol, 2000. 2011;55(1):36- 47.

9. Brancatisano, FL et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. J Dent Res, 2011;90:241–245.

10. Bron PA, van Baarlen P, Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. Nat Rev Microbiol. 2011;10(1):66-78.

11. Cardoso RS, Messora MR, Silva PHF, Oliveira LF, Leite-Panissi C, Salvador S, Furlaneto FAC. Effects of Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis. Beneficial Microbes, 2020;11(1):33-46.

12. Cross ML. Immune-signalling by orally-delivered probiotic bacteria: effects on common mucosal immunoresponses and protection at distal mucosal sites. Int J Immunopathol Pharmacol. 2004;17(2):127-34.

13. Cui D, Lyu J, Li H, Lei L, Bian T, Li L, Yan F. Human β-defensin 3 inhibits periodontitis development by suppressing inflammatory responses in macrophages. Molecular immunology, 2017;91:65-74.

14. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. Nat Rev Microbiol, 2010;8(7):481-90.

15. Daudt LD, Musskopf M L, Mendez M, Remonti LLR, Leitão CB, Gross JL, Oppermann RV. Association between met- abolic syndrome and periodontitis: A systematic review and meta- analysis. Brazilian Oral Research, 2018;24:32:e35.

16. Day RO, Graham GG. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). BMJ. 2013;346:f3195.

17. Di Paola R, Mazzon E, Muia C, Crisafulli C, Terrana D, Greco S, Cuzzocrea S. Effects of etanercept, a tumour necrosis factor-α antagonist, in an experimental model of periodontitis in rats. British journal of pharmacology, 2007:150(3):286-297.

18. Diaz PI, Hoare A, Hong B. Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. J Calif Dent Assoc, 2016;44(7):421-35.

19. Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. Mol Immunol. 2002;39(9):531-6.

20. Dommisch H, et al. Antimicrobial responses of primary gingival cells to Porphyromonas gingivalis. J Clin Periodontol, 2012;39(10):913-22.

21. Essner R; Rhoades K, Mcbride W H, Morton DL, Economou JS. Il- 4 down-regulates IL-1 and TNF gene expres- sion in human monocytes. Journal of Im- munology, 1998;142:3857–3861.

22. Fasching P, Stradner M, Graninger W, Dejaco C, Fessler, J. Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders. Molecules, 2017;22(1):134.

23. Feres M, Figueiredo L C. Soares GMS, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. Periodontology 2000. 2015;67(1):2015:131–186

24. Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. J. Leukoc. Biol. 2009;86:411–421.

25. Foureaux RC, Messora MR, Oliveira LFF, Napimoga MH, Pereira ANJ, Ferreira MS, Pereira LJ. Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. J Periodontol. 2014;85(7):975-83.

26. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. J Periodontol, 2000;7:1535–1545.

27. Gatej SM, Marino V, Bright R, Fitzsimmons TR, Gully N, Zilm P, Bartold PM. Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 2018;45(2):204-212.

28. Ghadimia D, Fölster-Holstb R, Vresea M, Winkler P, Hellerc KJ, Schrezenmeir J. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. Immunobiology. 2008;213(8): 677-692.

29. Giannelli M, Materassi F, Fossi T, Lorenzini L, Bani D. Treatment of severe periodontitis with a laser and light-emitting diode (LED) procedure adjunctive to scaling and root planing: a double-blind, randomized, single-center, split-mouth clinical trial investigating its efficacy and patient-reported outcomes at 1 year. Lasers in medical science, 2018;33:999-1002.

30. Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. Br Dent J. 2013;214(9):467-71.

31. Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. J. Dent. Res, 2019;98(2):148-156

32. Graves DT, Jiang Y, Genco C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. Curr. Opin. Infect. Dis., 2000;13:227–232.

33. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol, 1994;65:260-267.

34. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. Molecular Oral Microbiology, 2012;27(6):409–419.

35. Hajishengallis G, Moutsopoulos NM. Etiology of leukocyte adhesion deficiency-associated periodontitis revisited: Not a raging infection but a raging inflammatory response. Expert Rev. Clin. Immunol, 2014;10:973–975.

36. Hajishengallis G. Periodontitis: From microbial immune subver- sion to systemic inflammation. Nature Reviews Immunology, 2015;15(1):30–44.

37. Han JY, Reynolds MA. Effect of anti-rheumatic agents on periodontal parameters and biomarkers of inflammation: a systematic review and meta-analysis. J Periodontal & Implant Science. 2012;42(1):3-12.

38. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, Tenovuo J. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. Oral Microbiology and Immunology, 2006; 21(5):326–332.

39. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Calder PC. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2014;11(8):506.

40. Hirsch R, Deng H, Laohachai MN. Azithromycin in periodontal treatment: more than an antibiotic. J Periodontal Res. 2012;47(2):137-48.

41. Hoarau C, Martin L, Faugaret D, Baron C, Dauba A, Aubert-Jacquin C, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. PLoS One . 2008;3(7):e2753.

42. Hoffman FA. Business considerations in the development of probiotics. Clin Infect Dis. 2008;46(2):S141-3; discussion S144-51.

43. Hoo k, Mizoguchi C, Taketomo N, Ohshima T, Gomi K, Arai T, Maeda N. Distribution of salivary Lactobacillus and Bifidobacterium species in periodontal health and disease Biosci Biotechnol Biochem. 2007;71(1):152-7.

44. Huovinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin Infect Dis. 2001;32(11):1608-14.

45. Ikram S, Hassan N, Baig S, Borges KJJ, Raffat MA, Akram Z. 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. 2019;10(2):e12393.

46. Imran F, Das S, Padmanabhan S, Rao R, Suresh A, Bharath D. Evaluation of the efficacy of a probiotic drink containing Lactobacillus casei on the levels of periodontopathic bacteria in periodontitis: A clinico-microbiologic study. Indian J Dent Res. 2015;26(5):462-8.

47. İnce G, Gürsoy H, İpçi ŞD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yılmaz S. Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing Lactobacillus reuteri as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. J Periodontol. 2015;86(6):746-54.

48. Invernici MM, Furlaneto FAC, Salvador SL, Ouwehand AC, Salminen S, Mantziari A, Vinderola G, Ervolino E, Santana SI, Silva PHF, Messora MR. Bifidobacterium animalis subsp lactis HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. PLoS One, 2020;22;15(9):e0238425.

49. Invernici MM, Soares MSM, Souza SLS, Furlaneto FAC, Salvador SL, Cantarim, R, Taba Jr M, Messora MR, Silva PHF, Palioto DB, Novaes Jr AB. Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. J Clin Periodontol. 2018;45:1198 –1210.

50. Ishikawa KH, Mita D, Kawamoto D, Nicoli JR, Albuquerque-Souza E, Lorenzetti Simionato MR, Mayer MPA. Probiotics alter biofilm formation and the transcription of Porphyromonas gingivalis virulence-associated genes. Journal of oral microbiology, 2020;12(1):1805553.

51. Junick J, Blaut M. Quantification of human fecal bifidobacterium species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the groEL gene. Appl Environ Microbiol 2012;78(8):2613-22.

52. Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. J Oral Microbiol, 2010;2:5532.

53. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjus- ted 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, 2017;96(4):380-7.

54. Kawai T, Akira S. TLR signaling. Cell Death Differ. 2006;13(5):816-25.

55. Kobayashi R et al. Oral administration of Lactobacillus gasseri SBT2055 is effective in preventing Porphyromonas gingivalis-accelerated periodontal disease.Scientific Reports, 2017;7.

56. Kraus D, Deschner J, Jäger A et al. Human β-defensins differently affect proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblast-like MG63 cells. J Cell Physiol, 2012; 227:994–1003.

57. Kurtis B, Tuter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, Bal B. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in pa- tients with chronic and aggressive periodontitis. J Periodontol, 2005;76:1849–1855.

58. Laleman I, Yilmaz E, Ozcelik O, Haytac C, Pauwels M, Herrero ER 1, Slomka V, Quirynen M, Alkaya B, Teughels W. The effect of a streptococci containing probiotic in periodontal therapy: a randomized controlled trial. J Clin Periodontol. 2015;42(11):1032-41.

59. Lamster IB, Pagan M. Periodontal disease and the meta- bolic syndrome. *International Dental Journal*, 2016;67(2), 67–77.

60. Liu J, Chen J et al. The expression of hBDs in the gingival tissue and keratinocytes from healthy subjects and periodontitis patients. Arch Oral Biol, 2014;59(2):193-8.

61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 2001;25:402-408.

62. Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, Baddour LM. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: Does the evidence support an in- dependent association? Circulation, 2012;125(20):2520–2544.

63. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P and Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends in immunology, 2002;23:549-555.

64. McFarland Lynne V, Charlesnika TE, Goldstein EJC. Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: a systematic review and meta-analysis. Frontiers in medicine, 2018;124.

65. Messora MR, Oliveira LFF, Foureaux RC, Taba Jr. M, Zangerônimo MG, Furlanetto FAC, Pereira LJ. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. J Periodontol. 2013;84(12):1818-26.

66. Messora MR, Pereira LJ, Foureaux RC, Oliveira LFF, Sordi, CG, Alves, AJN, Napimoga MH, Nagata MJH, Ervolino E, Furlanetto FAC. Favourable effects of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis on experimental periodontitis in rats. Arch Oral Biol. 2016;66:108-19.

67. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogene- sis of periodontitis. Periodontology, 2015;69(1):7–17.

68. Miguel-Infante A, Martinez-Huedo MA, Mora-Zamorano E, Hernández-Barrera V, Jiménez-Trujillo I, de Burgos-Lunar C, Lopez-de-Andrés A. Periodontal disease in adults with dia- betes, prevalence and risk factors. Results of an observational study. International Journal of Clinical Practice, 2018;73(3):e13294.

69. Mombelli A et al. Efficient, minimally invasive periodontal therapy. An evidence based treatment concept. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2011;121(2):145-57.

70. Mombelli A et al. Persistence patterns of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia/nigrescens, and Actinobacillus actinomycetemcomitans after mechanical therapy of periodontal disease. J periodontol, 2000;71(1):14-21.

71. Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. Periodontology, 2000 2018;76(1):85-96.

72. Morales A, Carvajal P, Silva N, Hernandez M, Godoy C, Rodriguez G, Cabello R, Garcia-Sesnich J, Hoare A, Diaz PI, Gamonal J. Clinical Effects of Lactobacillus rhamnosus in Non-Surgical Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized Placebo-Controlled Trial With 1-Year Follow-Up. J Periodontol. 2016;87(8):944-52.

73. Mortaz E, Adcock IM, Folkerts G, Barnes PJ, Vos AP, Garssen J. Probiotics in the management of lung diseases. Mediators Inflamm. 2013;2013:751068.

74. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology Today, 1996;17:138–148.

75. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity, 2014;41(1):14–20.

76. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity, 1998;8:275–283.

77. Oliveira LFF, Salvador SL, Silva PHF, Furlaneto FAC, Figueiredo L, Casarin R, Ervolino E, Palioto DB, Souza SLS, Taba Jr M, Novaes Jr AB, Messora MR. Benefits of Bifidobacterium animalis subsp. lactis Probiotic in Experimental Periodontitis. J Periodontol. 2017;88(2):197-208.

78. Olsen I. Singhrao SK. Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? Journal of Oral Microbiology, 2015;7(1):29143.

79. Ozaki Y et al. Treatment of OPG-deficient mice with WP9QY, a RANKL-binding peptide, recovers alveolar bone loss by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis. PloS one, 2017;12(9):e0184904.

80. Patel RM, Denning PW. Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? Clin Perinatol. 2013;40(1):11-25.

81. Pattani R, Palda VA, Hwang SW, Shah PS. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile infection among hospitalized patients: systematic review and meta-analysis. Open Med. 2013;7(2):e56-67.

82. Penala S, Kalakonda B, Pathakota KR, Jayakumar A, Koppolu P, Lakshmi BV, Ruchi P, Mishra A. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of Lactobacillus reuteri probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. J Res Pharm Pract. 2016;5(2):86-93.

83. Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodon- tal therapy. A review of the literature. J Clin Periodontol, 2001;28:499-507.

84. Rajarathnam K, Schnoor M, Richardson RM, Rajagopal S. How do chemokines navigate neutrophils to the target site: dissect- ing the structural mechanisms and signaling pathways. Cell Signal, 2019;54:69–80.

85. Ramadan DE, Hariyani N, Indrawati R, Ridwan RD, Diyatri I. Cytokines and Chemokines in Periodontitis. Eur J Dent. 2020;14(3):483-495.

86. Ray WA, Murray KT, Hall K, Arbogast, PG, Stein, CM. Azithromycin and the risk of cardiovascular death. N Engl J Med. 2012;366(20):1881-90

87. Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metallopro- teinase activities in periodontitis as a treatment strategy. Periodontol, 2000:24:226–238.

88. Sakai A, Ohshima M, Sugano N, Otsuka K, Ito K. Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid using a cytokine antibody array. J Periodontol, 2006; 77:856–864.

89. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. J Clin Periodontol, 2005;32(6):108-29.

90. Salvi GE, Williams RC, Offenbacher S. Nonsteroidal anti- inflammatory drugs as adjuncts in the management of peri- odontal diseases and peri-implantitis. Curr Opin Periodon- tol, 1997;4:51–58.

91. Sampaio EDM. Azitromicina no tratamento da periodontite crônica acompanhamento de seis meses. [Mestrado]. Guarulhos: Universidade de Guarulhos, Faculdade de Odontologia; 2009.

92. Sánchez B, Urdaci MC, Margolles A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. Microbiology (Reading). 2010;156(Pt 11):3232-3242.

93. Silva N, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. J Appl Oral Sci, 2015;23:329-355.

94. Soares LG, Carvalho EB, Tinoco EMB. Clinical effect of Lactobacillus on the treatment of severe periodontitis and halitosis: A double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. Am J Dent. 2019;32(1):9-13.

95. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(6):352-62.

96. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. “Checkerboard" DNA-DNA hybridization. Biotech, 1994;17(4):788-92.

97. Teitelbaum JE, Walker WA. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. Annu Rev Nutr. 2002;22:107-38.

98. Tekce M, Ince G, Gursoy H, Ipci SD, Cakar G, Kadir T, Yılmaz S. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. J Clin Periodontol. 2015;42(4):363-72.

99. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of Lactobacillus reuteri probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. J Clin Periodontol. 2013;40(11):1025-35.

100. Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota?. J Clin Periodontol. 2011 Mar;38 Suppl 11:159-77.

101. Tlaskalová-Hogenová H , Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L., et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. Immunol Lett . 2004;93(2-3):97-108.

102. Tonetti MS, Van Dyke TE. Periodontitis and atheroscle- rotic cardiovascular disease: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. Journal of Clinical Periodontology, 2013;40:S24–S29.

103. Tribble GD, Lamont RJ. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. Periodontol, 2000. 2010;52(1):68–83

104. Tsubura S, Mizunuma H, Ishikawa S, Oyake I, Okabayashi M, Katoh K, Shibata M, Iizuka T, Toda T, Iizuka T. The effect of Bacillus subtilis mouth rinsing in patients with periodontitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Nov;28(11):1353-6.

105. Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, Bleich A, Bruder D, Franzke A, Rogler G, Suerbaum S. et al. Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. PLoS One. 2007 Dec 12;2(12):e1308.

106. Van der Broek M, Bachman MF, Kohler G, Barner M, Escher R, Zinkernagel R, Kopf, M. IL-4 and IL-10 antagonize IL-12 mediated protection against acute vaccinia virus infection with limited role of IFN-g and nitric oxide synthetase 2. Journal of Immunology, 2000;164:371–378.

107. Varoga D, Tohidnezhad M, Paulsen F et al. The role of human β-defensin-2 in bone. J Anat, 2008;213(6):749-757.

108. Varoga D, Wruck CJ, Tohidnezhad M, et al. Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human β-defensin-3. Histochem Cell Biol. 2009;131:207–218.

109. Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic Lactobacilli reuteri (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial otics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. J Oral Microbiol. 2010;2. Doi: 10.3402/jom.v2i0.5344.

110. Vuotto C, Longo F, Donelli G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. Int J Oral Sci. 2014;6(4):189-94.

111. Walker WA. Mechanisms of action of probiotics. Clin Infect Dis. 2008;46(2):S87-91; discussion S144-51.

112. Weichert S, Schroten H, Adam R. The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. The Pediatric infectious disease journal, 2012;31(8):859-862.

113. Zhang F, Wang H, Wang X, Jiang G, Liu H, Zhang G, Du J. TGF-β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. Oncotarget, 2016;7(32), 52294.

114. ZHANG YH et al. Tumor necrosis factor-α (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. Journal of Biological Chemistry, 2001;276(1):563-568.

115. Zhang Z, Zheng Y, Bian X. Clinical effect of azithromycin as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. J Periodontal Res. 2016;51(3):275-83.

116. Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of Escherichia coli Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. Cell Microbiol. 2007;9(3):804-16.

Anexos

ANEXO

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA

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

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

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado **"Efeitos da terapia com *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis HN019* e *Bdellovibrios bacteriovorus HD100* na Periodontite experimental em ratos: estudo do perfil microbiológico, imunológico, histológico e genético da resposta do hospedeiro",** Protocolo nº 2014.1.389.58.2, 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 reunião de 15/07/2014, com alterações aprovadas pela Comissão em 19/08/2015.

Vigência do Projeto	01/10/2014 a 01/10/2015
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de animais	184
Peso/Idade	250-300g/ 42 a 56 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 19 de agosto de 2015.

Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA- FORP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

CERTIFICATE CEUA – FORP/USP

We hereby certify that the project entitled **"Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis HN019* and *Bdellovibrios bacteriovorus HD100* on the experimental periodontitis in rats: microbiological, immunological, histological and generic features of the host response"** Protocol 2014.1.389.58.2 under the responsibility of Prof. Dr. Michel Reis Messora involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 15/07/2014, with mofifications approved in 19/08/2015.

Duration of the Project	01/10/2014 a 01/10/2015
Species/Lineage	Heterogenic rat/ Wistar
Nº of animals	184
Weight / age	250-300g/ 42-56 days
Gender	Male
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo

Ribeirão Preto, August 19th, 2015.

Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA- FORP/USP

ANEXO B - Artigo científico submetido para publicação no periódico *Journal of Periodontology*

Journal of Periodontology

JOURNAL OF Periodontology

Probiotic consumption can modify the resilience of periodontal tissues in rats under experimental periodontitis

Journal:	*Journal of Periodontology*
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Oliveira, Luiz; School of Dentistry, Lavras University Center - UNILAVRAS, Silva, Pedro; School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology Salvador, Sérgio; School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of São Paulo - USP, Department of Clinical Analyses Ervolino, Edilson; São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba; Department of Basic Science – Histology Division, SP, Brazil Casarin, Renato; School of Dentistry at Piracicaba, Prosthodontics and Periodontics Figueiredo, Luciene Cristina; Universidade Guarulhos, Periodontology Tavares, Milla; Universidade de Sao Paulo, Furlaneto, Flávia; Dental School of Araçatuba, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Division of Periodontics, Department of Surgery and Integrated Clinic Messora, Michel; University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto (FORP/USP), Department of Oral &Maxillofacial Surgery and Periodontology
Key Words:	Periodontitis, Host response, Probiotics, Immunology, Inflammation and innate immunity, Microbiology

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO C

Probiotics and Antimicrobial Proteins

Comparison between different delivery vehicles for the probiotic Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 on experimental periodontitis in rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PAAP-D-21-00203
Full Title:	Comparison between different delivery vehicles for the probiotic Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 on experimental periodontitis in rats
Article Type:	Original Research
Keywords:	Probiotic; periodontitis; rats; milk; water
Corresponding Author:	Michel Messora University of Sao Paulo Faculty of Dentistry of Ribeirao Preto: Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto Ribeirão Preto, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Sao Paulo Faculty of Dentistry of Ribeirao Preto: Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Luiz F. F. Oliveira, DDS, MS
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Luiz F. F. Oliveira, DDS, MS
	Giselle Aparecida da Silva, DDS
	Pedro H. F. Silva, DDS, MS
	André Luis Gomes Moreira, DDS, MS
	Sérgio L. Salvador, Pharm.D, PhD
	Adriano Gomes da Cruz, PhD
	Michel R. Messora
	Flávia A. C. Furlaneto, DDS, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Objective This study aimed to assess the effects of the probiotic (PROB) Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 in two different delivery vehicles in experimental periodontitis (EP). Methods 32 rats were assigned into groups: C (control), EP, EP-PROB/Water and EP-PROB/Milk. The probiotic was administered for four weeks, from baseline to euthanasia. Periodontitis was induced by ligatures 14 days after baseline. Data were statistically analyzed ($p<0.05$). Results Both probiotic groups presented higher bone volume and less bone porosity in the furcation area, and increased interproximal attachment level than group EP. Also, these parameters were significantly improved in the Milk group when compared with

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	the Water group. EP-PROB/Milk showed higher gene expression for IL-10 and lower for FOXP3 in relation to EP-PROB/Water and EP groups. Conclusion the use of milk was able to potentiate the protective effects of B. lactis HN019 in rats under EP.
Suggested Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation