



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

SANDRO ISAIÁS SANTANA

**Uso de probiótico multiespécies como recurso adjuvante no  
tratamento da mucosite peri-implantar: estudo clínico controlado  
e aleatorizado.**



Ribeirão Preto  
2020



**SANDRO ISAIÁS SANTANA**

**Uso de probiótico multiespécies como recurso adjuvante no  
tratamento da mucosite peri-implantar: estudo clínico controlado  
e aleatorizado.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Odontologia  
(Biologia Oral).

**Área de concentração:** Biologia Oral

**Orientador:** Prof. Dr. Michel Reis Messoria

**Ribeirão Preto**

**2020**

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

Assinatura do autor: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /2020

### **Catálogo da Publicação**

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

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

Santana, Sandro Isaías.

Uso de probiótico multiespécies como recurso adjuvante no tratamento da mucosite peri-implantar: estudo clínico controlado e aleatorizado. Ribeirão Preto, 2020.

187p.: 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: Biologia Oral.

Orientador: Messoria, Michel Reis

1. Mucosite. 2. Probiótico. 3. Implante dentário.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Santana SI. **Uso de probiótico multiespécies como recurso adjuvante no tratamento da mucosite peri-implantar: estudo clínico controlado e aleatorizado.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Biologia Oral).

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

### BANCA EXAMINADORA

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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



DEDICATÓRIA

---





Dedico este trabalho aos meus **pacientes**, cuja busca pela melhor qualidade de vida são a razão do meu empenho no exercício da Odontologia.

Aos meus filhos, **Natan** e **Breno**, combustíveis de minha vida.

À minha amada esposa, **Viviane**, meu porto seguro. Sempre apoiando e garantido condições para minha evolução profissional. Sem ela este trabalho não seria possível.



## AGRADECIMENTOS

---



À **Deus**, ao qual procuro honrar minha vida. Por guardar minha saúde física e mental. Por me proteger nas estradas entre tantas idas e vindas a Ribeirão Preto. Por olhar por minha esposa e filhos e assim me garantir tranquilidade para me dedicar a este trabalho.

À minha **esposa**, mulher forte, determinada, exemplo para mim. Sua firmeza me faz caminhar. Sua determinação não de deixa acovardar. Seu exemplo me faz melhor a cada dia.

Ao meu filho **Natan**, orgulho de minha vida. Batalhador que contagia. Tranquilidade que acalma. Abraço que me protege. Amor que acolhe.

Ao meu filho **Breno**, outro orgulho de minha vida. Menino inquieto por natureza, mente brilhante. Qualidades que transbordam e cativam. Como estudante de Odontologia, razão de eu me reinventar como profissional.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Michel Reis Messorá**, que em palavras não tenho como agradecer. Responsável por toda minha trajetória neste doutorado. Homem firme em seus propósitos, com clareza de ideias poucas vista. Meu agradecimento será levando sua filosofia de vida a diante, procurando ajudar as pessoas e melhorando todo ambiente que vivo.

Às minhas funcionárias, especialmente a **Keila, Helena e Raissa**, que com fidelidade infinita sempre se esforçaram para que eu tivesse condição de concluir este trabalho, valorizando cada detalhe e cuidando para que eu conseguisse tempo para a realização deste doutorado. Vocês foram essenciais.

Ao meu amigo **Luiz Fernando** que me muito contribuiu com meu trabalho através de longas conversas esclarecedoras e alentadoras.

Aos meu amigo **Pedro Henrique** que me ajudou diretamente na construção do conhecimento para elaboração desta tese. Sempre disposto a ajudar. Uma mente diferenciada que certamente muito contribuirá com a ciência.

À **Prof. Dra. Flávia Furlaneto** pela importante contribuição a este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Salvador** e a técnica de laboratório **Marina**, da área de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto, que realizaram o controle de viabilidade das cepas de probióticos.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** e ao **Programa de Pós-graduação em Biologia Oral**, por terem me acolhido como aluno e viabilizado a realização deste trabalho.

Aos **pacientes** que participaram deste estudo clínico, que tiveram disponibilidade para ajudar, calma para esperar a execução de todos atendimentos, determinação para seguir o tratamento e principalmente confiaram em mim.

Ao meu grande amigo **Prof. Átila**, que me deu o suporte necessário em nosso serviço de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial (CTBMF) do Hospital Universitário Alzira Velano (HUAV) para que eu pudesse me ausentar para os compromissos em Ribeirão Preto, mas que principalmente tem sido um grande amigo que conforta minha alma.

Ao meu amigo **Ulisses**, que para qualquer ajuda que seja sempre está lá.

Aos meus **alunos** do Curso de Especialização de CTBMF do HUAV, que sempre entenderam minha ausência quando eu tinha compromissos do doutorado.

À *Universidade José do Rosário Velano*, que não fez objeção quando foi necessário me ausentar para participar de atividades do doutorado.

E finalmente agradeço a todos aqueles que torcem por mim!





RESUMO

---



## RESUMO

Santana SI. **Uso de probiótico multiespécies como recurso adjuvante no tratamento da mucosite peri-implantar: estudo clínico controlado e aleatorizado.** 2020. 187f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O propósito deste estudo foi avaliar o efeito adjuvante da terapia probiótica no tratamento de indivíduos com mucosite peri-implantar. Em um estudo clínico aleatorizado, duplo-cego e placebo-controle, 36 indivíduos com mucosite peri-implantar foram tratados com o uso de probiótico multiespécies associado ao debridamento mecânico (Grupo Teste) ou apenas debridamento mecânico (Grupo Controle). No Grupo Teste, a sessão de tratamento foi concluída com uma aplicação tópica profissional de gel de carboximetilcelulose contendo  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019<sup>TM</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* HN001<sup>TM</sup> e *Lactobacillus paracasei* Lpc-37<sup>®</sup>. Os indivíduos receberam, então, cápsulas contendo  $10^9$  UFCs dos 3 microrganismos probióticos e foram instruídos a dissolverem o conteúdo das cápsulas em 20 mL de água para realizarem bochechos de 30 a 60 segundos, seguidos por deglutição, duas vezes ao dia, durante 12 semanas. O grupo Controle recebeu os mesmos procedimentos de debridamento mecânico e foi tratado com gel e pastilhas placebo. Parâmetros clínicos periodontais (Índice de placa modificado – IPM; Índice de Sangramento Sulcular Modificado – ISSm; Profundidade de Sondagem – PS e Sangramento à Sondagem – SS) foram avaliados no *baseline* (período pré-intervenção) e em 12 e 24 semanas após o debridamento mecânico inicial. Os dados obtidos foram estatisticamente analisados ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença, ao longo do tempo, para o percentual de IPM no grupo Teste. No grupo Controle, houve aumento significativo no percentual de IPM – escore 0, tanto nas comparações entre o *baseline* e 12 semanas como entre o *baseline* e 24 semanas ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre os grupos para os valores de IPM. No grupo Teste, o percentual de ISSm – escore 0 aumentou significativamente nas comparações entre o *baseline* e 12 semanas e entre o *baseline* e 24 semanas ( $p < 0,05$ ). O percentual de ISSm – escore 1 diminuiu de forma significativa nas comparações entre o *baseline* e 24 semanas no grupo Teste. Nenhuma outra mudança significativa ao longo do tempo (comparações intragrupos) foi observada nos grupos Teste e Controle. Nas comparações entre os grupos, observa-se que há maior percentual de ISSm – escore 0 no grupo Teste do que no grupo Controle em 24 semanas ( $p < 0,05$ ). Ainda, há maior percentual de ISSm – escore 1 (24 semanas) e ISSm – escore 2 (12 semanas) no grupo Controle do que no grupo Teste ( $p < 0,05$ ). Nos grupos Teste Controle, comparando os valores obtidos no *baseline* com aqueles de 24 semanas, a PS diminuiu significativamente, sendo que no grupo Controle esta diferença também foi observada nas comparações entre os valores de 12 semanas e aqueles do *baseline* ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre os grupos para os valores de PS em qualquer tempo experimental. Os valores de SS apresentaram diminuição significativa nas avaliações intragrupos, em ambos os tempos avaliados quando comparados ao *baseline*, tanto no grupo Teste como no grupo Controle ( $p < 0,05$ ). Em 12 e 24 semanas, os valores de SS foram menores no grupo Teste quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ). Em 24 semanas, 13 de 18 indivíduos do grupo Teste e apenas 6 de 18 indivíduos do grupo Controle apresentaram menos de 10% de SS ( $p < 0,05$ ). Pode-se concluir que a utilização da terapia probiótica como recurso adjuvante ao debridamento mecânico promove benefícios clínicos adicionais no tratamento de indivíduos com mucosite peri-implantar.

**Palavras-chave:** Mucosite; Probiótico; Implante dentário.



ABSTRACT

---



## ABSTRACT

Santana SI. **Use of multispecies probiotic as an adjuvant in the treatment of peri-implant mucositis: a randomized controlled trial.** 2020. 187p. (PhD Dissertation) – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2020.

The aim of this study was to assess the adjuvant effect of probiotic therapy on the treatment of patients with peri-implant mucositis. In a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial, 36 patients with peri-implant mucositis were treated with multispecies probiotic in association with mechanical debridement (test group) or with mechanical debridement only (control group). In the test group, the treatment session was concluded with a topical application of carboxymethyl cellulose gel containing  $10^9$  colony-forming units (CFUs) of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019<sup>TM</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* HN001<sup>TM</sup>, and *Lactobacillus paracasei* Lpc-37<sup>®</sup>. The patients received capsules containing  $10^9$  CFUs of the three probiotic microorganisms and were instructed to dissolve the capsule contents in 20 mL of water for mouth rinses during 30 to 60 seconds, followed by swallowing, twice a day, for 12 weeks. The control group was subjected to the same mechanical debridement procedures and treated with placebo gel and lozenges. Periodontal clinical parameters (modified plaque index – mPII; modified sulcus bleeding index – mSBI; probing depth – PD, and bleeding on probing – BOP) were assessed at baseline (pre-intervention period) and at 12 and 24 weeks after the initial mechanical debridement. The data were statistically analyzed ( $p < 0.05$ ). There was no difference over time in mPII in the test group. There was a significant increase in mPII in the control group – score 0, both in the comparisons between baseline and 12 weeks and between baseline and 24 weeks ( $p < 0.05$ ). No significant differences in mPII were observed in the comparisons between the groups. In the test group, mSBI – score 0 increased significantly in the comparisons between baseline and 12 weeks and between baseline and 24 weeks ( $p < 0.05$ ). Also in the test group, mSBI – score 1 decreased significantly in the comparisons between baseline and 24 weeks. No other significant change was observed over time (within-group comparisons) in the test and control groups. In the between-group comparisons, there was a higher mSBI – score 0 in the test group than in the control group at 24 weeks ( $p < 0.05$ ). Also, there was a higher mSBI – score 1 (at 24 weeks) and mSBI – score 2 (at 12 weeks) in the control group than in the test group ( $p < 0.05$ ). In the test and control groups, when comparing the baseline values with those obtained at 24 weeks, PD decreased significantly, and this difference was also observed in the control group between baseline values and those at 12 weeks ( $p < 0.05$ ). No significant differences were noted in the comparisons between the groups regarding PD in any time period. BOP decreased significantly in the within-group comparisons in both time periods assessed when compared with baseline, both in the test and control groups ( $p < 0.05$ ). At 12 and 24 weeks, BOP was lower in the test group than in the control group ( $p < 0.05$ ). At 24 weeks, 13 out of 18 patients from the test group and only 6 out of 18 patients from the control group had less than 10% of BOP ( $p < 0.05$ ). It may be concluded that the use of probiotic therapy as an adjuvant in mechanical debridement provides additional clinical benefits in the treatment of patients with peri-implant mucositis.

**Keywords:** Mucositis; Probiotic; Dental implant.





## LISTA DE FIGURAS

---



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Tratamento clínico da mucosite peri-implantar. A: sondagem peri-implantar acompanhada de sangramento em implante apresentando mucosite; B: debridamento mecânico do mini pilar de implante com mucosite. Observa-se a presença de biofilme no mini pilar próximo à cureta de teflon utilizada para a instrumentação; C: coquetel de probióticos liofilizados pronto para ser misturado com o veículo carboximetilcelulose; D: aplicação tópica do coquetel de probióticos associado à carboximetilcelulose ao redor de implantes dentários com mucosite..... 67
- Figura 2 -** Fluxograma do estudo clínico..... 71
- Figura 3 -** Percentuais de Índice de Placa Modificado (IPM) (escores 0, 1, 2 e 3) e desvios-padrão para os grupos Teste e Controle no *baseline*, bem como em 12 e 24 semanas. \* e <sup>x</sup> indicam diferenças significativas nas comparações intragrupos. Símbolos iguais sobre as colunas indicam diferenças significativas nas comparações entre os tempos em um mesmo escore de IPM (Teste de Friedman seguido pelo Teste post hoc de comparações múltiplas de Dunn,  $p < 0,05$ )..... 73
- Figura 4 -** Percentuais de Índice de Sangramento Sulcular Modificado (ISSm) (escores 0, 1, 2 e 3) e desvios-padrão nos grupos Teste e Controle no *baseline*, bem como em 12 e 24 semanas. #, + e <sup>x</sup> indicam diferenças significativas nas comparações intragrupos. Símbolos iguais sobre as colunas indicam diferenças significativas nas comparações entre os tempos em um mesmo escore de ISSm (Teste de Friedman seguido pelo Teste post hoc de comparações múltiplas de Dunn,  $p < 0,05$ ). \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças significativas nas comparações intergrupos. Símbolos iguais sobre as colunas indicam diferenças significativas nas comparações entre os grupos considerando um mesmo escore de ISSm e mesmo tempo de análise (Teste Mann-Whitney,  $p < 0,05$ )..... 74
- Figura 5 -** Variação percentual média do sangramento à sondagem, de 12 para 24 semanas, nos grupos Teste e Controle. \* diferença significativa quando comparado ao grupo Controle (Teste Mann-Whitney,  $p < 0,05$ )..... 77

- Figura 6** – Variação média dos valores de profundidade de sondagem (PS) (mm), de 12 para 24 semanas, nos grupos Teste e Controle. \*diferença significativa quando comparado ao grupo Controle (Teste Mann-Whitney,  $p < 0,05$ )..... 77
- Figura 7** – Número de indivíduos com menos de 10% de sangramento à sondagem (SS) e com mais de 10% de SS nos grupos Teste e Controle, 12 semanas após o tratamento de implantes com mucosite (Teste de Fisher,  $p = 0,6267$ )..... 78
- Figura 8** – Número de indivíduos com menos de 10% de sangramento à sondagem (SS) e com mais de 10% de SS nos grupos Teste e Controle, 24 semanas após o tratamento de implantes com mucosite (Teste de Fisher,  $p = 0,005$ )..... 79
- Figura 9** – Número de indivíduos dos grupos Teste e Controle diagnosticados com e sem mucosite peri-implantar em 12 e 24 semanas pós-operatórias, considerando para a análise apenas os implantes que não apresentaram qualquer sangramento à sondagem (SS) no início do estudo. \*diferença estatística significativa quando comparado ao grupo Controle na mesma coluna (Teste de Fisher,  $p = 0,0489$ )..... 79

## LISTA DE TABELAS

---



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características demográficas da amostra no *baseline* de acordo com os grupos experimentais..... 72
- Tabela 2** - Médias e desvio-padrão dos valores de PS e SS, bem como as mudanças ocorridas nesses valores em 12 e 24 semanas quando comparados àqueles do *baseline* ( $\Delta$  12-0 /  $\Delta$  24-0) nos grupos Teste e Controle..... 76





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SS - Supuração à sondagem  
EFP - *European Federation of Periodontology*  
EAO - *European Association for Osseointegration*  
LPS - Lipopolissacarídeos  
IL- Interleucina  
TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral-alfa  
IP - Índice de placa  
ON - Óxido nítrico  
MMP- Metaloproteinase da matriz  
PS - Profundidade de sondagem  
IGM - Índice gengival modificado  
ISSm - Índice de sangramento sulcular modificado  
FORP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto  
USP - Universidade de São Paulo  
UFC - Unidades formadoras de colônias  
AMC - Altura de mucosa ceratinizada  
ON - Óxido nítrico  
PCR - Reação em cadeia da polimerase  
ATCC - American Type Culture Collection  
UFC - Unidades formadoras de colônias  
TFDa - Terapia Fotodinâmica antimicrobiana  
 $\alpha$  - Alfa  
 $\beta$  - Beta  
 $\geq$  - Maior ou igual  
mm - Milímetro  
 $\Delta$  - Delta  
DP = Desvio padrão  
™ - Marca comercial  
® - Marca registrada  
% - Porcentagem  
< - Menor



## SUMÁRIO

---



## SUMÁRIO

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                | <b>41</b> |
| 1.1 Doença peri-implantar – etiologia, diagnóstico, prevalência e tratamento .....                        | 43        |
| 1.2 Probióticos – definição e mecanismos de ação .....                                                    | 48        |
| 1.3 Probióticos e saúde periodontal.....                                                                  | 49        |
| 1.4 Probióticos no tratamento de doenças peri-implantares.....                                            | 51        |
| 1.5 Justificativa.....                                                                                    | 55        |
| <br>                                                                                                      |           |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                                                                 | <b>57</b> |
| 2.1 Objetivo Geral.....                                                                                   | 59        |
| 2.2 Objetivo Específico.....                                                                              | 59        |
| <br>                                                                                                      |           |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                                                        | <b>61</b> |
| 3.1 Consentimento para a pesquisa .....                                                                   | 63        |
| 3.2 Cálculo do tamanho da amostra .....                                                                   | 63        |
| 3.3 Seleção dos indivíduos .....                                                                          | 63        |
| 3.4 Delineamento do estudo: aleatorização, alocação, ocultação da alocação e protocolo de tratamento..... | 64        |
| 3.5 Calibração do examinador.....                                                                         | 65        |
| 3.6 Monitoramento clínico .....                                                                           | 66        |
| 3.7 Tratamento da mucosite peri-implantar e cuidados de manutenção.....                                   | 66        |
| 3.8 Variáveis de resultado .....                                                                          | 67        |
| 3.9 Análise estatística .....                                                                             | 68        |
| <br>                                                                                                      |           |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....                                                                                | <b>69</b> |
| 4.1 Monitoramento clínico .....                                                                           | 72        |
| 4.1.1 Análise de IPM e ISSm.....                                                                          | 72        |
| 4.1.2 Análise de PS e SS .....                                                                            | 74        |
| 4.2 Significância clínica dos tratamentos realizados – resolução da inflamação .....                      | 78        |
| 4.3 Acompanhamento de novos casos de mucosite peri-implantar.....                                         | 79        |
| <br>                                                                                                      |           |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....                                                                                 | <b>81</b> |
| <br>                                                                                                      |           |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....                                                                                 | <b>91</b> |

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS .....</b> | <b>95</b> |
|--------------------------|-----------|

|                     |            |
|---------------------|------------|
| <b>ANEXOS .....</b> | <b>109</b> |
|---------------------|------------|

|                                                            |     |
|------------------------------------------------------------|-----|
| ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ..... | 111 |
|------------------------------------------------------------|-----|

|                                               |     |
|-----------------------------------------------|-----|
| ANEXO 2 – Parecer Consubstanciado do CEP..... | 114 |
|-----------------------------------------------|-----|

|                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ANEXO 3 – Artigo Científico Submetido para Publicação no Periódico Journal of Clinical Periodontology..... | 117 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ANEXO 4 – Artigo Científico Submetido para Publicação no Periódico Journal of Clinical Periodontal Research ..... | 139 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ANEXO 5 – Artigo Científico Submetido para Publicação no Periódico Journal of Plos One ..... | 159 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|



## 1. INTRODUÇÃO

---



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença peri-implantar – etiologia, diagnóstico, prevalência e tratamento

Nos últimos 50 anos, o uso de implantes dentários evoluiu de um tratamento experimental para uma opção terapêutica altamente previsível na Odontologia, capaz de substituir dentes perdidos e suportar próteses (BUSER et al., 2017). Atualmente, a terapia com implantes é a primeira escolha para reabilitar elementos dentários perdidos, desde que devolve ao paciente, eficientemente, a função e a estética (SANTAMARIA, 2012).

O conceito de osseointegração foi desenvolvido por BRANEMARK em meados da década de 1960 (ESPOSITO et al., 1998; ADELL et al., 1981). Ela pode ser definida como uma conexão direta, estrutural e funcional entre um implante e o tecido ósseo, sem a ocorrência de crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante (VASCONCELOS et al., 2008; ADELL et al., 1981). A estabilidade primária do implante é considerada um pré-requisito para a osseointegração bem-sucedida, sendo influenciada pela arquitetura óssea do local de instalação do implante (INSUA et al., 2017). Para que o processo de osseointegração seja considerado bem sucedido, alguns critérios devem ser atendidos no que se refere à função (capacidade de mastigar), fisiologia do tecido (presença e manutenção de osseointegração, ausência de dor e outros processos patológicos) e satisfação do usuário (estética e ausência de desconforto) (ESPOSITO et al., 1998).

A previsibilidade da osseointegração tem sido bem documentada em estudos longitudinais (BRANEMARK et al., 1977; TERRY & GELLER, 2014). Contudo, tem sido relatado que complicações podem ocorrer, devido a infecções ou a sobrecarga biomecânica (PELLIZZER et al., 2014). As falhas biológicas ocorrem quando alguma alteração no sítio hospedeiro dificulta o estabelecimento ou manutenção da osseointegração. O hábito de fumar, irradiação, diabetes, doença periodontal, osteoporose, idade e qualidade óssea inadequada são os principais fatores que têm sido associados a alterações na osseointegração (ZAVANELLI et al., 2011). Dessa forma, o controle de fatores predisponentes locais e sistêmicos é fundamental para a preservação da osseointegração já obtida (BARBOSA et al., 2006). O sucesso do tratamento em longo prazo depende da manutenção de tecidos moles e duros saudáveis ao redor dos implantes dentários (ESPOSITO et al., 2012).

A mucosa peri-implantar tem uma série de características semelhantes e também algumas diferenças em relação aos tecidos gengivais em torno dos dentes. É composta por um epitélio oral queratinizado voltado para a cavidade bucal. Em contato com o pilar, por meio de hemi-desmossomos, há o epitélio juncional peri-implantar (ou epitélio de barreira), que cria

uma barreira mecânica justaposta ao implante (BERGLUNDH et al 1991; TEUGHELIS et al., 2006; WELANDER et al., 2008). Apicalmente ao tecido epitelial de barreira, há o tecido conjuntivo em contato direto com a superfície do pilar, com aproximadamente 1,5 mm de altura. As fibras colágenas originadas da crista óssea são paralelas à superfície do implante, não havendo inserção das mesmas no pilar, como ocorre nos dentes, o que torna as reabilitações implanto-suportadas mais suscetíveis à inflamação gerada pelo acúmulo de placa bacteriana (LINDHE et al., 1992). Comparando o tecido conjuntivo ao redor dentes com aquele ao redor de implantes, existe uma quantidade maior de estruturas vasculares e de fibroblastos ao redor dos dentes, enquanto que prevalecem as fibras colágenas no tecido conjuntivo supra-alveolar ao redor de implantes (LINDHE et al., 2015). O suprimento vascular dos tecidos gengivais ocorre a partir de fontes vasculares independentes: os largos vasos sanguíneos supraperiosteais e os plexos vasculares do ligamento periodontal e do osso alveolar. Por outro lado, ao redor dos implantes, estudo em cães (BERGLUNDH et al., 1994) demonstrou que a nutrição sanguínea vem exclusivamente dos grandes vasos supraperiosteais do lado externo do rebordo alveolar. O tecido conjuntivo da inserção transmucosa de implantes contém apenas poucos vasos sanguíneos, todos identificados como ramos terminais dos grandes vasos supraperiosteais.

Após a instalação dos componentes protéticos, uma microbiota anaeróbia subgengival, predominantemente Gram-negativa, é estabelecida em suas superfícies (LEONHARDT et al., 1999). Esta agregação bacteriana em contato com a mucosa peri-implantar pode levar à inflamação dos tecidos peri-implantares e conseqüentemente à perda óssea (RENVERT et al., 2018). As doenças peri-implantares são uma importante preocupação na Odontologia atual. Com a expansão da prática da Implantodontia e um número crescente de implantes instalados anualmente, a prevalência das doenças peri-implantares tem aumentado consideravelmente. As manifestações clínicas podem ser classificadas como mucosite peri-implantar e peri-implantite, correspondentes à gengivite e à periodontite, respectivamente (VALENTE & ANDREANA, 2016; BERGLUNDH et al., 2018).

A relação de causa e efeito entre a placa bacteriana e a gengivite foi demonstrada durante a década de 1960, em um estudo experimental com estudantes de Odontologia (LOE et al., 1965). Trinta anos depois, um estudo semelhante demonstrou que, com acúmulo de placa bacteriana em torno de implantes por 3 semanas, pode ocorrer a mucosite peri-implantar (PONTORIERO et al., 1994). Estudos histológicos envolvendo tecidos moles mostraram que as infiltrações inflamatórias na mucosa em torno de implantes e na gengiva em torno de dentes naturais apresentam muitas características comuns (BERGLUNDH et al., 1992;

ERICSSON et al., 1992; TREJO et al., 2006). No entanto, quando a placa bacteriana permanece presente por mais tempo (3 meses, por exemplo), a infiltração inflamatória na mucosa peri-implantar é quase três vezes maior do que aquela na unidade dento-gengival (ERICSSON et al., 1992; HEITZ-MAYFIELD & LANG, 2010). Estudos em modelos animais também mostraram perda óssea ao redor de implantes com acúmulo de placa induzida por ligadura (HURZELER et al., 1995; MARINELLO et al., 1995; PERSSON et al., 1996; ISIDOR, 1997; JI et al., 2014).

A formação de um biofilme complexo na superfície do implante desencadeia uma resposta imuno-inflamatória nos tecidos do hospedeiro que pode resultar na destruição dos tecidos peri-implantares. A existência de um histórico de periodontite e de inacessibilidade para medidas de higiene bucal tem sido fortemente associadas a um maior risco para o desenvolvimento de doenças peri-implantares (SCHWARZ et al 2018; BERGLUNDH et al 2018). Outros fatores de risco também tem sido associados, mas com evidência ainda limitada, incluindo: tabagismo, *diabetes mellitus*, coroas com sobre contorno, adaptação coroa/pilar inadequada, leito receptor infectado, remanescentes de cimento odontológico submucoso, ausência de mucosa ceratinizada, sobrecarga oclusal, necrose óssea por compressão, superaquecimento, micro movimentação, biocorrosão e partículas residuais de titânio (RENVERT & POLYZOIS 2015; QUIRYNEN & VOGELS, 2002; LINKEVICIUS et al., 2013; RIBEN-GRUNDSTROM, 2015; SCHWARZ et al 2018; BERGLUNDH et al 2018).

A maioria dos métodos de diagnóstico convencionalmente utilizados na Periodontia foram adotados por clínicos e pesquisadores para diagnosticar doenças peri-implantares, bem como para avaliar o estado de saúde dos tecidos peri-implantares. Estes métodos incluem exames clínicos, radiográficos e laboratoriais. A sonda periodontal tem sido uma ferramenta inestimável ao longo dos anos na avaliação do estado clínico e da profundidade da bolsa periodontal e do nível da crista marginal da mucosa. A presença de sangramento ou supuração após a sondagem são marcadores clínicos padrão para o diagnóstico da doença (RENVERT et al., 2018).

A mucosite peri-implantar caracteriza-se como uma inflamação da mucosa, apresentando sangramento à sondagem (SS) e/ou supuração à sondagem, podendo ou não apresentar sinais clínicos de inflamação, como eritema e edema, em torno de um componente protético (YU et al., 2016; BERGLUNDH et al 2018). É importante considerar que as manifestações clínicas da mucosite peri-implantar, assim como ocorre na gengivite, variam em função de fatores relacionados ao paciente, como *diabetes mellitus* descontrolado,

tabagismo e genética (BERGLUNDH et al 2018). Nenhuma das declarações de consenso da *European Federation of Periodontology* (EFP) ou *European Association for Osseointegration* (EAO) relata quaisquer dados específicos sobre qual profundidade de sondagem devemos considerar para diagnosticar mucosite peri-implantar ou peri-implantite. Enquanto o diagnóstico de mucosite peri-implantar está fundamentado na presença ou ausência de SS, o diagnóstico de peri-implantite fundamenta-se na perda óssea progressiva (LINDHE et al., 2008; LANG et al., 2011; VALENTE & ANDREANA, 2016).

Em relação à prevalência das doenças peri-implantares, há dados controversos na literatura. De qualquer forma, a doença peri-implantar é altamente prevalente: 80% de todos os indivíduos com implante dentário e 50% de todos os implantes instalados apresentam mucosite peri-implantar (FLICHY-FERNANDEZ, 2015). De acordo com o estudo publicado por Zitzmann e Berglundh (2008), 28 a 56% de todos os indivíduos com implante dentário e 12 a 43% de todos os implantes apresentam peri-implantite.

Duas meta-análises investigaram a prevalência de doenças peri-implantares. No estudo de Atieh et al. (2013), a prevalência estimada de peri-implantite foi de 9,6% considerando o implante e de 18,8% quando considerado o indivíduo como unidade estatística. A prevalência estimada de mucosite peri-implantar foi de 30,7% considerando o implante e de 63,4% considerando o paciente. Este trabalho incluiu estudos com um período de acompanhamento de pelo menos cinco anos, o que limitou o tamanho da amostra (9 estudos). Em outra meta-análise (DERKS & TOMASI, 2015), considerando o indivíduo como unidade estatística, a prevalência estimada de peri-implantite e mucosite peri-implantar foi de 22% e 43%, respectivamente (LEE et al., 2017).

A mucosite peri-implantar pode representar um estágio precursor da peri-implantite (HEITZ-MAYFIELD et al., 2011; LANG et al., 2011). Portanto, o diagnóstico precoce e a intervenção são de grande importância clínica no manejo de infecções peri-implantares (JI et al., 2014). A mucosite peri-implantar, em conjunto com a falta de adesão aos cuidados de manutenção, foi associada a uma maior incidência de peri-implantite durante um período de acompanhamento de 5 anos (SALVI et al., 2017). Costa et al. (2012) demonstraram uma incidência de peri-implantite de 18% no grupo de indivíduos com cuidados de manutenção e 43,9% no grupo sem os devidos cuidados.

O objetivo primário do tratamento das doenças peri-implantares é a eliminação do biofilme da superfície do implante. Um eficiente debridamento mecânico é difícil de ser obtido, mas fundamental no tratamento de infecções em implantes dentários. A interface implante/pilar é um reservatório bacteriano (COSYN et al., 2011; JERVOE-STORM et al.,

2015). A supra estrutura protética geralmente dificulta a limpeza efetiva em torno da plataforma do implante pelo paciente. O uso das terapias mecânicas convencionais, adotadas para o tratamento da doença periodontal, apresenta limitações para controlar as infecções peri-implantares, uma vez que um bom acesso à área de interesse para efetiva descontaminação pode ser bastante difícil (SERINO & STROM, 2009).

Poucos estudos clínicos investigaram protocolos para o tratamento da mucosite peri-implantar (HEITZ-MAYFIELD & LANG 2004; RENVERT et al., 2008; MAXIMO et al., 2009; THONE-MUHLING et al., 2010; HEITZ-MAYFIELD et al., 2011). Embora melhoras em parâmetros clínicos possam ser obtidas por meio do debridamento mecânico, ainda permanece uma proporção bastante elevada de sítios com bolsa profunda e SS após o tratamento. Os métodos auxiliares, como o uso de enxaguatório bucal e aplicação de gel antisséptico local não promoveram benefícios adicionais ao tratamento mecânico convencional (CIANCIO et al., 1995; STROOKER et al., 1998; PORRAS et al., 2002; LINDHE & MEYLE, 2008; THONE-MUHLING et al. 2010; HEITZ-MAYFIELD et al., 2011).

O tratamento das doenças peri-implantares visa alterar o microbioma bucal de forma que a microbiota residente na superfície do implante seja compatível com a saúde dos tecidos do hospedeiro e, assim, o sistema imunológico do hospedeiro tenha potencial para eliminar eficazmente os patógenos putativos (RENVERT et al., 2018). Nessas premissas, um tratamento eficaz da peri-implantite deve atingir um objetivo duplo: (i) reduzir a proporção de bactérias não compatíveis com saúde e (ii) inativar lipopolissacarídeos (LPS) presentes na interface de titânio com os tecidos do hospedeiro (RENVERT et al., 2009). Esse duplo objetivo visa promover reverter a disbiose do microbioma bucal para um estado de eubiose.

A ruptura do estado harmônico (eubiose) do microbioma bucal é tratada como disbiose. Um microbioma disbiótico pode não desempenhar funções vitais, como fornecimento de nutrientes, produção de vitaminas e proteção contra patógenos (GUARNER & MALAGELADA, 2003). A periodontite é uma doença polimicrobiana inflamatória disbiótica com um impacto direto na saúde do hospedeiro (MESSORA et al., 2017). O conceito de que as doenças periodontais surgem como resultado de perturbações ambientais foi resumido na hipótese da placa ecológica (MARSH, 2003). Este conceito é sustentado por dois pilares: 1) a seleção de bactérias patogênicas está diretamente associada a alterações no ambiente e 2) as doenças não necessitam de um agente etiológico específico, uma vez que qualquer agente pode contribuir para o curso da doença (BIZZINI et al., 2012). De forma

semelhante, a patogênese das doenças peri-implantares também está diretamente ligada a um estado de disbiose do microbioma bucal.

Estudos recentes têm proporcionado melhor entendimento sobre o surgimento e a persistência de comunidades microbianas bucais disbióticas capazes de desencadear doenças inflamatórias em sítios próximos de sua ocorrência e, até mesmo, em sítios distantes (DARVEAU, 2010; HAJISHENGALLIS, 2015). Dessa forma, estratégias que visam modificar a composição do biofilme, proporcionando a conversão de um estado disbiótico para um estado de homeostase, como o uso de probióticos, podem ser uma abordagem promissora para modular as interações entre bactérias e hospedeiro com consequente repercussão na prevenção e/ou tratamento das doenças infecciosas bucais. Estas novas abordagens visam, diferentemente de antibióticos, reduzir a capacidade de patógenos em causar doenças e manter uma microbiota comensal livre de prejuízos (MESSORA et al., 2017). Em 2015, os agentes patogênicos resistentes aos antibióticos causaram mais de 50.000 mortes na Europa e nos Estados Unidos da América. O número deverá aumentar para 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo em 2050 (LANGDON et al., 2016).

## **1.2 Probióticos – definição e mecanismos de ação**

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (RAO et al., 2012). São utilizados para modificar diretamente a microbiota bucal e modular as respostas imunológicas (MORALES et al., 2016). Os microrganismos utilizados para fins probióticos podem desencadear efeitos diretos sobre os patógenos periodontais, afetando seu crescimento, adesão e colonização (STAMATOVA & MEURMAN, 2009). Bactérias probióticas podem produzir diversos componentes que agem como agentes antimicrobianos, tais como ácido lático, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (GILLOR et al., 2008; GORDON, 2009; OELSCHLAEGER, 2010). Sookkhee et al. (2001) isolaram bactérias produtoras de ácido lático da cavidade bucal de voluntários saudáveis tailandeses e demonstraram que as mesmas desenvolviam atividade antimicrobiana contra *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus mutans*. Van Hoogmoed et al. (2000) observaram que um biosurfactante produzido pelo *Streptococcus mitis* é capaz de diminuir a adesão de *S. mutans* e de vários periodontopatógenos.

Estudos tem demonstrado que algumas espécies probióticas podem atenuar a expressão de Interleucina (IL)-8 induzida por periodontopatógenos nas células epiteliais bucais (COSSEAU et al., 2008; ZHANG et al., 2008; SLIEPEN et al., 2009) e reduzir os



níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-1 e Fator de Necrose Tumoral-alfa - TNF- $\alpha$ ) no fluido crevicular gengival (TWETMAN et al., 2009). Shimauchi et al. (2008) verificaram que o consumo de probióticos diminuiu significativamente os níveis de lactoferrina salivar, uma proteína indicativa de inflamação periodontal, em indivíduos altamente susceptíveis à periodontite. Staab et al. (2009) demonstraram que a ingestão de probióticos pode reduzir a atividade de elastase de polimorfonucleares, bem como os níveis de mieloperoxidase e metaloproteinase-3 da matriz no fluido crevicular gengival de indivíduos com gengivite.

Em se tratando de um microrganismo no ambiente bucal, algumas propriedades são determinantes para que o mesmo possa desencadear efeitos benéficos ao hospedeiro, sendo assim um potencial probiótico. O objetivo de uma terapia probiótica é a substituição de agentes patogênicos nocivos residentes por outras bactérias não patogênicas. Para isso, é necessário que o probiótico apresente atividade antagonista contra os patógenos a serem substituídos no ambiente bucal, bem como uma alta capacidade de colonização do ambiente, resistindo às condições ambientais e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (BOSCH et al., 2012; STAMATOVA & MEURMAN, 2009; MESSORA et al., 2017). Nesse sentido, é essencial que os candidatos probióticos mostrem capacidade de adesão às superfícies bucais revestidas com saliva, capacidade de formação de biofilmes, alta sobrevivência nas condições bucais e ausência de produção de compostos capazes de ocasionarem mal odor bucal. Além disso, a potencial cepa não deve demonstrar toxicidade, ser incapaz de espalhar genes resistentes a antibióticos e não promover o desenvolvimento de cáries. As cepas também devem ser de origem humana e isoladas do meio bucal, desde que podem funcionar melhor em um ambiente semelhante ao local onde foram originalmente isoladas (BOSCH et al., 2012; MESSORA et al., 2017).

### **1.3 Probióticos e saúde periodontal**

No que se refere à saúde bucal, especificamente à saúde periodontal, pode-se constatar que a literatura já apresenta algumas evidências bastante contundentes a favor do uso de cepas bacterianas benéficas como estratégia de tratamento para as doenças periodontais (MARTIN-CABEZAS et al., 2016; GRUNER et al., 2016). Considerando os estudos que avaliaram os efeitos de probióticos na gengivite, uma doença com características semelhantes à mucosite peri-implantar, a literatura possui diversos estudos utilizando modelos de gengivite experimental ou de gengivite estabelecida.

Krasse et al. (2006) demonstraram uma redução do índice de placa (IP) e da inflamação gengival em indivíduos com gengivite moderada e severa que fizeram o uso de

*Lactobacillus reuteri* por 2 semanas. Twetman et al. (2009) demonstraram uma redução no SS e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com gengivite moderada que consumiram *L. reuteri* por 2 semanas. Iniesta et al. (2012) observaram redução nas contagens de *P. gingivalis* presentes no biofilme subgengival, bem como no número total de anaeróbios e de *Prevotella intermedia* presentes na saliva de indivíduos com gengivite que consumiram *L. reuteri* durante 28 dias (MESSORA et al., 2017).

Em um modelo de gengivite experimental, Hallstrom et al. (2013) avaliaram os efeitos de duas cepas de *L. reuteri* no IP, no índice gengival, no SS e nos níveis de diversos mediadores inflamatórios presentes no fluido crevicular gengival. Os autores constataram que o consumo de probióticos não alterou nenhum dos parâmetros avaliados. Uma explicação para esse resultado, segundo os autores, encontra-se nas diferenças individuais observadas no acúmulo de placa, o que pode ter interferido nos resultados. Lee et al. (2015) usando um modelo de gengivite experimental proposto por Løe et al. em 1965, demonstraram que o consumo de *Lactobacillus 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 metaloproteinase da matriz (MMP)-3, os quais são importantes marcadores inflamatórios envolvidos na degradação dos tecidos periodontais (MESSORA et al., 2017).

Alguns estudos avaliaram também os efeitos de enxaguatórios bucais, contendo probióticos, na inflamação. Harini e Aneundi (2010) compararam a eficácia de enxaguatórios contendo probióticos ou clorexidina no IP e no índice gengival em crianças. Ambos os enxaguatórios mostraram resultados semelhantes no IP. No entanto, os indivíduos que fizeram o uso de enxaguatórios contendo probióticos apresentaram menor índice gengival quando comparado àqueles que fizeram o uso da clorexidina. Neste estudo, não foi especificado qual o tipo e a dose da cepa probiótica utilizada. Nadkerny et al. (2015) compararam os efeitos de um enxaguatório contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sporogenes*, *Bifidobacterium longum* e *Saccharomyces boulardii*

com aqueles de enxaguatórios contendo clorexidina ou apenas solução salina nos parâmetros clínicos inflamatórios da gengivite. Após profilaxia profissional e instrução de higiene bucal, 45 indivíduos com gengivite crônica fizeram uso dos enxaguatórios prescritos durante 15 dias. Em 2 e 4 semanas, foram avaliados o IP, o índice gengival e o índice de higiene oral simplificado. Os enxaguatórios contendo probiótico ou clorexidina promoveram resultados superiores quando comparados àquele contendo solução salina em todos os parâmetros clínicos avaliados. Nenhuma diferença foi observada entre os enxaguatórios contendo clorexidina e probiótico. Os autores concluíram que enxaguatórios com probióticos são uma potencial estratégia adjuvante para o controle mecânico de placa bacteriana. Diferentemente dos resultados obtidos nos estudos descritos anteriormente, Alkaya et al. (2016) não observaram benefícios de probióticos do gênero *Bacillus* em indivíduos com gengivite generalizada. Nesse estudo, os indivíduos fizeram o uso de dentifrício, enxaguatório bucal e solução para limpeza de suas escovas dentárias contendo os probióticos *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus pumulus* ou placebo. Não foram observadas diferenças significativas no IP e no índice de sangramento entre os indivíduos que fizeram o uso de produtos contendo probióticos ou placebo. Uma possível explicação para os resultados observados, segundo os autores, seria a baixa concentração dos microrganismos probióticos presentes nos produtos utilizados. Além disso, foram utilizados microrganismos esporulados e nenhum exame sobre a real germinação desses esporos na cavidade bucal dos indivíduos foi realizado (MESSORA et al., 2017).

#### **1.4 Probióticos no tratamento de doenças peri-implantares**

Os estudos sobre os efeitos de probióticos nas doenças peri-implantares, sobretudo na mucosite peri-implantar, são ainda escassos e apresentam resultados controversos.

Em estudo realizado por Hallström et al. (2013), foram avaliados os efeitos adjuvantes de suplementos probióticos no tratamento convencional da mucosite peri-implantar. Foram avaliados 49 indivíduos adultos com mucosite peri-implantar. Após o debridamento mecânico inicial e as instruções de higiene oral, os indivíduos receberam uma aplicação tópica de óleo, contendo (Grupo Teste) ou não (Grupo Controle) probióticos, seguida por ingestão diária de pastilhas (contendo ou não probióticos), por 3 meses. Os produtos do Grupo Teste (óleo e pastilhas) apresentavam uma mistura de duas cepas de *L. reuteri*. Os indivíduos foram clinicamente monitorados durante 26 semanas. Os parâmetros clínicos avaliados foram PS, IP e SS. Além disso, foram também avaliados os níveis de citocinas no fluido crevicular (ensaios *multiplex*) e a microbiota subgengival (*checkerboard*

*DNA-DNA hybridization*). Nenhum dos parâmetros avaliados diferiu entre os grupos Controle e Teste. Os autores concluíram que probióticos não proporcionam um efeito adjuvante no tratamento convencional da mucosite peri-implantar.

Flichy-Fernandez et al. (2015) avaliaram os efeitos da administração do probiótico *L. reuteri* na saúde peri-implantar de indivíduos desdentados totais reabilitados com implantes dentários e com diagnóstico de mucosite peri-implantar. Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados em 34 indivíduos, apresentando 77 implantes: volume de fluido crevicular, IP, profundidade de sondagem (PS), índice gengival modificado (IGM) e as concentrações de IL-1b, IL-6 e IL-8 no fluido crevicular. Os autores concluíram que o tratamento com o probióticos melhorou os parâmetros clínicos avaliados e reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular, podendo ser considerado uma alternativa promissora para o tratamento e prevenção da mucosite.

Mongardini et al. (2017) realizaram um estudo cruzado, aleatorizado, controlado por placebo para avaliar eficácia clínica dos probióticos no tratamento da mucosite peri-implantar em 20 indivíduos. O tratamento da mucosite peri-implantar consistiu em remoção mecânica de placa e aplicação de TFDa, associadas à administração de probióticos (*Lactobacillus plantarum* e *L. brevis*) ou placebo. Os parâmetros clínicos foram avaliados previamente ao tratamento, assim como em duas e seis semanas pós-operatórias. Os resultados indicaram que o tratamento mecânico associado à TFDa, com ou sem o uso de probióticos, reduziu de maneira significativa o número de sítios com SS. Os autores concluíram que os probióticos utilizados não proporcionaram um efeito adjuvante no tratamento da mucosite peri-implantar por meio de remoção mecânica de placa e aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana.

Em um estudo clínico prospectivo, randomizado, controlado, de *design* paralelo e triplo-cego, Galofré et al (2018) incluíram 44 indivíduos parcialmente edêntulos e que possuíam implantes com mucosite ou peri-implantite. Após terapia mecânica não cirúrgica, os indivíduos foram aleatorizados para consumirem *L. reuteri* ou placebo durante 30 dias. Foram realizadas mensurações clínicas em toda a boca (índice geral de placa e sangramento geral à sondagem) e nos implantes com mucosite ou peri-implantite (PS, IP e SS) no *baseline*, bem como em 30 e 90 dias. Foram coletadas amostras de placa bacteriana para avaliação microbiológica nos mesmos momentos das avaliações clínicas. Os autores concluíram que o probiótico, juntamente com a terapia mecânica, produziu uma melhora adicional em relação ao tratamento apenas com terapia mecânica, tanto nos parâmetros clínicos gerais (SS, PS) de indivíduos com mucosite ou peri-implantite. No entanto, *L. reuteri* teve um efeito muito

limitado na microbiota peri-implantar, promovendo apenas diminuição significativa nas contagens de *P. gingivalis* em implantes com mucosite.

Com o objetivo de determinar se o tratamento da mucosite com debridamento mecânico, clorexidina a 0,12% e uma aplicação adicional de *L. reuteri* resultaria em melhoria dos parâmetros clínicos e microbiológicos em comparação com o mesmo tratamento sem a administração do probiótico, Peña et al (2018) selecionaram 50 implantes dentários com mucosite em 50 indivíduos. Os indivíduos foram alocados em grupos Teste (tratados com probióticos) e Controle (tratados com placebo). Os dados foram analisados para determinar alterações clínicas e microbiológicas durante o tratamento e após um período de acompanhamento de 3 meses. Os autores observaram que todos os parâmetros clínicos melhoraram nos grupos Teste e Controle, com uma diminuição significativa no IP de boca toda, SS de boca toda, IP nos implantes doentes e SS nos implantes doentes. No entanto, em ambos os grupos as variáveis clínicas, exceto a profundidade da sondagem, aumentaram leve e progressivamente até 3 meses de acompanhamento, mas sem atingir os níveis iniciais. Do ponto de vista microbiológico, nenhuma alteração importante na microbiota subgengival foi registrada em diferentes momentos entre os grupos durante o estudo. Os autores concluíram que o tratamento com debridamento mecânico, reforço da higiene bucal e administração de clorexidina a 0,12% foi eficaz na redução da mucosite, mas nem sempre resultou na resolução completa da inflamação. A administração de probióticos não pareceu fornecer um benefício clínico ou microbiológico adicional.

Alqahtani et al (2019) avaliaram a eficácia do debridamento mecânico com terapia probiótica adjuvante no tratamento de mucosite peri-implantar em indivíduos fumantes e não fumantes. Foram incluídos indivíduos com (grupo I) e sem mucosite peri-implantar (grupo II). Os indivíduos dos grupos I e II foram subdivididos em 2 subgrupos: (A) indivíduos submetidos ao debridamento mecânico com terapia probiótica adjuvante (usando *L. reuteri*); e (B) debridamento mecânico apenas. Em ambos os grupos, PS, IP e SS foram mensurados no *baseline* (período pré-intervenção), bem como aos 3 e 6 meses pós-operatórios. O nível ósseo peri-implantar também foi mensurado. Oitenta indivíduos (40 em cada grupo) com mucosite peri-implantar participaram deste estudo.

Considerando os indivíduos não fumantes dos subgrupos A e B, os valores médios totais de IP, SS e PS foram significativamente maiores no início do estudo, em comparação com seus respectivos escores nos acompanhamentos de 3 e 6 meses. Aos 3 meses, diferenças significativas foram observadas para IP, SS e PS entre os subgrupos A e B. Aos 6 meses, nenhuma diferença significativa nos parâmetros clínicos foi observada entre os subgrupos A e

B. Considerando os indivíduos fumantes, nenhuma diferença significativa foi observada nos valores médios totais de IP, SS e PS nas comparações intra e intergrupos (subgrupos A e B). A mudança na PS aos 3 meses pós-operatórios (em relação aos valores do *baseline*) foi significativamente maior apenas entre os não fumantes do subgrupo A quando comparados com os indivíduos do subgrupo B. Os autores concluíram que em curto prazo, em indivíduos não fumantes, debridamento mecânico e uso adjuvante da terapia probiótica é mais eficaz no tratamento da mucosite peri-implantar do que apenas debridamento mecânico. O tabagismo compromete a cicatrização de tecidos moles peri-implantar após debridamento mecânico com ou sem o uso de terapia probiótica adjuvante.

Em um estudo recente, Tada et al. (2018) investigaram os efeitos de *L. reuteri* em indivíduos com peri-implantite. 30 indivíduos com peri-implantite leve a moderada participaram do estudo. Antes do estudo começar, os indivíduos foram submetidos a avaliações clínicas e microbiológicas. Logo em seguida, receberam um tratamento com antibióticos (azitromicina, 500 mg, uma vez por dia durante 3 dias). Os indivíduos foram alocados em grupos denominados Teste (tratamento com pastilhas contendo *L. reuteri* durante 6 meses) e Controle (tratamento com pastilhas placebo). Foram realizados exames clínicos e microbiológicos em 4, 12 e 24 semanas pós-operatórias. Os parâmetros clínicos avaliados foram PS, SS, índice de placa modificado (IPM) e índice de sangramento sulcular modificado (ISSm). O número de bactérias foi avaliado por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). O Grupo Teste apresentou menor ISSm do que o Grupo Controle em 24 semanas pós-operatórias. Uma diminuição de PS em relação ao período pré-intervenção foi observada apenas no Grupo Teste em 4 e 24 semanas pós-operatórias. Nenhum outro parâmetro avaliado foi diferente entre os grupos experimentais.

Para examinar os benefícios clínicos e microbiológicos do probiótico *L. reuteri* na terapia não cirúrgica da peri-implantite inicial, Laleman et al (2019) realizaram estudo randomizado, duplo-cego, utilizando indivíduos com peri-implantite inicial, ou seja, peri-implantite com profundidade média máxima de sondagem de 6 mm e perda óssea máxima de 3 mm. Foi realizada profilaxia da boca toda e os locais da diagnosticados com peri-implantite foram submetidos ao debridamento mecânico. Posteriormente, a aplicação do probiótico ou placebo foi realizada nos locais com peri-implantite e pastilhas com probiótico ou placebo foram distribuídas aos indivíduos. As cepas de *L. reuteri* utilizadas foram ATCC PTA 5289 e DSM 17938. No nível do implante, as medidas de interesse foram SS, PS e IP. Na boca toda também foram registrados o IP e SS. Amostras microbiológicas foram coletadas da língua, saliva e subgingivalmente ao redor dos implantes. Todos os parâmetros clínicos diminuíram

significativamente após 12 e 24 semanas. No nível do implante, a única diferença estatisticamente significativa foi uma diminuição maior nos níveis de placa no grupo probiótico quando comparado ao grupo controle em 24 semanas. Considerando a boca toda, a única diferença significativa nas comparações intergrupos foi a maior diminuição do SS no grupo probiótico em comparação ao grupo controle (em 24 semanas). Em relação aos resultados microbiológicos, não foram encontradas diferenças significativas em nenhum momento nas comparações intra e intergrupos. Os autores não encontraram efeitos adjuvantes decorrentes do uso do probiótico *L. reuteri* no tratamento da peri-implantite.

### 1.5 Justificativa

Como a mucosite peri-implantar é uma entidade clínica comum ao redor dos implantes, seu reconhecimento precoce e diagnóstico adequado é de grande importância tanto para o tratamento quanto para a implementação de programas preventivos (TONETTI et al., 2015). Novos recursos para o tratamento/prevenção das doenças peri-implantares devem ser estudados, uma vez que o tratamento mecânico convencional pode não eliminar completamente a doença ou evitar o retorno da mesma.

As pesquisas sobre a utilização dos probióticos como agentes preventivos e terapêuticos na Odontologia são crescentes e os resultados são promissores. Contudo, os estudos ainda são escassos e controversos no campo das doenças peri-implantares. A confirmação da ação benéfica de probióticos na mucosite peri-implantar e na peri-implantite pode representar um avanço significativo no tratamento dessas doenças que afetam grande parte da população reabilitada com implantes dentários, reduzindo o risco de perdas de implantes. Além disso, podem representar uma alternativa ao uso de antibióticos e proporcionar protocolos terapêuticos com melhor prognóstico, menor custo e menor morbidade para o paciente.

Até o presente momento, os estudos que investigaram os efeitos de probióticos nas doenças peri-implantares usaram principalmente microrganismos do gênero *Lactobacillus*. Outros potenciais probióticos, com aqueles pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* merecem ser investigados. Os estudos envolvendo doenças periodontais reforçam essa necessidade (KURU et al., 2017; INVERNICI et al., 2018).





## 2. OBJETIVOS

---



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos adjuvantes dos probióticos *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019<sup>TM</sup>, *L. rhamnosus* HN001<sup>TM</sup> e *Lactobacillus paracasei* Lpc-37<sup>®</sup> no tratamento da mucosite peri-implantar.

### **2.2 Objetivo Específico**

Monitorar por meio da análise de parâmetros clínicos (IPM, ISSm, PS, SS) os efeitos adjuvantes da administração tópica e sistêmica de microrganismos probióticos na resolução da mucosite peri-implantar.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Consentimento para a pesquisa

Todos os indivíduos receberam informações detalhadas a respeito do experimento do qual participaram (objetivos, benefícios, riscos e desconfortos) conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo n°: 82840117.4.0000.5419 – (Anexo 2) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) – Universidade de São Paulo (USP). O estudo foi registrado no *ClinicalTrials.gov* (NCT04187222).

#### 3.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo da amostra foi determinado para fornecer um poder de 80% para reconhecer uma diferença significativa de 30% no número de sítios com SS ( $\delta$ ) entre os grupos analisados com um intervalo de confiança de 95% ( $\alpha = 0.05$ ) e desvio-padrão ( $\sigma$ ) de 0,46 (ROOS-JANSACKER et al., 2017), considerando  $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$ . O cálculo baseou-se na seguinte fórmula:  $n = \{[2(\sigma)^2]/(\delta)^2\} \cdot (Z\alpha + Z\beta)^2$ . Portanto, 36 indivíduos foram necessários para completar o estudo.

#### 3.3 Seleção dos indivíduos

Foram selecionados 36 indivíduos, completamente edêntulos, reabilitados há mais de 12 meses com próteses totais sobre implantes na arcada inferior ou na arcada superior seguindo o protocolo Branemark (BRANEMARK et al., 1969; ADELL et al., 1981).

Os critérios de inclusão foram: (i) arco dentário inferior ou superior completamente desdentado submetido à reabilitação com implantes dentários; (ii) restauração protética em função durante pelo menos 12 meses; (iii) indivíduos saudáveis, sem alteração sistêmica conhecida; (iv) não fumantes.

Os indivíduos incluídos na pesquisa apresentaram pelo menos um implante dentário com diagnóstico de mucosite. Implantes com mucosite deveriam apresentar SS, edema da mucosa peri-implantar e/ou supuração e ausência radiográfica de crista óssea distante 3 mm ou mais da porção mais coronal da parte intraóssea do implante (MONJE et al., 2017; BERGLUNDH et al., 2018).

Os critérios de exclusão foram: (i) indivíduos que receberam qualquer tipo de tratamento de descontaminação local ou sistêmico da cavidade bucal nos últimos 3 meses; (ii)

indivíduos com distúrbios sistêmicos capazes de influenciar os resultados do tratamento; (iii) fumantes; (iv) indivíduos apresentando implantes instalados em áreas enxertadas ou mal posicionados; (v) indivíduos cuja avaliação radiográfica demonstrasse nível ósseo peri-implantar distante 3 mm ou mais da porção mais coronal da parte intraóssea do implante.

### **3.4 Delineamento do estudo: aleatorização, alocação, ocultação da alocação e protocolo de tratamento**

Foram incluídos 36 indivíduos da população atendida na Clínica do Centro de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial do Sul de Minas (Paraguaçu, Minas Gerais, Brasil). Antes do estudo começar, os indivíduos selecionados foram identificados por um código numérico, bem como receberam instruções específicas de higiene bucal. De acordo com uma tabela numérica aleatória gerada por um programa computadorizado, o coordenador (M.R.M) do estudo alocou cada paciente em um dos seguintes grupos experimentais: Controle (debridamento mecânico + placebo) ou Teste (debridamento mecânico + terapia probiótica). Os indivíduos dos grupos Controle e Teste receberam debridamento mecânico em todos os implantes dentários e cápsulas placebo ou cápsulas contendo  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. lactis* HN019<sup>TM</sup> (HOWARU<sup>®</sup> Bifido, E. I. Dupont<sup>®</sup> de Nemours and Company, Wilmington, DE, EUA), *L. rhamnosus* HN001<sup>TM</sup> (HOWARU<sup>®</sup> Rhamnosus, E. I. Dupont<sup>®</sup> de Nemours and Company) e *L. paracasei* Lpc-37<sup>®</sup> (FloraFit<sup>®</sup>, E. I. Dupont<sup>®</sup> de Nemours and Company) no *baseline*. No Grupo Teste, a sessão de tratamento foi concluída com uma aplicação tópica profissional de gel de carboximetilcelulose contendo  $10^9$  UFCs do 3 microorganismos probióticos descritos anteriormente. O gel foi aplicado nas regiões sub e supramucosa. Os indivíduos foram orientados, logo após a sessão de debridamento mecânico para tratamento da mucosite peri-implantar, a dissolverem o conteúdo das cápsulas que receberam em 20 mL de água e realizarem bochechos de 30 a 60 segundos, seguidos por deglutição, duas vezes ao dia, durante 12 semanas. O grupo Controle foi tratado com gel e pastilhas placebo. Todos os indivíduos foram orientados, também, a não consumirem nenhum outro produto probiótico durante o estudo.

Os parâmetros clínicos peri-implantares foram avaliados no *baseline* (período pré-intervenção), bem como em 12 e 24 semanas após o início do estudo. Os exames clínicos peri-implantares (pré e pós-intervenção) foram realizados por um único examinador (P.H.F.S.) devidamente treinado e calibrado, o qual desconhecia os grupos experimentais do presente estudo. Os procedimentos mecânicos para tratamento da mucosite peri-implantar foram realizados por outro operador (S.I.S.) treinado para essas finalidades, o qual também



desconhecia os grupos experimentais do presente estudo.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP preparou as cápsulas probióticas e não probióticas (placebo), as quais apresentaram tamanho, cor e textura idênticos. As cápsulas foram enviadas ao coordenador do estudo, o qual marcou o código numérico de cada paciente em um conjunto de 168 cápsulas (quantidade a ser consumida por cada indivíduo durante 12 semanas) de acordo com o grupo experimental a que pertencia. As embalagens codificadas foram enviadas ao examinador do estudo, o qual distribuiu aos indivíduos e, em nenhum momento, obteve informações sobre o conteúdo das mesmas. Os indivíduos envolvidos também não sabiam qual o conteúdo das embalagens e em qual grupo experimental encontravam-se alocados. O significado de cada código numérico foi revelado pelo coordenador do estudo apenas após a realização da análise estatística dos dados experimentais obtidos.

Os indivíduos participantes da pesquisa receberam 14 cápsulas (placebo ou probiótico) por semana. Ao final de cada semana, os mesmos compareciam à Clínica do Centro de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial do Sul de Minas. Durante essa visita, traziam as embalagens das cápsulas que foram consumidas durante a semana para então receberem novas cápsulas em quantidade suficiente para mais uma semana de consumo. Nesta visita, os indivíduos responderam um questionário sobre a percepção de qualquer efeito colateral observado durante o consumo das cápsulas. Dois assistentes de pesquisa conduziram estes procedimentos, sendo responsáveis por monitorar o comprometimento do paciente no consumo das cápsulas fornecidas. Esses assistentes não eram examinadores ou operadores no presente estudo.

### **3.5 Calibração do examinador**

O índice Kappa foi utilizado para avaliar a calibração do examinador para coleta dos parâmetros clínicos de sondagem (PS e SS) a fim de mensurar a concordância diagnóstica intra-examinador. Para isso, foram selecionados 10 indivíduos, com pelo menos 1 implante dentário com profundidade de sondagem  $\geq 4$  mm em algum sítio. Cada paciente foi examinado duas vezes usando uma sonda de plástico (Sonda Milimetrada Colorvue Carolina do Norte, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) com um intervalo de 48 horas entre o primeiro e segundo exame, a fim de se obter a confiabilidade diagnóstica intra-examinador, a qual foi aferida determinando-se o índice Kappa. O índice de concordância de Kappa obtido foi 0,89 para análise de SS e 0,91 para análise de PS.

### 3.6 Monitoramento clínico

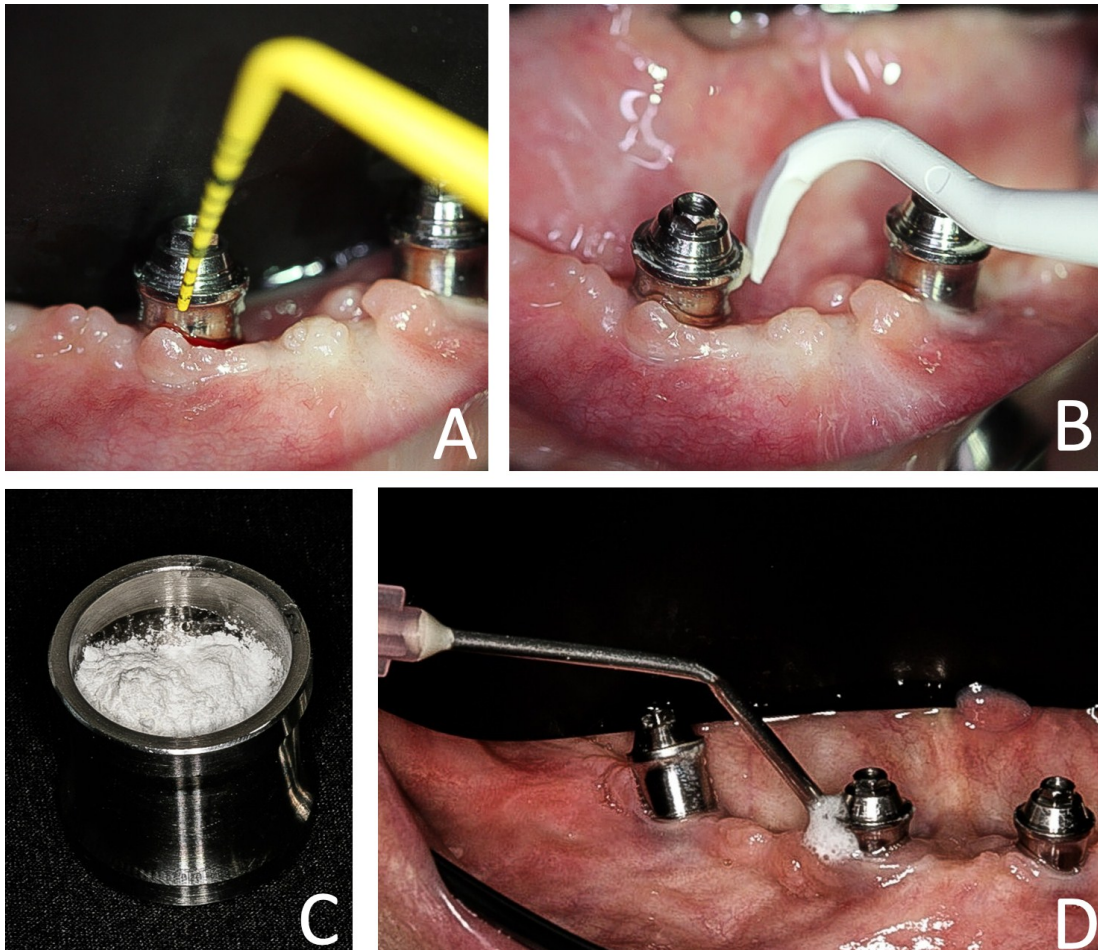
O ISSm (escore 0: sem sangramento quando uma sonda periodontal é passada ao longo da margem da mucosa adjacente ao implante; escore 1: pontos de sangramento isolados visíveis; escore 2: o sangue forma uma linha vermelha confluyente na margem da mucosa e escore 3: sangramento profuso) e o IPM (escore 0: sem de placa; escore 1: placa reconhecida apenas pela execução de uma sondagem através da superfície marginal lisa do implante; escore 2: a placa pode ser vista a olho nu; escore 3: abundância de matéria alba) foram determinados para cada implante, de acordo com Mombelli et al. (1987). A PS foi determinada usando uma sonda periodontal Milimetrada Colorvue Carolina do Norte (Hu-Friedy). Três pontos de referência vestibulares e três linguais/palatinos para cada implante foram utilizados para o cálculo da profundidade média de sondagem em milímetros para cada implante. O SS foi avaliado dicotomicamente (AINAMO & BAY, 1975): a presença do sangramento foi considerada positiva quando ocorreu em até 20 segundos após a inserção da sonda para a medida da PS.

Os parâmetros clínicos descritos anteriormente foram registrados no *baseline* (período pré-intervenção), bem como em 12 e 24 semanas após o início do estudo. No *baseline* foi mensurada também a altura de mucosa ceratinizada (AMC) presente na região vestibular de cada implante utilizando uma sonda periodontal milimetrada Colorvue Carolina do Norte (Hu-Friedy). Foram realizadas mensurações nas regiões mesio-vestibular, vestibular e disto-vestibular da mucosa peri-implantar marginal livre até união mucogengival para o cálculo da AMC média (em mm) de cada implante.

### 3.7 Tratamento da mucosite peri-implantar e cuidados de manutenção

Antes do início da intervenção, todos os indivíduos receberam instruções de higiene bucal. Foram realizados debridamentos mecânicos com curetas de teflon (Implacare™ II Scalers, Hu-Friedy, Chicago, IL EUA) e polimento usando uma taça de borracha e pasta de polir nos implantes apresentado mucosite peri-implantar. No Grupo Teste, a sessão de tratamento foi concluída com uma aplicação tópica profissional de gel de carboximetilcelulose contendo  $10^9$  UFCs de *B. lactis* HN019™, *L. rhamnosus* HN001™ e *L. paracasei* Lpc-37®, ao redor dos implantes. O gel foi aplicado nas regiões sub e supramucosa (Figura 1). Os indivíduos receberam, então, cápsulas contendo  $10^9$  UFCs dos 3 microrganismos probióticos descritos anteriormente e foram instruídos a dissolverem o conteúdo das cápsulas em 20 mL de água para realizarem bochechos de 30 a 60 segundos, seguidos por deglutição, duas vezes ao dia, durante 12 semanas. O grupo Controle recebeu as mesmas instruções de higiene bucal,

os mesmos procedimentos de debridamento mecânico e polimento e foi tratado com gel e pastilhas placebo. Em 12 semanas pós-operatórias, foi repetido o mesmo tratamento mecânico e também foi aplicado o gel contendo o probiótico ou placebo para os grupos Teste e Controle, respectivamente.



**Figura 1** - Tratamento clínico da mucosite peri-implantar. A: sondagem peri-implantar acompanhada de sangramento em implante apresentando mucosite; B: debridamento mecânico do mini pilar de implante com mucosite. Observa-se a presença de biofilme no mini pilar próximo à cureta de teflon utilizada para a instrumentação; C: coquetel de probióticos liofilizados pronto para ser misturado com o veículo carboximetilcelulose; D: aplicação tópica do coquetel de probióticos associado à carboximetilcelulose ao redor de implantes dentários com mucosite.

### 3.8 Variáveis de resultado

Foi definida como variável primária deste estudo a diferença obtida no SS em 12 e 24 semanas pós-operatórias. Os demais parâmetros clínicos (ISSm, IPM e PS), bem como o número de indivíduos com menos de 10% de SS e completa resolução da mucosite (ausência de SS) em 12 e 24 semanas (considerando para essa análise apenas os implantes com mucosite diagnosticados no início do estudo) e o número de novos casos de mucosite peri-

implantar ao longo do estudo (considerando para essa análise apenas os implantes sem mucosite no início do estudo) foram definidos como variáveis secundárias.

### 3.9 Análise estatística

As análises foram realizadas com os *softwares* GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, Versão 6.0. CA, EUA) e IBM SPSS Statistics (IBM Corporation, Versão 23. Armonk, NY, EUA). Foi adotado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A distribuição de normalidade dos dados foi verificada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos para análises das diferenças intra e intergrupos. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados com distribuição não normal.

Para os diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (*baseline*, 12 semanas e 24 semanas) foi calculada a média e o desvio-padrão de PS e AMC. Para as variáveis SS, IPM, ISSm, número de indivíduos com menos de 10% de SS ou ausência de SS e número de novos casos de mucosite peri-implantar ao longo do estudo foram calculadas as frequências absolutas e relativas médias em cada grupo e tempo experimentais. As diferenças intragrupos (ao longo do tempo) para PS, SS, IPM e ISSm foram avaliadas pelo Teste de Friedman seguido pelo Teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn. As diferenças intergrupos (em um determinado tempo experimental) para PS, SS, IPM e ISSm foram avaliadas pelo Teste Mann-Whitney. A análise das diferenças intergrupos para as mudanças ocorridas (em 12 e 24 semanas) nos valores de PS e SS em relação aos valores obtidos no *baseline*, bem como entre os tempos de 12 e 24 semanas foram avaliadas pelo Teste Mann-Whitney. As diferenças intergrupos para número de indivíduos com menos de 10% de SS ou ausência de SS e número de novos casos de mucosite peri-implantar foram avaliadas pelo Teste de Fisher.

## 4. RESULTADOS

---



#### 4. RESULTADOS

O fluxograma deste estudo está apresentado na Figura 2. O estudo iniciou-se em Julho de 2018 e foi finalizado em Novembro de 2019. As características demográficas dos grupos experimentais estão apresentadas na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos Teste e Controle para as variáveis apresentadas. Todos os implantes analisados apresentavam superfície Neoporous e plataforma protética do tipo hexágono externo conectadas a mini pilares (Neodent Implantes Osseointegráveis, Curitiba, Paraná, Brazil). Nenhum efeito adverso foi relatado durante e/ou após o uso das cápsulas contendo probiótico e/ou placebo.

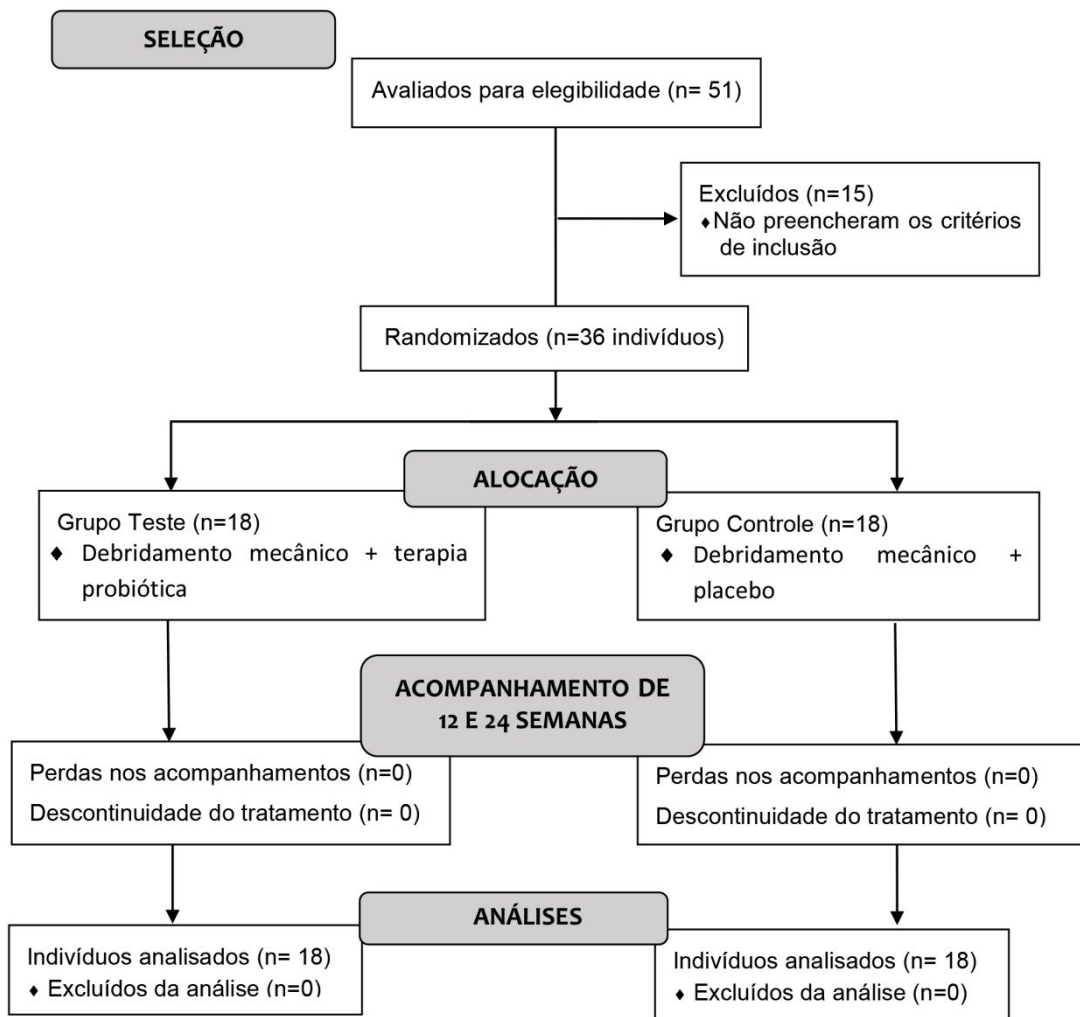


Figura 2 - Fluxograma do estudo clínico.

**Tabela 1** - Características demográficas da amostra no *baseline* de acordo com os grupos experimentais.

| Variável                                                                          | Grupos Experimentais |                   | Comparação Intergrupo |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|
|                                                                                   | Teste<br>n= 18       | Controle<br>n= 18 |                       |
| <b>Indivíduos</b>                                                                 |                      |                   |                       |
| Idade (média ±DP)                                                                 | 63,39±12,06          | 62,3±9,50         | NS*                   |
| Gênero (f/m)                                                                      | 11/07                | 8/10              | NS**                  |
| <b>Implantes</b>                                                                  |                      |                   |                       |
| Número de implantes presentes (número médio ±DP)                                  | 4,38±0,77            | 4,36±0,83         | NS*                   |
| Número de implantes com mucosite (número médio ±DP)                               | 2,44±1,54            | 2,52±1,50         | NS*                   |
| <b>Higiene bucal:</b> número de episódios de higiene bucal/dia (número médio ±DP) |                      |                   |                       |
|                                                                                   | 2,77±0,42            | 2,5±1,02          | NS*                   |
| <b>Arco dentário completamente edêntulo e reabilitado com implantes</b>           |                      |                   |                       |
| Superior (número total)                                                           | 13                   | 12                | NS**                  |
| Inferior (número total)                                                           | 5                    | 6                 |                       |
| <b>Prótese</b>                                                                    |                      |                   |                       |
| Fixa (protocolo de Branemark)                                                     | 18                   | 18                |                       |
| AMC (média ±DP)                                                                   | 2,09±0,40            | 2,57±0,35         | NS*                   |

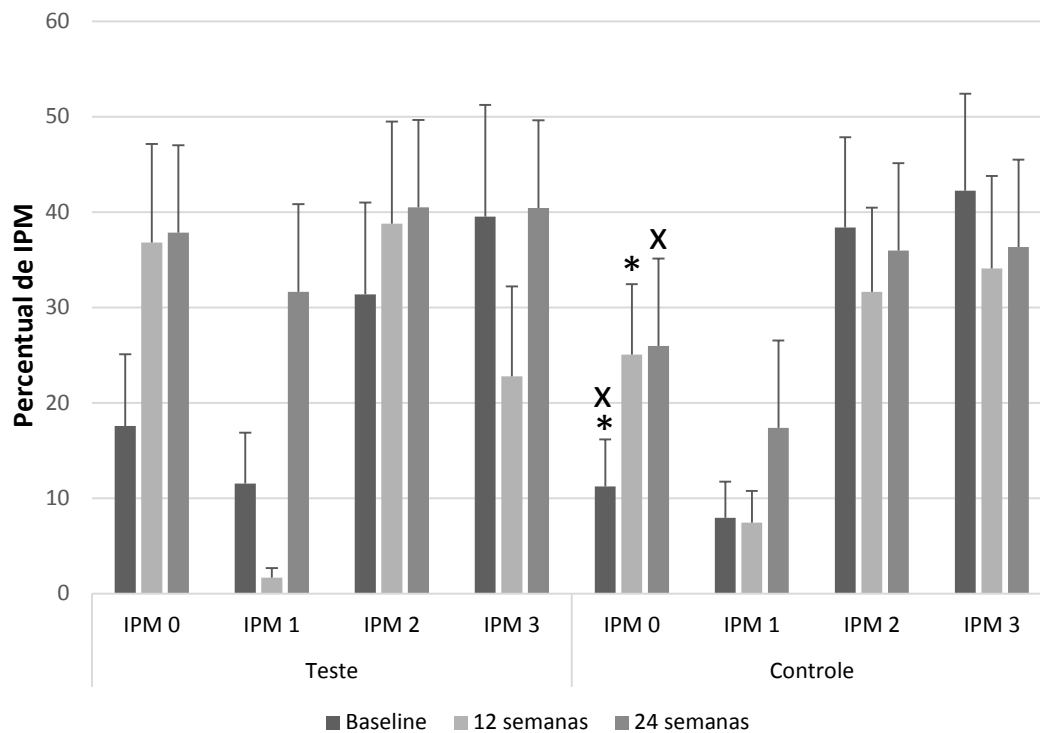
DP = desvio-padrão; f = feminino; m = masculino; AMC = altura de mucosa ceratinizada; NS\* = Não significante (Teste t de Student,  $p > 0,05$ ); NS\*\* = Não significante (Teste de Fisher,  $p > 0,05$ ).

## 4.1 Monitoramento clínico

### 4.1.1 Análise de IPM e ISSm

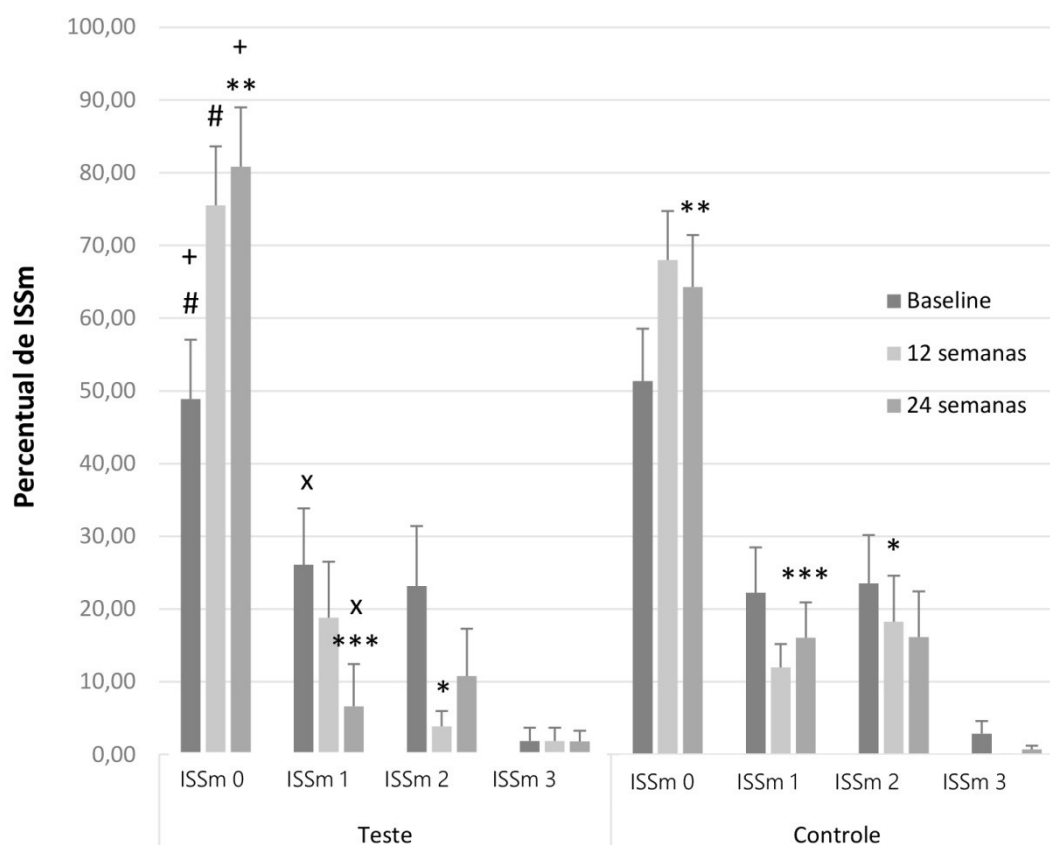
Os percentuais de IPM (escores 0, 1, 2 e 3) para os grupos Teste e Controle podem ser observados na Figura 3. Não houve diferença significativa, ao longo do tempo, para o percentual de IPM no grupo Teste. No grupo Controle, houve aumento significativo no percentual de IPM – escore 0, tanto nas comparações entre o *baseline* e 12 semanas como entre o *baseline* e 24 semanas ( $p < 0,05$ ). Para os demais escores de IPM do grupo Controle, não houve diferenças significativas. O mesmo ocorreu quando todos os escores de IPM são comparados entre os grupos.





**Figura 3** - Percentuais de Índice de Placa Modificado (IPM) (escores 0, 1, 2 e 3) e desvios-padrão para os grupos Teste e Controle no baseline, bem como em 12 e 24 semanas. \* e <sup>x</sup> indicam diferenças significativas nas comparações intragrupos. Símbolos iguais sobre as colunas indicam diferenças significativas nas comparações entre os tempos em um mesmo escore de IPM (Teste de Friedman seguido pelo Teste post hoc de comparações múltiplas de Dunn,  $p < 0,05$ ).

Os percentuais de ISSm (escores 0, 1, 2 e 3) nos grupos Teste e Controle podem ser observados na Figura 4. No grupo Teste, o percentual de ISSm – escore 0 aumentou significativamente nas comparações entre o *baseline* e 12 semanas e entre o *baseline* e 24 semanas ( $p < 0,05$ ). O percentual de ISSm – escore 1 diminuiu de forma significativa nas comparações entre o *baseline* e 24 semanas no grupo Teste. Nenhuma outra mudança significativa ao longo do tempo (comparações intragrupos) foi observada nos grupos Teste e Controle. Nas comparações entre os grupos, observa-se que há maior percentual de ISSm – escore 0 no grupo Teste do que no grupo Controle em 24 semanas ( $p < 0,05$ ). Ainda, há maior percentual de ISSm – escore 1 (24 semanas) e ISSm – escore 2 (12 semanas) no grupo Controle do que no grupo Teste ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4** - Percentuais de Índice de Sangramento Sulcular Modificado (ISSm) (escores 0, 1, 2 e 3) e desvios-padrão nos grupos Teste e Controle no *baseline*, bem como em 12 e 24 semanas. #, + e x indicam diferenças significativas nas comparações intragrupos. Símbolos iguais sobre as colunas indicam diferenças significativas nas comparações entre os tempos em um mesmo escore de ISSm (Teste de Friedman seguido pelo Teste post hoc de comparações múltiplas de Dunn,  $p < 0,05$ ). \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças significativas nas comparações intergrupos. Símbolos iguais sobre as colunas indicam diferenças significativas nas comparações entre os grupos considerando um mesmo escore de ISSm e mesmo tempo de análise (Teste Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2 Análise de PS e SS

Os valores de PS e SS, bem como as mudanças ocorridas nesses valores (em 12 e 24 semanas) em relação àqueles obtidos no *baseline* (valores de delta -  $\Delta$ ) para os grupos Teste e Controle podem ser observados na tabela 2. Nos grupos Teste Controle, comparando os valores obtidos no *baseline* com aqueles de 24 semanas, a PS diminuiu significativamente, sendo que no grupo Controle esta diferença também foi observada nas comparações entre os valores de 12 semanas e àqueles do *baseline* ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre os grupos para os valores de PS e de  $\Delta$ .

Os valores de SS apresentaram diminuição significativa nas avaliações intragrupos, em ambos os tempos avaliados, quando comparados ao *baseline*, tanto no grupo Teste como no grupo Controle ( $p < 0,05$ ). Nas comparações entre os grupos no *baseline* não houve

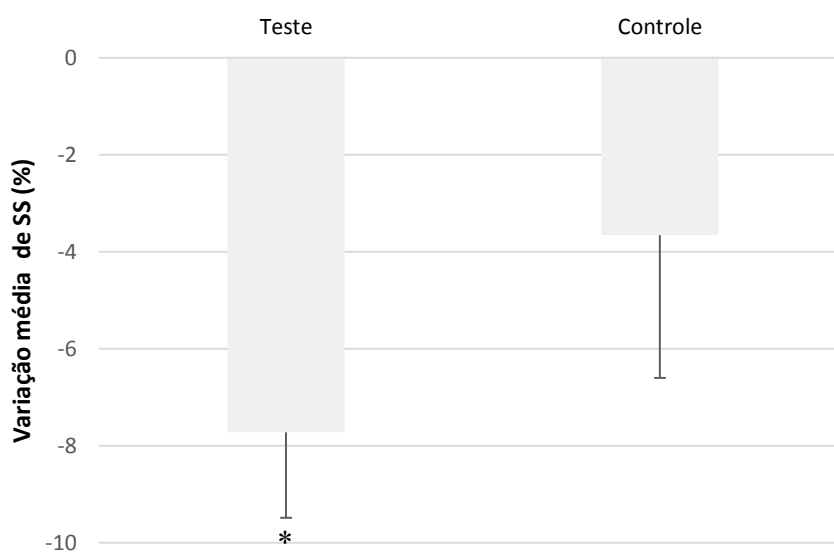
diferença significativa. Em 12 e 24 semanas, os valores de SS foram menores no grupo Teste quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ). A redução dos valores de SS em 24 semanas (quando comparados àqueles do *baseline* –  $\Delta$  24-0) foi significativamente maior no grupo Teste quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2** - Médias e desvio-padrão dos valores de PS e SS, bem como as mudanças ocorridas nesses valores em 12 e 24 semanas quando comparados àqueles do *baseline* ( $\Delta$  12-0 /  $\Delta$  24-0) nos grupos Teste e Controle.

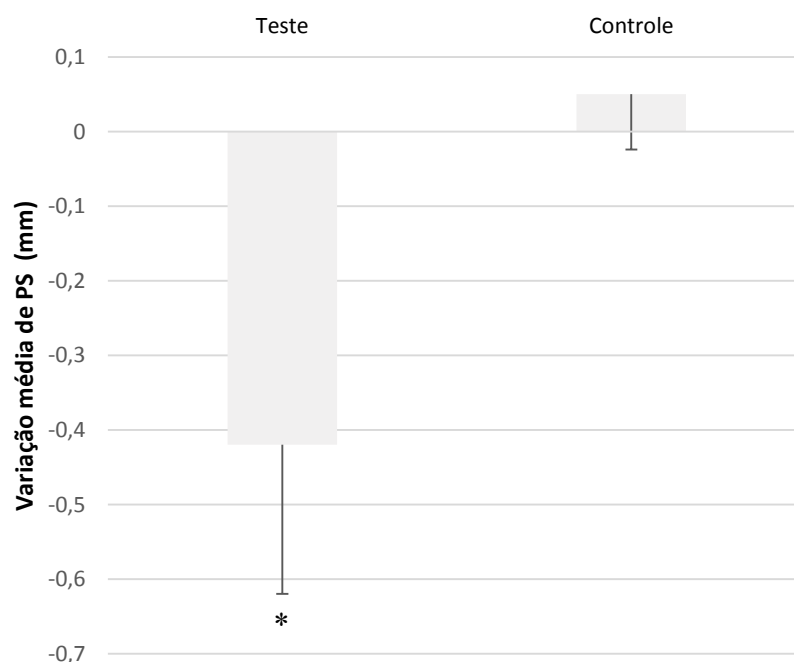
| Variável       | Período         | Grupos Experimentais |                                             |                  |                                             | Comparação Intergrupos |                                         |        |
|----------------|-----------------|----------------------|---------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|--------|
|                |                 | Teste<br>n=18        |                                             | Controle<br>n=18 |                                             | Diferença das Médias   | Teste Mann-Whitney<br>Valor de <i>p</i> |        |
|                |                 | Média ± DP           | Delta ± DP<br>$\Delta$ 12-0 / $\Delta$ 24-0 | Média ± DP       | Delta ± DP<br>$\Delta$ 12-0 / $\Delta$ 24-0 |                        |                                         | Média  |
| <b>PS (mm)</b> | <i>Baseline</i> | 2,19±0,93            |                                             | 1,9±0,48         |                                             | 0,29                   | NS                                      |        |
|                | 12 semanas      | 1,91±1,03            | -0,28±0,34                                  | 1,55±0,38*       | -0,35±0,31                                  | 0,35                   | NS                                      | NS     |
|                | 24 semanas      | 1,49±0,40*           | -0,7±0,8                                    | 1,62±0,55*       | -0,28±0,45                                  | 0,13                   | NS                                      | NS     |
| <b>SS (%)</b>  | <i>Baseline</i> | 52,42±6,94           |                                             | 53,01±10,74      |                                             | 0,59                   | NS                                      |        |
|                | 12 semanas      | 13,19±12,08*         | -39,23±12,09                                | 25,17±19,40*     | -27,84±19,67                                | 11,98                  | 0,0223                                  | 0,0733 |
|                | 24 semanas      | 5,47±6,52*           | -46,95±6,71                                 | 21,08±16,59*     | -31,93±17,98                                | 15,61                  | 0,0003                                  | 0,0028 |

DP = desvio padrão; PS = profundidade de sondagem; SS = sangramento à sondagem; NS = não significativo. \*Diferença significativa quando comparado ao *baseline* (Teste de Friedman, seguido pelo Teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn,  $p < 0,05$ ).

As análises das variações das médias de SS e PS entre 12 e 24 semanas demonstraram que maiores mudanças foram observadas no grupo Teste quando comparado ao grupo Controle (Figuras 5 e 6). O Grupo Teste apresentou redução de SS (Figura 5) de 12 para 24 semanas, significativamente maior que aquela observada no Grupo Controle ( $p < 0,05$ ). Na análise das mudanças dos valores de PS (Figura 6), enquanto uma redução foi observada no grupo Teste de 12 para 24 semanas, um ligeiro aumento foi observado no Grupo Controle ( $p < 0,05$ ).



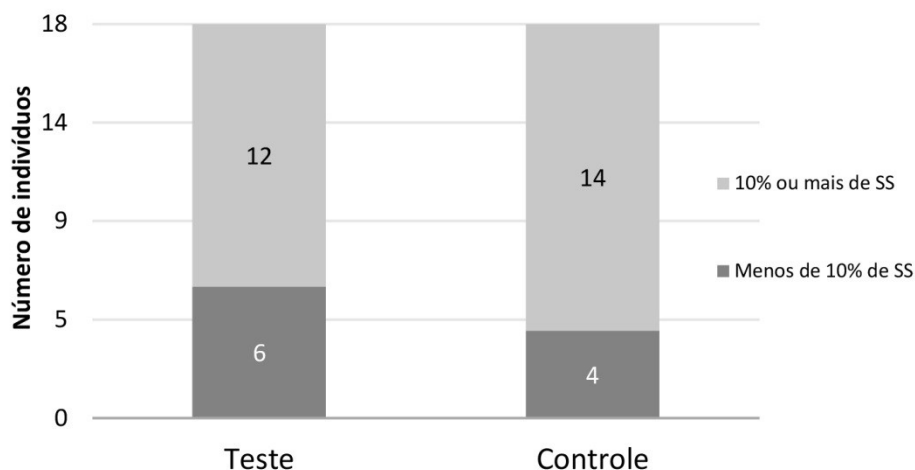
**Figura 5** - Variação percentual média do sangramento à sondagem (SS), de 12 para 24 semanas, nos grupos Teste e Controle. \*diferença significativa quando comparado ao grupo Controle (Teste Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).



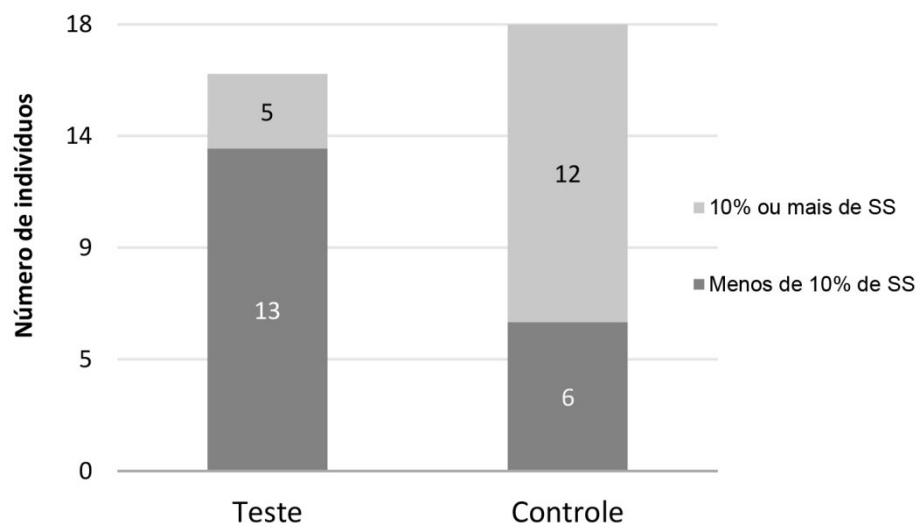
**Figura 6** - Variação média dos valores de profundidade de sondagem (PS) (mm), de 12 para 24 semanas, nos grupos Teste e Controle. \*diferença significativa quando comparado ao grupo Controle (Teste Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Significância clínica dos tratamentos realizados – resolução da inflamação

As figuras 7 e 8 demonstram o número de indivíduos dos grupos Teste e Controle que apresentaram menos de 10% de SS nas reavaliações de 12 e 24 semanas dos implantes com mucosite incluídos no início do estudo. Em 12 semanas (Figura 7), não houve diferença significativa no número de indivíduos entre os grupos Teste e Controle que obtiveram menos de 10% de SS após os tratamentos realizados ( $p = 0,6267$ ). Em 24 semanas (Figura 8), observou-se diferença significativa entre os grupos, sendo que 13 de 18 indivíduos do grupo Teste e apenas 6 de 18 indivíduos do grupo Controle apresentaram menos de 10% de SS ( $p < 0,05$ ). Considerando a resolução completa da inflamação peri-implantar (ausência de SS) no implantes com mucosite, diagnosticados no *baseline*, 33,3% dos indivíduos do grupo Teste não apresentaram nenhum sinal de SS em 24 semanas pós-operatórias. No grupo Controle, esse percentual foi de 16,6%.



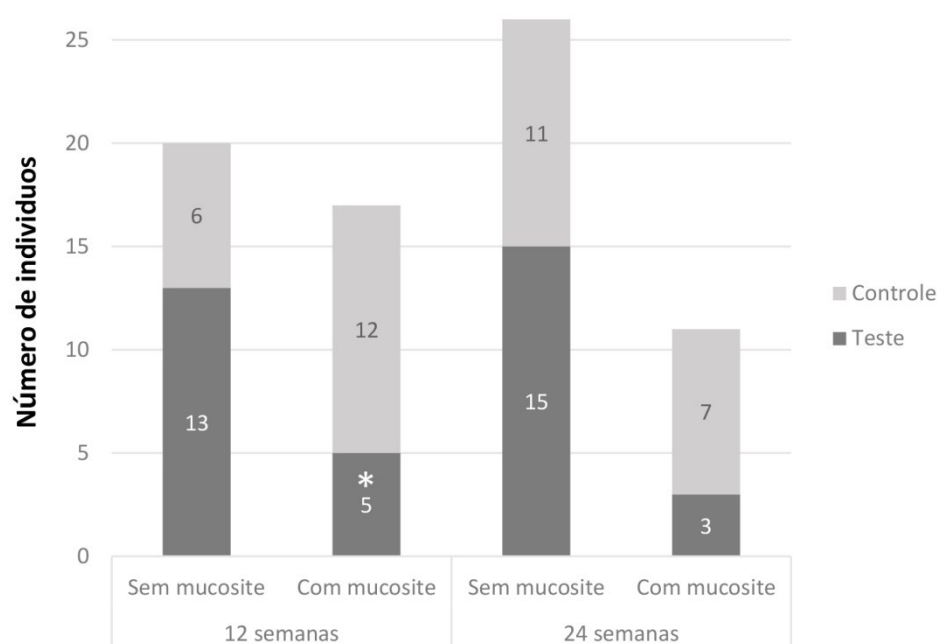
**Figura 7** - Número de indivíduos com menos de 10% de sangramento à sondagem (SS) e com mais de 10% de SS nos grupos Teste e Controle, 12 semanas após o tratamento de implantes com mucosite (Teste de Fisher,  $p = 0,6267$ ).



**Figura 8** - Número de indivíduos com menos de 10% de sangramento à sondagem (SS) e com mais de 10% de SS nos grupos Teste e Controle, 24 semanas após o tratamento de implantes com mucosite (Teste de Fisher,  $p = 0,005$ ).

### 4.3 Acompanhamento de novos casos de mucosite peri-implantar

Os implantes que não apresentavam nenhum SS no início do estudo (*baseline*) foram novamente analisados em 12 e 24 semanas para avaliar a presença ou ausência de mucosite peri-implantar. Em 12 semanas, considerando apenas esses implantes e adotando os critérios de inclusão do presente estudo, um número maior de indivíduos diagnosticados com mucosite foi observado no grupo Controle quando comparado ao grupo Teste ( $p < 0,05$ ; Figura 9).



**Figura 9** - Número de indivíduos dos grupos Teste e Controle diagnosticados com e sem mucosite peri-implantar em 12 e 24 semanas pós-operatórias, considerando para a análise apenas os implantes que não apresentaram qualquer sangramento à sondagem (SS) no início do estudo. \*diferença estatística significativa quando comparado ao grupo Controle na mesma coluna (Teste de Fisher,  $p = 0,0489$ ).





## 5. DISCUSSÃO

---



## 5. DISCUSSÃO

Desde que a mucosite peri-implantar pode progredir para peri-implantite, seu tratamento é considerado a medida mais eficaz para prevenir a peri-implantite (JEPSEN et al., 2015, PULCINI et al., 2019). Este estudo clínico, controlado, aleatorizado e duplo cego avaliou clinicamente os efeitos do uso adjuvante de probiótico multiespécies no tratamento da mucosite peri-implantar. Os resultados obtidos demonstraram que a terapia probiótica proporcionou benefícios adicionais ao tratamento mecânico isolado da mucosite peri-implantar nas avaliações realizadas em 12 e 24 semanas pós-operatórias.

O SS foi usado como variável primária no presente estudo. Devido à sua correlação com a inflamação da mucosa avaliada em nível histológico (LANG et al. 1994), o SS é atualmente reconhecido como um parâmetro-chave para distinguir entre saúde e doença peri-implantar (JEPSEN et al. 2015). Além disso, as evidências disponíveis parecem indicar que o SS peri-implantar tem um valor prognóstico, sendo sua presença (ou ausência) associada à deterioração (ou estabilidade) das condições peri-implantes ao longo do tempo (LUTERBACHER et al. 2000). Por esse motivo, o SS também é comumente usado como resultado de tratamento no gerenciamento de doenças peri-implantares, em geral, e da mucosite peri-implantar em particular (SCHWARZ et al. 2015).

No presente estudo, o grupo Teste apresentou valores de SS significativamente menores que aqueles do grupo Controle nas avaliações de 12 e 24 semanas pós-operatórias. As reduções dos valores de SS no grupo Teste em 12 e 24 semanas, quando comparados àqueles do *baseline*, foram aproximadamente 39% e 46%, respectivamente. Estudos prévios que também investigaram os efeitos adjuvantes da terapia probiótica no tratamento da mucosite peri-implantar demonstraram reduções de SS (31,3% e 32%) em 12 semanas semelhantes à do presente estudo (ALQAHTANI et al., 2019; GALOFRÉ et al., 2018). Os mecanismos capazes de explicar esses resultados encontram-se no potencial imunomodulador e antimicrobiano de probióticos. Uma redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8) foi observada no sulco peri-implantar de implantes com mucosite tratados com o uso adjuvante de probióticos (FLICHY-FERNÁNDEZ et al., 2015). No aspecto microbiológico, implantes com mucosite que receberam tratamento com probióticos apresentaram microbiota com menor quantidade de *P. gingivalis* aos 90 dias pós-operatórios do que implantes tratados com placebo (GALOFRÉ et al., 2018).

Até o presente momento, apenas três (ALQAHTANI et al., 2019; GALOFRÉ et al., 2018; FLICHY-FERNANDEZ et al., 2015) de seis estudos (ALQAHTANI et al., 2019; PEÑA et al., 2019; GALOFRÉ et al., 2018; MONGARDINI et al., 2017; HALLSTROM et al., 2016; FLICHY-FERNANDEZ et al., 2015) mostraram um efeito adicional positivo decorrente do uso de probióticos no tratamento da mucosite peri-implantar. Vários fatores poderiam explicar essa controvérsia nos resultados. A investigação de Hallström et al. (2016), por exemplo, teve algumas limitações, como presença de maior número de fumantes no grupo de indivíduos que receberam probiótico do que no grupo placebo (29% vs 8%). De fato, o tabagismo compromete a cicatrização de tecidos moles peri-implantares após debridamento mecânico com ou sem o uso de terapia probiótica adjuvante. Enquanto em indivíduos não fumantes foram observados benefícios adicionais da terapia probiótica no tratamento da mucosite peri-implantar, nenhuma diferença significativa foi observada nos parâmetros clínicos de indivíduos fumantes (ALQAHTANI et al., 2019).

Outro ponto que deve ser discutido no que se refere às controvérsias nos resultados de estudos que investigaram os efeitos de probióticos no tratamento da mucosite peri-implantar trata-se da cepa bacteriana utilizada. Os resultados obtidos com a utilização de microrganismos probióticos não podem ser generalizados, uma vez que, dentre outros fatores, dependem do gênero e da cepa bacteriana utilizada. Essa dependência parece ser bastante evidente nos estudos que investigaram os efeitos de probióticos no tratamento das doenças periodontais. Diferentemente dos resultados obtidos em estudos clínicos que utilizaram *L. reuteri* e *L. brevis* (VIVEKANANDA et al., 2010; SHAH et al., 2013; TEUGHELIS et al., 2013; TEKCE et al., 2015; INCE et al., 2015) como adjuvante à raspagem e alisamento radicular no tratamento de indivíduos com periodontite, não foram observadas vantagens clínicas decorrentes do uso de *L. rhamnosus* e bactérias do gênero *Streptococcus* (LALEMAN et al., 2015; MORALES et al., 2016). A utilização de *Lactobacillus casei* como monoterapia também não proporcionou benefícios clínicos em indivíduos com Periodontite Crônica generalizada (IMRAN et al., 2016). Nos estudos envolvendo mucosite peri-implantar, benefícios adicionais ao debridamento mecânico foram observados com o uso de *L. reuteri* (ALQAHTANI et al., 2019; GALOFRÉ et al., 2018; FLICHY-FERNANDEZ et al., 2015 e nenhum benefício com a associação de *L. plantarum* e *L. brevis* (MONGARDINI et al., 2017).

Até o presente momento, os estudos que investigaram os efeitos de probióticos na mucosite peri-implantar usaram apenas microrganismos do gênero *Lactobacillus*. Contudo, outros potenciais probióticos merecem ser investigados. Hojo et al. (2007) avaliaram a

distribuição de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em indivíduos saudáveis ou com periodontite. Entre as 11 espécies de *Lactobacillus* detectadas na saliva, nenhuma espécie foi especificamente associada com saúde periodontal. Contrariamente, os autores observaram que espécies e contagens de *Bifidobacterium* podem estar associadas com saúde periodontal e com o progresso do tratamento em indivíduos com periodontite. Em um estudo *in vitro*, Jasberg et al. (2016) demonstraram que espécies do gênero *Bifidobacterium* podem integrar-se bem no biofilme subgengival e são capazes de reduzir significativamente o número de *Porphyromonas gingivalis*. O presente estudo é o primeiro a demonstrar o potencial de bactéria probiótica do gênero *Bifidobacterium* no tratamento da mucosite peri-implantar. A inclusão dessa cepa no coquetel de probióticos administrados aos indivíduos pode ter sido responsável pelos ótimos resultados observados nas avaliações realizadas em 24 semanas pós-operatórias. Alqahtani et al. (2019) usaram apenas microrganismos do gênero *Lactobacillus* no tratamento da mucosite peri-implantar. Os resultados demonstraram benefícios adicionais da terapia probiótica ao debridamento mecânico (redução de SS) apenas aos 3 meses pós-operatórios. Esses benefícios não foram mais observados nas avaliações de 6 meses. No presente estudo, significantes diferenças nos valores de SS permaneceram entre os grupos Teste e Controle nas avaliações de 24 semanas. Estudos prévios realizados por nosso grupo já demonstraram que *B. lactis* HN019 pode modular a microbiota bucal e a resposta imunológica do hospedeiro, contribuindo para a prevenção de doenças periodontais e para o restabelecimento da saúde dos tecidos periodontais (OLIVEIRA et al., 2017; RICOLDI et al., 2017; INVERNICI et al., 2018).

É importante destacar que os benefícios adicionais da terapia probiótica foram mantidos nas avaliações clínicas dos indivíduos deste estudo mesmo 90 dias após a interrupção de sua utilização. O grupo Teste, de 12 para 24 semanas, continuou a apresentar maiores reduções nos valores de SS do que o grupo Controle. Isso pode ser devido ao fato de algumas cepas probióticas integrarem-se ao biofilme bucal, mesmo que temporariamente. A colonização de *L. reuteri* na área subgengival, por exemplo, começa entre 14 e 21 dias após o início da terapia probiótica e permanece pelo menos até 70 a 75 dias após sua conclusão (GALOFRÉ et al., 2018), tanto em indivíduos com gengivite (INIESTA et al., 2012) quanto em periodontite crônica (TEKCE et al., 2015). Em indivíduos com periodontite e tratados com *B. lactis* HN019, cópias do genoma desse microrganismo no biofilme bucal foram encontradas 60 dias após a interrupção do seu consumo (INVERNICI et al., 2018). Meurman et al. (1994), Iniesta et al. (2012) e Tekce et al., (2015) também observaram a persistência de

bactérias do gênero *Lactobacillus* na cavidade bucal em 2, 8 e 9 semanas, respectivamente, após a descontinuação da terapia probiótica.

No presente estudo, não foram observadas diferenças entre os grupos Teste e Controle nos valores de IPM em todos os tempos analisados. É importante considerar que há controvérsias nos resultados de estudos que avaliaram os efeitos de probióticos no acúmulo de placa bacteriana. Enquanto alguns estudos demonstraram que a terapia probiótica pode reduzir os valores de placa bacteriana em dentes e implantes (ALQAHTANI et al., 2019; KURU et al., 2017; FLICHY-FERNÁNDEZ et al., 2015) outros estudos não demonstraram nenhuma interferência da terapia nesse parâmetro (PEÑA et al., 2019; GALOFRÉ et al., 2018; MONGARDINI et al., 2017; HALLSTRÖM et al., 2016; PENALA et al., 2016). Algumas cepas probióticas podem formar biofilme em tecidos duros e moles, impedindo a adesão de bactérias patogênicas, e também podem alterar a composição proteica da película salivar adquirida pela ligação e / ou degradação de proteínas salivares (HAUKIOJA, et al., 2006). Contudo, os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento de biofilmes por bactérias probióticas ainda são pobremente investigados quando comparados com aqueles que regem a formação de biofilmes por bactérias patogênicas, sobretudo no ambiente bucal. Merecem destaque também os fatores que podem afetar a atividade anti-placa de probióticos ao redor de implantes, desde que existem diferenças significativas na espessura e estrutura do biofilme formado em titânio ou em hidroxiapatita (SÁNCHEZ et al., 2014).

Um fato que chama a atenção no presente estudo é que ambos os grupos apresentaram valores semelhantes de IPM e valores bastante diferentes de SS. A terapia probiótica, mesmo quando administrada por um curto período de tempo, parece promover maior resiliência do microbioma bucal diante de fatores de risco para as inflamações dos tecidos bucais, como o acúmulo de placa bacteriana (ROSIER et al., 2017). Os resultados do presente estudo sugerem um possível efeito terapia probiótica retardando o início da inflamação peri-implantar. Lee et al. (2015) mostraram que as pastilhas de *L. brevis* atrasaram significativamente o início da inflamação gengival em indivíduos saudáveis que se abstiveram de higiene bucal. Kuru et al. (2017) demonstraram que indivíduos com gengivite experimental tratados com a cepa *B. lactis* DN-173010 durante 30 dias antes do início da gengivite apresentaram menores níveis de IL-1 $\beta$  no fluido crevicular gengival quando comparados àqueles que não fizeram o uso preventivo da referida cepa probiótica.

No presente estudo, os implantes que não apresentavam nenhum SS no *baseline* foram novamente analisados em 12 e 24 semanas para se avaliar a presença ou ausência de mucosite peri-implantar. Em 12 semanas, considerando apenas esses implantes e adotando os

critérios de inclusão do presente estudo e o indivíduo como unidade estatística, um número maior de indivíduos apresentando mucosite foi observado no grupo Controle quando comparado ao grupo Teste. O IPM desses implantes foi semelhante em todos os tempos analisados (dados não mostrados). Implante sem mucosite e tratados com probióticos também apresentaram melhores parâmetros clínicos do que aqueles tratados com placebo nas avaliações do estudo conduzido por Flichy-Fernández et al. (2015). Os autores concluíram que a administração de probióticos pode ser considerada uma boa alternativa para a prevenção da mucosite peri-implantar. Uma das hipóteses para explicar esses resultados seria a possível atuação da terapia probiótica na imunocompetência da barreira epitelial e na modulação da microbiota bucal, reforçando os mecanismos preventivos do hospedeiro contra doenças. Oliveira et al. (2017) demonstraram maior expressão de beta-defensinas nos tecidos periodontais de ratos com periodontite experimental tratados com probióticos quando comparados aos animais tratados com placebo. Beta-defensinas são peptídeos antimicrobianos que desempenham um papel importante na imunidade epitelial inata (WANG et al., 2015). Invernici et al. (2018) demonstraram que indivíduos com periodontite e tratados com probióticos apresentaram maiores taxas de bactérias comensais no biofilme subgingival quando comparados àqueles tratados com placebo aos 90 dias pós-operatórios. Essas bactérias comensais estão associadas à saúde periodontal (AAS et al., 2005, LUCAS et al., 2000, HAJISHENGALLIS et al., 2012, ABUSLEME et al., 2013, ARUNI et al., 2015) e podem ajudar a controlar a inflamação e infecção de tecidos periodontais (DEVINE et al., 2015, KUMAR e MASON, 2015). Bactérias comensais podem interferir em diversos processos biológicos associados com o reparo e manutenção da barreira epitelial (SWANSON et al.; 2011; SEGAWA et al., 2011). Esses processos podem ser importantes para a síntese e a integridade do tecido conjuntivo da mucosa peri-implantar.

No presente estudo, 33,3% dos indivíduos do grupo Teste não apresentaram nenhum sinal de SS em 24 semanas pós-operatórias. No grupo Controle, esse percentual foi de 16,6%. Esse percentual obtido no grupo Teste, embora duas vezes maior que aquele do Grupo Controle, demonstra a dificuldade de resolução completa da inflamação a longo prazo em casos de mucosite peri-implantar. Esses achados estão de acordo com um estudo anterior, o qual demonstrou que apenas 30% dos implantes diagnosticados com mucosite peri-implantar encontravam-se totalmente livres de SS em 6 semanas após debridamento mecânico e terapia fotodinâmica (MONGARDINI et al 2017). Heitz-Mayfield et al. (2011) demonstraram que 38% dos implantes com mucosite peri-implantar alcançaram a resolução completa da doença em 3 meses após debridamento mecânico. Peña et al. (2019) demonstraram que 32% dos

implantes diagnosticados com mucosite estavam livres de SS aos 135 dias após tratamento com probióticos e debridamento mecânico. Algumas revisões sistemáticas confirmaram que, apesar das melhorias clinicamente importantes observadas após o tratamento da mucosite peri-implantar, a resolução completa da mucosite pode não ser esperada (SCHWARZ et al, 2015, SALVI & RAMSEIER, 2015). Resolução completa da mucosite peri-implantar foi definida como ausência de SS ao redor de um implante dentário após tratamento da mucosite (SANZ & CHAPPLE, 2012). Embora esse resultado foi demonstrado em estudos pré-clínicos (ERICSSON et al., 1995) e em estudos em humanos (PONTORIERO et al., 1994; SALVI, AGLIETTA, EICK, SCULEAN, & RAMSEIER, 2012), definindo assim a mucosite peri-implantar como lesão reversível, estudos clínicos demonstraram não ser fácil alcançar esse a longo prazo (SCHWARZ et al., 2015).

Neste estudo, diversos fatores que poderiam interferir nos resultados obtidos foram controlados. As cápsulas contendo probióticos foram monitoradas ao longo do estudo para verificar a manutenção da viabilidade e quantidade de UFC dos microrganismos testados. As formas de administração da terapia probiótica (bochechos e aplicações tópicas) foram planejadas para maximizar o contato dos microrganismos com os tecidos peri-implantares. Antes de aplicação da terapia probiótica, um tratamento mecânico meticuloso foi realizado visando a máxima remoção de biofilme nos grupos Teste e Controle. Todos os implantes analisados apresentavam o mesmo tratamento de superfície e plataforma protética do tipo hexágono externo conectadas a mini pilares. Não houve diferença significativa entre os grupos Teste e Controle para todas as variáveis demográficas no *baseline*, sobretudo para AMC (médias de 2,09 e 2,57 para os grupos Teste e Controle, respectivamente). Em um estudo controlado e randomizado, Schwarz et al. (2018) analisaram a influência da AMC no desenvolvimento e resolução de lesões experimentais de mucosite peri-implantar em humanos. Realizaram análises de regressão linear para a relação entre a AMC e as variáveis clínicas (SS, PS, ISSm e IPM). Foram observadas correlações significativas entre AMC e todas as variáveis clínicas. Os autores concluíram que a presença de AMC maior que 2 mm teve efeito positivo na resolução das lesões experimentais de mucosite peri-implantar.

O presente estudo é o primeiro a demonstrar o potencial de um coquetel de microrganismos associando bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* no tratamento da mucosite peri-implantar. Uma limitação deste estudo é o curto período de avaliação dos indivíduos tratados. Um acompanhamento desses indivíduos em períodos mais longos seria importante para verificar se os efeitos adicionais proporcionados pela terapia probiótica ao debridamento mecânico seriam mantidos ao longo do tempo. Análises



microbiológicas e imunológicas também seriam importantes para elucidar os mecanismos de ação da terapia probiótica. Novos estudos são ainda fundamentais para avaliar a possível influência de diversos fatores relacionados à terapia probiótica nos resultados obtidos, tais como: dose diária, frequência de administração diária, período de administração (antes, durante ou após as refeições), duração da administração, veículo usado para a liberação do probiótico (comida fermentada, bebida, cápsula, comprimido ou pó), viabilidade da cepa probiótica e tempo de permanência da cepa probiótica no ambiente bucal após a descontinuação da terapia. Os efeitos de bactérias probióticas em indivíduos que apresentam fatores de risco sistêmicos e locais para as doenças peri-implantares também devem ser investigados.



## 6. CONCLUSÃO

---



## 6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a utilização de probiótico multiespécies (*B. lactis* HN019<sup>TM</sup>, *L. rhamnosus* HN001<sup>TM</sup> e *L. paracasei* Lpc-37<sup>®</sup>) como recurso adjuvante ao debridamento mecânico promove benefícios clínicos adicionais no tratamento de indivíduos com mucosite peri-implantar. A resolução completa da doença não foi obtida em todos os casos.



## REFERÊNCIAS

---





**REFERÊNCIAS**

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov; 43(11):5721-32.
- Abusleme L, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013 May;7(5):1016-25.
- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981 Dec; 10(6):387-416.
- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975 Dec; 25(4):229-35.
- Alkaya B, Laleman I, Keceli S, Ozcelik O, Cenk Haytac M, Teughels W. Clinical effects of probiotics containing *Bacillus* species on gingivitis: a pilot randomized controlled trial. *J Periodontal Res.* 2017 Jun; 52(3):497-504.
- Alqahtani F, Alqahtani M, Shafqat SS, Akram Z, Al-Kheraif AA, Javed F. Efficacy of mechanical debridement with adjunctive probiotic therapy in the treatment of peri-implant mucositis in cigarette-smokers and never-smokers. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019 Aug;21(4):734-740.
- Aruni AW, Dou Y, Mishra A, Fletcher HM. The Biofilm Community-Rebels with a Cause. *Curr Oral Health Rep.* 2015 Mar 1;2(1):48-56.
- Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion Jr. CM, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2013 Nov;84(11):1586-98.
- Barbosa ALT, Silva WP, Martinez Junior W, Cunha HA, Cruz RM. Mechanical and biological failures on the implants' prosthesis. *ImplantNewsPerio* 2006;3:263-269.
- Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S313-S318.
- Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res.* 1991 Apr-Jun;2(2):81-90.
- Berglundh T, Lindhe J, Jonsson K, Ericsson I. The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues dog. *J Clin Periodontol.* 1994 Mar;21(3):189-93.
- Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog *Clin Oral Implants Res.* 1992 Mar;3(1):1-8.
- Bizzini B, Pizzo G, Scapagnini G, Nuzzo D, Vasto S. Probiotics and oral health. *Curr Pharm Curr Pharm Des.* 2012;18(34):5522-31.

Bosch M, Nart J, Audivert S, Bonachera MA, Alemany AS, Fuentes MC, Cuñé J. Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Arch Oral Biol*. 2012 May;57(5):539-49.

Brånemark PI, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A(1969) Intra-Osseous Anchorage of Dental Prostheses: I. Experimental Studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100. DOI: 10.3109/02844316909036699.

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallen O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977;16:1-132.

Buser B, Sennerby L, Bruyn H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. *Periodontol 2000*. 2017 Feb;73(1):7-21.

Ciancio SG, Lauciello F, Shibly O, Vitello M, Mather M. The effect of an antiseptic mouthrinse on implant maintenance: plaque and peri-implant gingival tissues. *J Periodontol*. 1995 Nov; 66(11):962-5.

Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, Gardy JL, Chikatamarla A, Gellatly S, Yu LL, Pistolic J, Falsafi R, Tagg J, Hancock REW. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun*. 2008 Sep;76(9):4163-75

Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LO, Ferreira SD, Silva GL, Costa JE. 2012. Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: a 5-year follow-up. *J J Clin Periodontol*. 2012 Feb;39(2):173-81.

Cosyn J, Van Aelst L, Collaert B, Persson GR, De Bruyn H. The peri-implant sulcus compared with internal implant and supra-structure components: a microbiological analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011 Dec;13(4):286-95.

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

Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology *J Clin Periodontol*. 2015 Apr;42 Suppl 16:S158-71.

Devine, DA, Marsh PD, Meade J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *J Oral Microbiol*. 2015 Feb 6;7:26941.

Ericsson I, Berglundh T, Marinello C, Liljenberg B, Lindhe J. (1992) Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 1992 Sep;3(3):99-103.

Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Klinge B. (1995). Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. *J Clin Periodontol*. 1995 Mar;22(3):255-61.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*. 1998 Feb;106(1):527-51.

- Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV. Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol*. 2012;5 Suppl:S21-41.
- Flichy-Fernandez AJ, Ata-Ali J, Alegre-Domingo T, Candel-Mart E, Ata-Ali F, Palacio JR, Penarrocha-Diago M. The effect of orally administered probiotic *Lactobacillus reuteri*-containing tablets in peri-implant mucositis: a double-blind randomized controlled trial. *J Periodontal Res*. 2015 Dec;50(6):775-85.
- Galofré M, Palao D, Vicario M, Nart J, Violant D. Clinical and microbiological evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* in the treatment of mucositis and peri-implantitis: A triple-blind randomized clinical trial. *J Periodontal Res*. 2018 Jun;53(3):378-390.
- Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008 Dec;81(4):591-606.
- Gordon DM. The potential of bacteriocin producing probiotics and associated caveats. *Future Microbiol*. 2009 Oct;4(8):941-3.
- Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2016 May;48:16-25.
- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):512-9.
- Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan;15(1):30-44.
- Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Oct;10(10):717-25.
- Hallström H, Lindgren S, Widén C, Renvert S, Twetman S. Probiotic supplements and debridement of peri-implant mucositis: a randomized controlled trial. *Acta Odontol Scand*. 2016;74(1):60-6.
- Hallstrom H, Lindgren S, Yucel-Lindberg T, Dahlen G, Renvert S, Twetman S. Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):828-33.
- Harini PM, Anegundi RT. Efficacy of a probiotic and chlorhexidine mouth rinses: a short-term clinical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2010 Jul-Sep;28(3):179-82.
- Haukioja A, Yli-Knuutila 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 Microbiol Immunol*. 2006 Oct;21(5):326-32.
- Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Antimicrobial treatment of peri-implant diseases. *International Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19 Suppl:128-39.
- Heitz-Mayfield, LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. Peri-implantitis. *Periodontol 2000*. 2010 Jun;53:167-81.

Heitz-Mayfield LJ, Salvi GE, Botticelli D, Mombelli A, Faddy M, Lang NP, Implant Complication Research Group. Anti-infective treatment of peri-implant mucositis: a randomised controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Mar;22(3):237-41.

Hojo 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 Jan;71(1):152-7.

Hurzeler MB, Quinones CR, Morrison EC, Caffesse RG. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 1: clinical findings and histologic observations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995 Jul-Aug;10(4):474-84.

Imran MY, Reehana N, Jayaraj KA, Ahamed AA, Dhanasekaran D, Thajuddin N, Alharbi NS, Muralitharan G. Statistical optimization of exopolysaccharide production by Lactobacillus plantarum NTMI05 and NTMI20. *Int J Biol Macromol.* 2016 Dec;93(Pt A):731-745.

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 Jun;86(6):746-54.

Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbriggen M, Matos AR, Marin MJ, et al. Probiotic effects of orally administered Lactobacillus reuteri-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J J Clin Periodontol.* 2012 Aug;39(8):736-44.

Insua A, Monje A, Wang H-L, Miron RJ. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J Biomed Mater Res A.* 2017 Jul;105(7):2075-2089.

Invernici MM, Salvador SL, Silva PHF, Soares MSM, Casarin R, Palioto DB, Souza SLS, Taba M Jr, Novaes AB Jr, Furlaneto FAC, Messoria MR. Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2018 Oct;45(10):1198-1210.

Isidor, F. Clinical probing and radiographic assessment in relation to the histologic bone level at oral implants in monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Aug;8(4):255-64.

Jäsberg H, Söderling E, Endo A, Beighton D, Haukioja A. Bifidobacteria inhibit the growth of Porphyromonas gingivalis but not of Streptococcus mutans in an in vitro biofilm model. *Eur J Oral Sci.* 2016 Jun;124(3):251-8.

Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, Figuero E, Giovannoli, JL, Goldstein M, Lambert F, Ortiz-Vigon A, Polyzois I, et. al. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol.* 2015 Apr;42 Suppl 16:S152-7.

Jervoe-Storm PM, Jepsen S, Johren P, Mericke-Stern R, Enkling N. Internal bacterial colonization of implants: association with peri-implant bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Aug;26(8):957-963.

- Ji Y-J, Tang Z-H, Wang R, Cao J, Cao C-F, Jin L-J. Effect of glycine powder air-polishing as an adjunct in the treatment of peri-implant mucositis: a pilot clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Jun;25(6):683-9.
- Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J* 2006;30(2):55-60.
- Kumar PS, Mason MR. Mouthguards: does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health? *Front Cell Infect Microbiol.* 2015 May 6;5:35.
- Kuru BE, Laleman I, Yalnizoglu T, Kuru L, Teughels W. The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol.* 2017 Nov;88(11):1115-1123.
- Laleman I, Yilmaz E, Ozcelik O, Haytac C, Pauwels M, Herrero ER, Slomka V, Quirynen M1, Alkaya B, Teughels W. The effect of a streptococci containing probiotic in periodontal therapy: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2015 Nov;42(11):1032-41.
- Laleman I, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. The usage of a lactobacilli probiotic in the non-surgical therapy of peri-implantitis: A randomized pilot study. *Clinical Oral Implants Research.* DOI: 10.1111/clr.13555.
- Lang NP, Berglundh T, Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: where are we now? Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011 Mar;38 Suppl 11:178-81.
- Lang NP, Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Histologic probe penetration in healthy and inflamed peri-implant tissues. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Dec;5(4):191-201.
- Lang NP, Bosshardt DD, Lulic M. Do mucositis lesions around implants differ from gingivitis lesions around teeth? *J Clin Periodontol.* 2011 Mar;38 Suppl 11:182-7.
- Langdon A, Crook N, Dantas G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med.* 2016 Apr 13;8(1):39.
- Lee C-T, Huang Y-W, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017 Jul;62:1-12.
- Lee JK, Kim SJ, Ko SH, Ouwehand AC, Ma DS. Modulation of the host response by probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 in experimental gingivitis. *Oral Dis.* 2015 Sep;21(6):705-12.
- Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999 Oct;10(5):339-45.
- Lindhe J, Meyle J, Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):282-5.

Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of periimplant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Mar;3(1):9-16.

Lindhe J, Lang NP. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* Ch 4. p.83-99, 6<sup>th</sup> ed. 2015. UK.

Linkevicius T, Puisys A, Vindasiute E, Linkeviciene L, Apse P. Does residual cement around implant-supported restorations cause peri-implant disease? A retrospective case analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Nov;24(11):1179-84.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965 May-Jun;36:177-87.

Lucas VS, Beighton D, Roberts GJ. Composition of the oral streptococcal flora in healthy children. *J Dent.* 2000 Jan; 28(1):45-50.

Luterbacher S, Mayfield L, Br€agger U, Lang NP. Diagnostic characteristics of clinical and microbiological tests for monitoring periodontal and peri-implant mucosal tissue conditions during supportive periodontal therapy (SPT). *Clin Oral Implants Res.* 2000 Dec;11(6):521-9.

Marinello CP, Berglundh T, Ericsson I, Klinge B, Glantz PO, Lindhe J. Resolution of ligature-induced peri-implantitis lesions in the dog. *J Clin Periodontol.* 1995 Jun;22(6):475-9.

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003;149(Pt 2):279-94.

Martin-Cabezas R, Davideau JL, Tenenbaum H, Huck O. Clinical efficacy of probiotics as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2016;43(6):520-30.

Maximo MB, de Mendonca AC, Renata SV, Figueiredo LC, Feres M, Duarte PM. Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Jan;20(1):99-108.

Messora MR, et al. *Terapêuticas atuais no manejo da doença periodontal e peri-implantar.*: Cap. 08. 1ed. São Paulo: Napoleão, 2017. 416p.

Meurman JH, Antila H, Salminen S. Recovery of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium. *Microb Ecol Health Dis.* 1994 Jan;7(6), 295-298.

Mombelli A, Van Oosten MAC, Schiirch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol.* 1987 Dec;2(4):145-51.

Mongardini C, Pilloni A, Farina R, Di Tanna G, Zeza B. Adjunctive efficacy of probiotics in the treatment of experimental peri-implant mucositis with mechanical and photodynamic therapy: a randomized, cross-over clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2017 Apr;44(4):410-417. doi: 10.1111/jcpe.12689. Epub 2017 Feb 18.

- Monje A, Wang HL, Nart J. Association of Preventive Maintenance Therapy Compliance and Peri-Implant Diseases: A Cross-Sectional Study. *J Periodontol*. 2017 Oct;88(10):1030-1041.
- 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 Aug;87(8):944-52.
- Nadkerny PV, Ravishankar PL, Pramod V, Agarwal LA, Bhandari S. A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study. *J Indian Soc Periodontol*. 2015 Nov-Dec;19(6):633-9.
- Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int J Med Microbiol*. 2010 Jan;300(1):57-62.
- Oliveira LFF, Salvador SL, Silva PHF, Furlaneto FAC, Figueiredo L, Casarin R, Ervolino E, Palioto DB, Souza SLS, Taba Jr. M, Novaes Jr. AB, Messoria MR. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol*. 2017 Feb;88(2):197-208.
- Paquette DW, Rosenberg A, Lohinai Z, Southan GJ, Williams RC, Offenbacher S et al. Inhibition of experimental gingivitis in beagle dogs with topical mercaptoalkylguanidines. *J Periodontol*. 2006 Mar;77(3):385-91.
- Pellizzer EP, Verri FR, Santiago Junior JF, Almeida DAF – Fatores Biomecânicos nas Próteses Implantossuportadas – In: Miyashita E. Reabilitação Oral Contemporânea Baseada em evidências científicas. São Paulo, Ed. Napoleão, 2014: 519 pags.
- Peña M, Barallat L, Vilarrasa J, Vicario M, Violant D, Nart J. Evaluation of the effect of probiotics in the treatment of peri-implant mucositis: a triple-blind randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2019 Apr;23(4):1673-1683.
- Penala S, Kalakonda B, Pathakota KR, Jayakumar A, Koppolu P, Lakshmi BV, Pandey R, Mishra A. Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: A randomized controlled trial. *J Res Pharm Pract*. 2016 Apr-Jun;5(2):86-93.
- Persson LG, Ericsson I, Berglundh T, Lindhe J. Guided bone regeneration in the treatment of periimplantitis. *Clin Oral Implants Res*. 1996 Dec;7(4):366-72.
- Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. (1994) Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 1994 Dec;5(4):254-9.
- Porras R, Anderson GB, Caffesse R, Narendran S, Trejo PM. Clinical response to 2 different therapeutic regimens to treat peri-implant mucositis. *J Periodontol*. 2002 Oct;73(10):1118-25.

- Pulcini A, Bollaín J, Sanz-Sánchez I, Figuero E, Alonso B, Sanz M, Herrera D. Clinical effects of the adjunctive use of a 0.03% chlorhexidine and 0.05% cetylpyridinium chloride mouth rinse in the management of peri-implant diseases: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2019 Mar;46(3):342-353.
- Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. (2006) Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Feb;17(1):25-37.
- Rao Y, Lingamneni B, Reddy D. Probiotics in oral health--a review. *J N J Dent Assoc*. 2012 Spring;83(2):28-32.
- Renvert S, Polyzois I. Treatment of pathologic peri-implant pockets. *Periodontol 2000*. 2018 Feb;76(1):180-190.
- Renvert S, Samuelsson E, Lindahl C, Persson GR. Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a double-blind randomized longitudinal clinical study. I: clinical results. *J Clin Periodontol*. 2009 Jul;36(7):604-9.
- Renvert, S. & Polyzois, I. (2015) Risk indicators for peri-implant mucositis: a systematic literature review. *Journal of Clinical Periodontology* 42 (Suppl. 16), 172–186.
- Renvert S, Roos-Jansaker AM, Claffey N. (2008) Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):305-15.
- Riben-Grundstrom C, Norderyd O, Andre U, Renvert S. Treatment of peri-implant mucositis using a glycine powder air-polishing or ultrasonic device: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2015 May;42(5):462-9. doi: 10.1111/jcpe.12395.
- Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, Ervolino E, de Oliveira MN, Bogsan CSB, Salvador SL, Messoria MR. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One*. 2017 Jun 29;12(6): e0179946. doi: 10.1371/journal.pone.0179946. eCollection 2017.
- Roos-Jansaker AM, Almhojd US, Jansson H. Treatment of peri-implantitis: clinical outcome of chloramine as an adjunctive to non-surgical therapy, a randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2017 Jan;28(1):43-48.
- Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J Dent Res*. 2018 Apr;97(4):371-380.
- Salvi GE, Cosgarea R, Sculean A. Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases. *J Dent Res*. 2017 Jan;96(1):31-37.
- Salvi GE, Ramseier CA. Efficacy of patient-administered mechanical and/or chemical plaque control protocols in the management of peri-implant mucositis. A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr;42 Suppl 16:S187-201.



- Salvi GE, Aglietta M, Eick S, Sculean A, Ramseier CA. Reversibility of experimental peri-implant mucositis compared with experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Feb;23(2):182-190.
- Sánchez MC, Llama-Palacios A, Fernández E, Figuero E, Marín MJ, León R, Sanz M. An in vitro biofilm model associated to dental implants: Structural and quantitative analysis of in vitro bio-film formation on different dental implant surfaces. *Dent Mater.* 2014 Oct;30(10):1161-71.
- Santamaria MP, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Junior FH, Sallum AH. Peri-implant diseases: etiology of risk factors. *ImplantNewsPerio.* 2012;7:171.
- Sanz M, Chapple IL. Clinical research on peri-implant diseases: Consensus report of Working Group 4. *J Clin Periodontol.* 2012 Feb;39 Suppl 12:202-6.
- Schwarz F, Becker J, Civale S, Sahin D, Iglhaut T, Iglhaut G. Influence of the width of keratinized tissue on the development and resolution of experimental peri-implant mucositis lesions in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Jun;29(6):576-582.
- Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018 Jun;45 Suppl 20:S246-S266.
- Schwarz F, Becker K, Sager M. Efficacy of professionally administered plaque removal with or without adjunctive measures for the treatment of peri-implant mucositis. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2015 Apr;42 Suppl 16:S202-13.
- Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One.* 2011;6(8):e23278.
- Serino G, Strom C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20: 169–174.
- Shah MP, Gujjari SK, Chandrasekhar VS. Evaluation of the effect of probiotic (inersan(R)) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. *J Clin Diagn Res.* 2013 Mar;7(3);595-600.
- Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, Hirata H. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008 Oct;35(10):897-905.
- Sliepen I, Van Damme J, Van Essche M, Loozen G, Quirynen M, Teughels W. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res.* 2009 Nov;88(11):1026-1030.
- Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol.* 2001 Feb;90(2):172-9.
- Staab B, Eick S, Knöfler G, Jentsch H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J Clin Periodontol.* 2009 Oct;36(10):850-6.

- Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal Disease. *Periodontol* 2000 2009;51:141-151.
- Strooker H, Rohn S, Van Winkelhoff AJ. Clinical and microbiologic effects of chemical versus mechanical cleansing in professional supportive implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998 Nov-Dec;13(6):845-50.
- Swanson PA 2nd, Kumar A, Samarin S, Vijay-Kumar M, Kundu K, Murthy N, Hansen J, Nusrat A, Neish AS. Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 24;108(21):8803-8.
- Tada H, Masaki C, Tsuka S, Mukaibo T, Kondo Y, Hosokawa R. The effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics combined with azithromycin on peri-implantitis: A randomized placebo-controlled study. *J Prosthodont Res*. 2018 Jan;62(1):89-96.
- Tekce M, Ince G, Gursoy H, Dirikan Ipci S, 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 Apr;42(4):363-72.
- Terry DA, Geller W. *Esthetic and Restorative Dentistry: material selection and technique*. Quintessence. 2014, 752p.
- Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and or surface topography on bio-film development. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct;17 Suppl 2:68-81.
- 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 Nov;40(11):1025-35.
- Thone-Muhling M, Swierkot K, Nonnenmacher C, Mutters R, Flores-de-Jacoby L, Mengel, R. Comparison of two full-mouth approaches in the treatment of peri-implant mucositis: a pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2010 May;21(5):504-12.
- Tonetti MS, Chapple IL, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr;42 Suppl 16:S1-4.
- Trejo PM, Bonaventura G, Weng D, Caffesse RG, Bragger U, Lang NP. Effect of mechanical and antiseptic therapy on peri-implant mucositis: an experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Jun;17(3):294-304.
- Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel–Lindberg T, Stecksen–Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(1):19-24.
- Valente NA, Andreana S. *J Periodontal Implant Sci*. 2016 Jun;46(3):136-51.doi: 10.5051/jpis.2016.46.3.136. Epub 2016 Jun 29.

- Van Hoogmoed CG, van der Kuijl-Booij M, van der Mei HC, Busscher HJ. Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salivary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000 March 66(2):659-663.
- Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, et al. Design of dental implants, influence on the osteogenesis and fixation. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Aug;19(8):2851-7.
- Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol*. 2010 Nov 2;2.
- Wang P, Duan D, Zhou X, Li X, Yang J, Deng M, Xu Y. Relationship between expression of human gingival beta-defensins and levels of periodontopathogens in subgingival plaque. *J Periodontal Res*. 2015 Feb;50(1):113-22.
- Welander M, Abrahamsson I, Berglundh T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Jul;19(7):635-41.
- Yu XL, Chan Y, Zhuang LF, Lai HC, Lang NP, Lacap-Bugler DC, et al. Distributions of *Synergistetes* in clinically-healthy and diseased periodontal and peri-implant niches. *Microb Pathog*. 2016 May;94:90-103.
- Zavanelli AC, Mazaro JV, Mestreneur SR, Zavanelli RA. Functional and esthetic rehabilitation with in-ceram alumina and zirconia system: a multidisciplinary approach. *J Contemp Dent Pract*. 2011 Jan 1;12(1):68-72.
- Zhang G, Chen R, Rudney JD. *Streptococcus cristatus* attenuates *Fusobacterium nucleatum*-induced interleukin-8 expression in oral epithelial cells. *J Periodontal Res*. 2008 Aug;43(4):408-16.
- Zitzmann NU, Berglundh T. Definition of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct; 35(8 Suppl):286-91.



ANEXOS

---



## ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Prof. Dr. Michel Reis Messora, Profa. Dra. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto e Sandro Isaías Santana convidamos você, \_\_\_\_\_, a participar da pesquisa “**Análise do controle de bactérias causadoras de periimplantite pela utilização de probióticos**”

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos da Terapia Probiótica como auxiliar ao tratamento não cirúrgico da inflamação da gengiva ao redor dos implantes (Mucosite Periimplantar). Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos, principalmente bactérias, seguros para o consumo e capazes de produzirem efeitos benéficos para a saúde quando ingeridos em quantidades suficientes. Antes do estudo começar, você receberá instruções específicas de higiene bucal e uma limpeza de sua prótese. Serão feitas fotografias e radiografias de seus implantes. Logo em seguida, você será encaixado em um dos seguintes grupos experimentais: controle ou teste. **INDEPENDENTE DO GRUPO QUE VOCÊ FOR ENCAIXADO, VOCÊ RECEBERÁ TRATAMENTO PERIIMPLANTAR ADEQUADO. DESTA FORMA, VOCÊ TERÁ SUA PRÓTESE REMOVIDA, LIMPA E POLIDA. ALÉM DISSO, OS IMPLANTES COM MUCOSITE SERÃO RASPADOS E POLIDOS.** Você não saberá em qual grupo foi encaixado durante todo o estudo. Você receberá no início do estudo 60 pastilhas. Apenas as pastilhas do grupo teste apresentarão bactérias vivas ( $10^9$  unidades formadoras de colônias de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* HN019,  $10^9$  UFCs de *Lactobacillus rhamnosus* e  $10^9$  UFCs de *Lactobacillus paracasei* por grama) as quais são seguras para o consumo e podem promover equilíbrio de sua flora intestinal.

Após a realização da limpeza profissional (raspagem e polimento) em todos os seus implantes com inflamação, você deverá consumir duas vezes ao dia durante 24 semanas, dissolvendo a capsula de probióticos em 20 ml de água, bochechando por 30 segundos e depois engolindo, antes de dormir e pela manhã. Ao longo do estudo, serão coletadas algumas informações clínicas para avaliação da sua saúde gengival (sangramento gengival, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, índice de placa), microbiológicas (coleta



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

de bactérias aderidas aos implantes) e imunológicas (coleta do líquido existente entre a gengiva e os implantes) com a finalidade de documentação e avaliação dos resultados obtidos. Você será acompanhado(a) por um período de 6 meses.

Os procedimentos que poderão lhe causar incômodo são: exames periodontais (procedimentos de sondagem, coleta de placa e coleta de líquido existente entre a gengiva e os implantes) que serão realizados em sua boca, fotografias, radiografias, raspagem e alisamento dos implantes. Os riscos que podem existir são os mesmos riscos atribuídos às pessoas que se submetem ao tratamento dos implantes e das gengivas e que necessitam de anestesia local. Todos os procedimentos necessários para minimização dos riscos existentes serão cuidadosamente observados. O consumo do probiótico poderá provocar gases intestinais temporários e mínimo desconforto.

Todos os dados relacionados com você serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados será realizada preservando sempre a sua identidade. Você será identificado (a) por um número ou apenas por suas iniciais, não tendo seu nome ou dados que lhe possa identificar revelados.

A sua participação não é obrigatória e você poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não participação neste projeto de pesquisa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Você terá garantido o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte urbano e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames.

O presente Termo, confeccionado em duas vias de igual teor, será assinado na última página e rubricado nas demais páginas pelos pesquisadores e pelo participante da pesquisa. Você receberá uma via deste termo, com o endereço e telefone do pesquisador e da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP/USP. Caso tenha alguma dúvida ou não esteja satisfeito em participar da pesquisa e não queira falar com os pesquisadores, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa no endereço: Av. do Café s/ nº, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP,





**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

14.040-904; Telefone: (16) 3315-0493; e-mail: [cep@forp.usp.br](mailto:cep@forp.usp.br). Horário de atendimento: de segunda a sexta-feira, das 13h30 às 17h30 (exceto feriados e pontos facultativos). Caso entre em contato seu nome será mantido em segredo.

---

Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia  
 Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP  
 Av. do Café s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP, Brasil  
 Telefone: (16) 3315-4140

---

Prof. Dra. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto, DDS, PhD

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia  
 Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP  
 Av. do Café s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP, Brasil  
 Telefone: (16) 3315-4140

---

Sandro Isaías Santana

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia  
 Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP  
 Av. do Café s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP, Brasil  
 Telefone: (16) 3315-4140 (35) 9 8806-6500

**Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.**

---

Sujeito da pesquisa

RG..... Telefone.....

Endereço.....

.....

.....

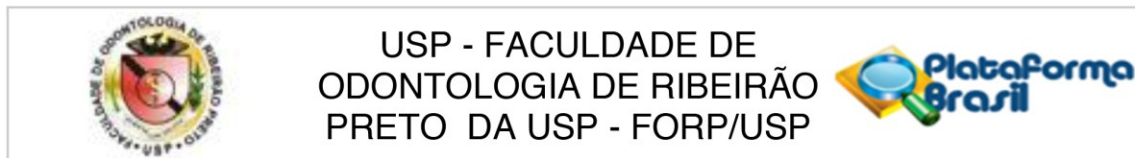
Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

---

AVENIDA DO CAFÉ S/Nº

14040-904 – RIBEIRÃO PRETO – S.P. - BRASIL

## ANEXO 2 – Parecer Consubstanciado do CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Probióticos e implantes dentários.

**Pesquisador:** Michel Reis Messoria

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 82840117.4.0000.5419

**Instituição Proponente:** Universidade de Sao Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.574.336

#### Apresentação do Projeto:

Será um experimento randomização, duplo-cego, controlado por placebo. Serão selecionados 40 pacientes (2 grupos de 20) reabilitados com próteses totais do tipo protocolo de Branemark na arcada inferior há mais de 6 meses. Estes pacientes serão, portanto, desdentados totais na mandíbula. Haverá comparação dos dados do grupo tratado com eliminação mecânica da placa bacteriana associada à administração tópica e sistêmica de probióticos com o grupo tratado com eliminação mecânica da placa bacteriana associada à administração tópica e sistêmica de placebo. Desta forma, os pacientes do grupo placebo não terão prejuízo em seu tratamento já que serão tratados da forma que a mucosite é tratada atualmente.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo geral:** Avaliar o efeito adjuvante da terapia com probióticos no tratamento da mucosite periimplantar em pacientes reabilitados com prótese suportada por implantes osseointegráveis na arcada inferior conforme o protocolo Branemark.

**Objetivos específicos:** Avaliar em pacientes portadores de mucosite peri-implantar, tratados ou não com probióticos: " Parâmetros clínicos: IGM, IPM, PS e SS; " Níveis de IL-1, IL-6, IL-8, Fator de necrose tumoral (TNF)-, IL-17 e IL-33 presentes no fluido crevicular peri-implantar por meio de imunoenaios enzimáticos (Luminex™ xMAP®); " Microbiota do sulco peri-implantar por meio de sequenciamento de nova geração de DNA metagenômico (Illumina MiSeq).

**Endereço:** Avenida do Café s/n°

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-904

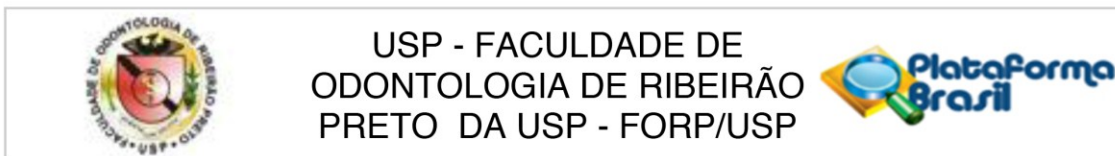
**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-0493

**Fax:** (16)3315-4102

**E-mail:** cep@forp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.574.336

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Os procedimentos que poderão causar incômodo são: exames periodontais (procedimentos de sondagem, coleta de placa e coleta de líquido crevicular), fotografias, radiografias, raspagem e alisamento dos implantes. Os riscos que podem existir são os mesmos riscos atribuídos às pessoas que se submetem ao tratamento dos implantes e das gengivas e que necessitam de anestesia local. Todos os procedimentos necessários para minimização dos riscos existentes serão cuidadosamente observados. O consumo do probiótico poderá provocar gases intestinais temporários e mínimo desconforto.

Benefícios: Os pacientes terão garantido o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte urbano e alimentação nos dias em que for necessária presença para consultas ou exames. Além disso, todo o tratamento da mucosite e polimento da prótese não terá custos para o paciente.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto bem delineado, embasado cientificamente e nas normativas do CEP FORP/USP e CONEP.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Presentes e adequados.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O pesquisador atendeu à todas as solicitações do CEP FORP/USP. Projeto de pesquisa aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto aprovado conforme deliberado na 214ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 26/04/2018.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                       | Postagem               | Autor               | Situação |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|---------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1049396.pdf | 08/03/2018<br>10:11:47 |                     | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Tcle.docx                                     | 08/03/2018<br>10:10:55 | Michel Reis Messora | Aceito   |
| Declaração de Instituição e                               | Infraestrutura_clinica.pdf                    | 01/02/2018<br>15:40:11 | Michel Reis Messora | Aceito   |

**Endereço:** Avenida do Café s/nº

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-904

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-0493

**Fax:** (16)3315-4102

**E-mail:** cep@forp.usp.br



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP - FORP/USP



Continuação do Parecer: 2.574.336

|                                            |                                      |                        |                     |        |
|--------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------------|--------|
| Infraestrutura                             | Infraestrutura_clinica.pdf           | 01/02/2018<br>15:40:11 | Michel Reis Messora | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Infraestrutura_departamento.jpeg     | 01/02/2018<br>15:39:24 | Michel Reis Messora | Aceito |
| Folha de Rosto                             | Folha_de_rosto.pdf                   | 01/02/2018<br>15:38:41 | Michel Reis Messora | Aceito |
| Outros                                     | Declaracao_de_participacao.jpeg.jpeg | 01/02/2018<br>09:36:00 | Michel Reis Messora | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador  | Clinical_Study_27_01_18_20_07.docx   | 01/02/2018<br>09:30:26 | Michel Reis Messora | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIBEIRAO PRETO, 02 de Abril de 2018

---

**Assinado por:**  
**Simone Cecilio Hallak Regalo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida do Café s/nº

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-904

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-0493

**Fax:** (16)3315-4102

**E-mail:** cep@forp.usp.br

---

**ANEXO 3 – Artigo Científico Submetido para Publicação no Periódico Journal of Clinical Periodontology**

**Adjuvant use of multispecies probiotic in the treatment of peri-implant mucositis: a randomized controlled trial.**

Sandro I. Santana DDS, MS<sup>1</sup>; Pedro H. F. Silva, DDS<sup>1</sup>; Sérgio L. Salvador, Pharm.D, PhD<sup>2</sup>; PhD<sup>1</sup>; Flávia A. C. Furlaneto, DDS, PhD<sup>1</sup>; Michel R. Messoria, DDS, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirao Preto / SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto / SP, Brazil.

**Corresponding author:**

Michel R. Messoria

Av. Café s/n Ribeirão Preto-SP 14020-150

Telephone number: +55 16 3315 4135 / Fax number: +55 16 3315 4788

Email address: m.messoria@forp.usp.br

**Running Title: Probiotics on peri-implant mucositis**

**Keywords:** Mucositis; Probiotic; Dental implant.

**Conflict of Interest:** The authors report no conflicts of interest related to this study.

## ABSTRACT

**Aim:** This randomized placebo-controlled clinical trial evaluated the adjuvant effect of multispecies probiotic on the treatment of peri-implant mucositis.

**Materials and Methods:** Thirty-six peri-implant mucositis patients were recruited and monitored clinically at baseline and 12 and 24 weeks after mechanic debridement. All patients were randomly assigned to a Test (Probiotic+SRP, n=18) or Control (Placebo+SRP, n=18) group. The probiotic capsules were used twice a day for 12 weeks. The data were statistically analyzed.

**Results:** At 12 and 24 weeks, bleeding on probing (BOP) was lower in the test group than in the control group ( $p < 0.05$ ). 33.3% of the patients from the test group did not show any sign of BOP at 24 weeks. This rate was 16.6% in the control group ( $p < 0.05$ ). At 12 weeks, a greater number of new diseased sites (BOP-positive) were observed in the control group when compared to the test group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The use of multispecies probiotic as an adjunct to mechanical debridement promotes additional clinical benefits in the treatment of peri-implant mucositis. (*ClinicalTrials.gov* NCT04187222)

## CLINICAL RELEVANCE

*Scientific rationale for the study:* New strategies for the treatment and prevention of peri-implant diseases are sought, since conventional mechanical treatment may not completely eliminate the disease or prevent its recurrence.

*Principal findings:* Probiotic therapy significantly reduced bleeding on probing at diseased peri-implant sites and contributed to the maintenance of health in sites without mucositis.

*Practical implications:* The use of probiotics as an adjunct to mechanic debridement may be an important therapeutic strategy in the treatment and prevention of peri-implant mucositis.

## INTRODUCTION

Peri-implant mucositis is characterized by mucosal inflammation around implants, with bleeding on probing (BOP) and/or suppuration on probing, with or without clinical signs of inflammation, such as erythema and edema, around a prosthetic component (Yu et al., 2016; Berglundh et al., 2018). Two meta-analyses investigated the prevalence of peri-implant mucositis. Atieh et al. (2013) estimated the prevalence of peri-implant mucositis at 30.7% and 63.4% considering the implant and the patient as statistical unit, respectively. In another meta-analysis (Derks & Tomasi, 2015), in which the individual was regarded as statistical unit, the prevalence of peri-implant mucositis was estimated at 43% (Lee et al., 2017).

Peri-implant mucositis may be a precursor stage of peri-implantitis (Heitz-Mayfield et al., 2011; Lang et al., 2011). Therefore, early diagnosis and intervention are of utmost clinical importance in the management of peri-implant infections (Ji et al., 2014). The primary objective of treatment of peri-implant diseases is to eliminate biofilm from the implant surface. Few clinical studies have assessed protocols for the treatment of peri-implant mucositis (Heitz-Mayfield & Lang 2004; Renvert et al., 2008; Maximo et al., 2009; Thone-Muhling et al., 2010; Heitz-Mayfield et al., 2011). Even though clinical parameters can be improved by mechanical debridement, sites with deeper pockets and BOP are still observed after the treatment (Heitz-Mayfield et al., 2011). Ancillary methods, including the use of mouthwash and application of local antiseptic gel, have not provided additional benefits when compared to conventional mechanical treatment (Ciancio et al., 1995; Strooker et al., 1998; Porras et al., 2002; Lindhe & Meyle, 2008; Thone-Muhling et al., 2010; Heitz-Mayfield et al., 2011).

The Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO) defined probiotics as “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” (Joint FAO/WHO Working Group, 2002). The literature has provided some compelling evidence concerning the use of beneficial bacterial strains as a therapeutic strategy against periodontal diseases (Martin-Cabezas et al., 2016; Gruner et al., 2016). Favorable results have been demonstrated in several studies that evaluated the effects of probiotics on gingivitis, a disease that is similar to peri-implant mucositis, (Krasse et al., 2006; Twetman et al., 2009; Iniesta et al., 2012; Hallstrom et al., 2013; Lee et al., 2015; Staab et al. 2009; Harini e Anegundi 2010; Nadkerny et al., 2015).

Regarding peri-implant diseases, especially peri-implant mucositis, there is a paucity of studies on the effects of probiotics (only six studies) and these studies revealed contradictory

results (Hallström et al. 2013; Flichy-Fernandez et al. 2015; Mongardini et al., 2017; Galofré et al 2018; Peña et al 2019; Alqahtani et al. 2019). Moreover, these studies investigated only the effects of microorganisms of the genus *Lactobacillus*. Other potential probiotics, such as those of the genus *Bifidobacterium*, should be assessed as well. Studies on the effects of probiotics on periodontal diseases have demonstrated the benefits of bacteria of the genus *Bifidobacterium* (Kuru et al., 2017; Invernici et al., 2018). It should be highlighted that the effects of probiotics on oral health depend on the strain used.

The aim of the present study was to assess the adjuvant effects of *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019<sup>TM</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* HN001<sup>TM</sup>, and *Lactobacillus paracasei* Lpc-37<sup>®</sup> on the treatment of peri-implant mucositis.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Ethical aspects***

Thirty-six individuals seen at the Sul de Minas Center for Oral Maxillofacial Surgery (Paraguaçu, Minas Gerais, Brazil) were included in the study. All patients received detailed information about the experiment (objectives, benefits, risks, and discomfort) and signed a free informed consent form. The procedures carried out in this study were approved by the Research Ethics Committee (protocol number 82840117.4.0000.5419) of the School of Dentistry of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo (FORP-USP, Ribeirao Preto, SP, Brazil). The study was registered at ClinicalTrials.gov (NCT04187222).

Sample size was estimated in order to provide an 80% power to detect a significant 30% difference in the number of sites with BOP ( $\delta$ ) between the assessed groups using a 95% confidence interval ( $\alpha = 0.05$ ) and a standard deviation ( $\sigma$ ) of 0.46 (Roos-Jansaker et al., 2017), considering  $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$ . The calculation was based on the following formula:  $n = \{[2(\sigma)^2]/(\delta)^2\} \cdot (Z\alpha + Z\beta)^2$ . Therefore, 36 patients were necessary for the study.

### ***Inclusion and exclusion criteria***

The inclusion criteria were as follows: (i) completely edentulous lower or upper arch rehabilitated with dental implants; (ii) functional prosthetic restoration for at least 12 months; (iii) healthy individuals, without any known systemic disorder; and (iv) nonsmokers.



The selected patients had at least one dental implant with mucositis. Implants with mucositis should present BOP, peri-implant mucosal edema and/or suppuration and radiographic absence of crestal bone at 3 mm or more away from the most coronal portion of the intraosseous part of the implant (Monje et al., 2017; Berglundh et al., 2018).

The exclusion criteria were: (i) individuals who had received any type of local or systemic decontamination of the oral cavity in the past three months; (ii) individuals with systemic disorders that could influence the treatment outcomes; (iii) smokers; (iv) individuals with malpositioned implants or implants placed in grafted areas; and (v) individuals whose radiographic evaluation showed peri-implant bone level at 3 mm or more away from the most coronal portion of the intraosseous part of the implant.

### ***Experimental design, allocation concealment, and treatment protocol***

The selected patients were identified by a numeric code and received specific oral hygiene instructions. Based on a random number table generated by a computer program, the research coordinator (M.R.M) assigned each patient to one of the following groups: control (mechanical debridement + placebo) or test (mechanical debridement + probiotic therapy). Mechanical debridement was performed on all dental implants of individuals from the control and test groups, who received either placebo capsules or capsules containing  $10^9$  colony-forming units (CFUs) of *B. lactis* HN019<sup>TM</sup> (HOWARU<sup>®</sup> Bifido, E. I. Dupont<sup>®</sup> de Nemours and Company, Wilmington, DE, USA), *L. rhamnosus* HN001<sup>TM</sup> (HOWARU<sup>®</sup> Rhamnosus, E. I. Dupont<sup>®</sup> de Nemours and Company), and *L. paracasei* Lpc-37<sup>®</sup> (FloraFit<sup>®</sup>, E. I. Dupont<sup>®</sup> de Nemours and Company) at baseline. All patients were instructed not to take any other probiotic product during the study period. A maxillofacial surgeon (S.I.S), who was blinded to the experimental groups, performed the mechanical procedures for the treatment of peri-implant mucositis. Other single examiner (P.H.F.S.), who was blinded to the experimental groups, assessed the peri-implant clinical parameters at baseline (pre-intervention period) and at 12 and 24 weeks.

The same pharmacy prepared identical probiotic and placebo lozenges. Identical plastic bottles containing the probiotic/placebos were sent to the study coordinator (M.R.M.), who wrote the number code of each patient on each bottle, according to the therapy they were assigned to. The coded bottles were given to the examiner (P.H.F.S.), who distributed them to the patients and did not have any access to information about the content of the lozenges. In addition, the patients were blinded to the content of the lozenges and treatment assignment during the study. The meaning of each numeric code was disclosed by the research

coordinator only after the statistical analysis.

The patients received 14 capsules (placebo or probiotic) per week. At the end of each week, the patients had to go to the Sul de Minas Center for Oral Maxillofacial Surgery. They had to return the empty capsules in order to receive new ones for the subsequent week. During their visit, the patients answered a questionnaire about their perception of any side effect during the treatment. Two research assistants conducted these procedures and were in charge of monitoring patient compliance with the treatment. The assistants were not examiners or operators in the present study.

### ***Examiner calibration***

The Kappa coefficient greater than or equal to 0.85 was used for examiner calibration. Ten patients with at least one dental implant presenting probing depth (PD)  $\geq 4$  mm at some site were selected. Each patient was examined twice using a plastic probe (University of North Carolina Colorvue probe, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) at a 48-hour interval between the first and second measurements. The kappa coefficient was 0.89 for BOP and 0.91 for PD.

### ***Clinical monitoring***

Modified sulcus bleeding index - mSBI (score 0: no bleeding when the probe is passed along the margin of the mucosa adjacent to the implant; score 1: isolated visible bleeding spots; score 2: blood forms a confluent red line on margin, and score 3: profuse bleeding) and modified plaque index - mPI (score 0: no plaque; score 1: plaque detected only by probing along the smooth marginal surface of the implant; score 2: the plaque can be seen with the naked eye; score 3: abundance of *materia alba*) were determined for each implant, according to Mombelli et al. (1987). PD was determined using a University of North Carolina Colorvue probe (Hu-Friedy). Three buccal and three lingual/palatal reference points were used for each implant for measurement of the mean PD (in mm). BOP was assessed dichotomously (Ainamo & Bay, 1975): presence of bleeding was considered positive when it occurred within 20 seconds after insertion of the probe for PD measurement. The height of keratinized mucosa (in mm) in the buccal region of each implant was also measured at baseline, using a University of North Carolina Colorvue probe (Hu-Friedy). The measurements were made from the mesiobuccal, buccal, and distobuccal regions of the free marginal peri-implant mucosa to the mucogingival junction.

### ***Treatment of peri-implant mucositis and maintenance care***

Before the intervention, all patients received oral hygiene instructions. Mechanical debridement was performed on implants with peri-implant mucositis using Teflon-coated scalers (Implacare™ II Scalers, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), rubber cup and polishing paste. In the test group, the treatment session was concluded with the topical application of carboxymethyl cellulose gel containing  $10^9$  CFUs of *B. lactis* HN019™, *L. rhamnosus* HN001™, and *L. paracasei* Lpc-37®, around the implants. The gel was applied to the submucosal and supramucosal areas. The patients were given capsules containing  $10^9$  CFUs of the three probiotic microorganisms described earlier and were instructed to dissolve their contents in 20 mL of water, to rinse it for 30 to 60 seconds, and to swallow it, doing that twice a day for 12 weeks. The control group was treated with placebo gel and lozenges. Mechanical debridement was repeated at 12 postoperative weeks, and the gel containing the probiotic or the placebo was also applied to the test and control groups, respectively.

### ***Outcome variables***

The difference in BOP obtained at 12 and 24 postoperative weeks was used as primary variable. The other clinical parameters (mSBI, mPI, and PD), as well as the number of patients with less than 10% of BOP and complete resolution of mucositis (absence of BOP) at 12 and 24 weeks (considering only implants with mucositis diagnosed at baseline) and the number of new cases of peri-implant mucositis during the study period (considering only implants without mucositis at baseline) were used as secondary variables.

### ***Statistical analysis***

The analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, Version 6.0. CA, USA) and IBM SPSS Statistics (IBM Corporation, Version 23. Armonk, NY, USA). The significance level was set at 5% ( $p < 0.05$ ). The Shapiro-Wilk test was used to check the normal distribution of the data. Each outcome was computed per participant and then averaged across patients in both groups.

Within-group differences (over time) in PD, BOP, mPI, and mSBI were assessed by Friedman's test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons. Between-group differences (in a given experimental period) in PD, BOP, mPI, and mSBI were assessed by the Mann-Whitney test. The between-group differences in the number of patients with less than 10% of BOP or absence of BOP and the number of new cases of peri-implant mucositis were assessed by Fisher's exact test.

## RESULTS

The flowchart of this study is shown in Figure 1. The study started in July 2018 and finished in November 2019. The demographic characteristics of the experimental groups are shown in Table 1. All implants consisted of Neoporous surface and external hexagon system attached to mini abutments (Neodent Implantes Osseointegráveis, Curitiba, Paraná, Brazil). No adverse effect was reported during and/or after the use of the capsules containing probiotic or placebo.

### *Clinical monitoring*

mPI % and mSBI % (scores 0, 1, 2, and 3) for the test and control groups is displayed in Figures 2 and 3. No significant difference was observed between the test and control groups for mPI. mSBI % (score 0) was higher in the test group than in the control group at 24 weeks ( $p < 0.05$ ). Also, mSBI % – score 1 (24 weeks) and score 2 (12 weeks) were higher in the control group than in the test group ( $p < 0.05$ ).

Table 2 shows PD and BOP, as well as the changes in these parameters (at 12 and 24 weeks), compared to baseline measurements (delta values -  $\Delta$ ) for the test and control groups. No significant differences in PD and  $\Delta$  were noted between the groups. At 12 and 24 weeks, BOP was lower in the test group than in the control group ( $p < 0.05$ ).

### *Clinical significance of the treatments – resolution of inflammation*

Figure 4 shows the number of patients in the test and control groups with less than 10% of BOP at 12 and 24 weeks regarding implants with mucositis. At 24 weeks, there was significant difference between the groups. Regarding the complete resolution of peri-implant inflammation (absence of BOP) in implants with mucositis (diagnosed at baseline), 33.3 %e 16,6 %of the patients from the test and control groups, respectively, did not show any sign of BOP at 24 weeks ( $p < 0.05$ ).

### *Follow-up of new cases of peri-implant mucositis*

Those implants without BOP at baseline were reassessed at 12 and 24 weeks for the presence or absence of peri-implant mucositis. At 12 weeks, considering only those implants and adopting the inclusion criteria, a larger number of patients diagnosed with mucositis were observed in the control group when compared to the test group ( $p < 0.05$ ; Figure 5).

## DISCUSSION

This double-blind, randomized, controlled trial clinically assessed the effects of the adjuvant use of multispecies probiotics on the treatment of peri-implant mucositis. Results show that probiotic therapy provided additional benefits at 12 and 24 weeks when compared to conventional mechanical debridement.

In the present study, the test group had significantly lower BOP at 12 and 24 weeks than the control group. The decrease in BOP in the test group at 12 and 24 weeks, when compared to baseline, was approximately 39% and 46%, respectively. Immunomodulatory and antimicrobial potential of probiotics could explain these results. Previous studies demonstrated a reduction in proinflammatory cytokines (IL-6 and IL-8) and in the amount of *Porphyromonas gingivalis* in the peri-implant sulcus of implants with mucositis treated with probiotics (Flichy-Fernández et al., 2015; Galofré et al., 2018).

To date, only three (Alqahtani et al., 2019; Galofré et al., 2018; Flichy-Fernandez et al., 2015) out of six studies (Alqahtani et al., 2019; Peña et al., 2019; Galofré et al., 2018; Mongardini et al., 2017; Hallstrom et al., 2016; Flichy-Fernandez et al., 2015) have shown an additional positive effect of probiotics on the treatment of peri-implant mucositis. Several factors could explain the contradictory results. An important aspect is the bacterial strain used. The results obtained with the use of probiotic microorganisms should not be generalized, since they depend on the genus and on the bacterial strain used, among other factors. Additional benefits were observed in the treatment of peri-implant mucositis with the adjuvant use of *Lactobacillus reuteri* (Alqahtani et al., 2019; Galofré et al., 2018; Flichy-Fernandez et al., 2015). However, the adjuvant use of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* (Mongardini et al., 2017) was ineffective.

So far, studies on the effects of probiotics on peri-implant mucositis have used only microorganisms of the genus *Lactobacillus*. The present study is the first one to demonstrate the potential of the probiotic bacterium of the genus *Bifidobacterium* for the treatment of peri-implant mucositis. In this study, significant differences in BOP were still observed in the test and control groups at six months. Alqahtani et al. (2019) used only microorganisms of the genus *Lactobacillus* in the treatment of peri-implant mucositis. The results showed additional benefits of probiotic therapy when compared to mechanical debridement (reduction of BOP) only at three months. These benefits were no longer present at six months. Previous studies conducted by our research group have already shown that *B. lactis* HN019 can modulate the

oral microbiota and host immune response, contributing to the prevention and treatment of periodontal diseases (Oliveira et al., 2017; Ricoldi et al., 2017; Invernici et al., 2018).

The additional benefits of probiotic therapy persisted in the present study for 90 days after its discontinuation. This could be due to the fact that some probiotic strains incorporate into the oral biofilm, even if that is temporary. In individuals with periodontitis treated with *B. lactis* HN019, copies of the genome of this microorganism were found in the oral biofilm 60 days after the therapy had been discontinued (Invernici et al., 2018). Meurman et al. (1994), Iniesta et al. (2012), and Tekce et al. (2015) also noted the persistence of bacteria of the genus *Lactobacillus* in the oral cavity at 2, 8, and 9 weeks, respectively, after discontinuation of probiotic therapy.

In the present study, both groups showed similar mPI and quite different BOP values. Probiotic therapy, even when administered for a short time period, seems to provide more resilience of the oral microbiome to risk factors for oral tissue inflammation, such as dental plaque buildup (Rosier et al., 2017). The results of the present study suggest a possible effect of probiotic therapy on the delayed onset of peri-implant inflammation. Lee et al. (2015) showed that *L. brevis* lozenges significantly delayed the onset of gingival inflammation in healthy individuals who had abstained from oral hygiene. Kuru et al. (2017) demonstrated that patients with experimental gingivitis treated with *B. lactis* DN-173010 for 30 days before the onset of gingivitis had lower IL-1 $\beta$  levels in the gingival crevicular fluid when compared to those who were not treated prophylactically with this probiotic strain.

In the present study, those implants without BOP at baseline were reassessed at 12 and 24 weeks for the presence or absence of peri-implant mucositis. At 12 weeks, a larger number of patients with mucositis were observed in the control group when compared to the test group. Implants without mucositis treated with probiotics also had better clinical parameters than those treated with placebo in the study conducted by Flichy-Fernández et al. (2015). Those authors concluded that the administration of probiotics could be a good alternative for the prevention of peri-implant mucositis.

In the present study, 33.3% of the patients from the test group did not show any sign of BOP at 24 weeks. In the control group, this rate was 16.6%. These findings are in line with those of previous studies, which show that approximately 30% of the implants with peri-implant mucositis were totally free of BOP at six weeks (Mongardini et al., 2017), three months (Heitz-Mayfield et al., 2011), and 135 days (Peña et al., 2019) after mechanical debridement. The complete resolution of peri-implant mucositis was defined as the absence of BOP around a dental implant after treatment of mucositis (Sanz & Chapple, 2012). Even though this

finding was presented by preclinical trials (Ericsson et al., 1995) and in human studies (Pontoriero et al., 1994; Salvi, Aglietta, Eick, Sculean, & Ramseier, 2012), thus defining peri-implant mucositis as a reversible lesion, clinical trials have demonstrated it is not an easy task to have this outcome in the long run (Schwarz et al., 2015).

In this study, several factors that could interfere with the outcomes were controlled. The capsules containing probiotics were monitored during the study to maintain their viability and the amount of CFUs. The modes of administration of the probiotics (mouth rinses and topical applications) were planned to maximize the contact of microorganisms with peri-implant tissues. Prior to the probiotic therapy, careful mechanical debridement was carried out in the test and control groups for maximum biofilm removal. There was no significant difference in demographic variables at baseline between the test and control groups, especially for height of keratinized mucosa (means of 2.09 and 2.57 for the test and control groups, respectively).

The present study is the first one to demonstrate the potential of a cocktail of microorganisms, combining bacteria of the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* for the treatment of peri-implant mucositis. A limitation of the present study was the short assessment period. The follow-up of the patients for a longer time would be important to check whether the additional effects of probiotic therapy on mechanical debridement are maintained over time. Microbiological and immunological analyses would also be important to elucidate the mechanisms of action of the probiotic therapy.

## CONCLUSION

The use of *B. lactis* HN019<sup>TM</sup>, *L. rhamnosus* HN001<sup>TM</sup>, and *L. paracasei* Lpc-37<sup>®</sup> as an adjunct to mechanical debridement promote additional clinical benefits in the treatment of peri-implant mucositis.

## REFERENCES

1. Ainamo J., Bay I. (1975). Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 25(4), 229-35.
2. Alqahtani F., Alqahtani M., Shafqat S.S., Akram Z., Al-Kheraif A.A., Javed F. (2019). Efficacy of mechanical debridement with adjunctive probiotic therapy in the treatment of peri-implant mucositis in cigarette-smokers and never-smokers. *Clin Implant Dent Relat Res.*, 21(4), 734-740. DOI:10.1111/cid.12795

3. Atieh M.A., Alsabeeha N.H., Faggion Jr. C.M., Duncan W.J. (2013). The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.*, 84(11), 1586-98. DOI:10.1902/jop.2012.120592
4. Berglundh T., Armitage G., Araujo M.G., Avila-Ortiz G., Blanco J., Camargo P.M., et al. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.*, 89 Suppl 1:S313-S318. DOI:10.1002/JPER.17-0739
5. Ciancio S.G., Lauciello F., Shibly O., Vitello M., Mather M. (1995). The effect of an antiseptic mouthrinse on implant maintenance: plaque and peri-implant gingival tissues. *J Periodontol.*, 66(11), 962-5. DOI:10.1902/jop.1995.66.11.962
6. Ericsson I., Persson L.G., Berglundh T., Marinello C.P., Lindhe J, Klinge B. (1995). Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. *J. Clin. Periodontol.*, 22(3), 255-61. DOI:10.1111/j.1600-051x.1995.tb00143.x
7. Flichy-Fernandez A.J., Ata-Ali J., Alegre-Domingo T., Candel-Mart E., Ata-Ali F., Palacio J.R., Penarrocha-Diago M. (2015). The effect of orally administered probiotic *Lactobacillus reuteri*-containing tablets in peri-implant mucositis: a double-blind randomized controlled trial. *J. Periodontal. Res.* 50(6), 775-85. DOI:10.1111/jre.12264
8. Galofré M., Palao D., Vicario M., Nart J., Violant D. (2018). Clinical and microbiological evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* in the treatment of mucositis and peri-implantitis: A triple-blind randomized clinical trial. *J. Periodontal Res.*, 53(3), 378-390. DOI:10.1111/jre.12523
9. Gruner D., Paris S., Schwendicke F. (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent.*, 48, 16-25. DOI:10.1016/j.jdent.2016.03.002
10. Hallstrom H., Lindgren S., Yucel-Lindberg T., Dahlen G., Renvert S., Twetman S. (2013). Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis. *Acta Odontol. Scand.*, 71(3-4), 828-33. DOI:10.3109/00016357.2012.734406
11. Harini P.M., Anegundi R.T. (2010). Efficacy of a probiotic and chlorhexidine mouth rinses: a short- term clinical study. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.*, 28(3), 179-82. DOI:10.4103/0970-4388.73799
12. Heitz-Mayfield L.J., Lang N.P. (2004). Antimicrobial treatment of peri-implant diseases. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 19 Suppl:128-39.
13. Heitz-Mayfield L.J., Salvi G.E., Botticelli D., Mombelli A., Faddy M., Lang N.P. Implant Complication Research Group (2011). Anti-infective treatment of peri-implant mucositis: a randomised controlled clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.*, 22(3), 237-41. DOI:10.1111/j.1600-0501.2010.02078.x
14. Iniesta M., Herrera D., Montero E., Zurbriggen M., Matos A.R., Marin M.J., et al. (2012). Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J. J. Clin. Periodontol.*, 39(8), 736-44. DOI:10.1111/j.1600-051X.2012.01914.x
15. Invernici M.M., Salvador S.L., Silva P.H.F., Soares M.S.M., Casarin R., Palioto D.B., Souza S.L.S., Taba M. Jr., Novaes A.B. Jr., Furlaneto F.A.C., Messoria M.R. (2018). Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J. Clin. Periodontol.*, 45(10), 1198-1210. DOI:10.1111/jcpe.12995



16. Ji Y-J., Tang Z-H., Wang R., Cao J., Cao C-F., Jin L-J. (2014). Effect of glycine powder air-polishing as an adjunct in the treatment of peri-implant mucositis: a pilot clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.*, 25(6), 683-9. DOI:10.1111/clr.12123
17. Krasse P., Carlsson B., Dahl C., Paulsson A., Nilsson A., Sinkiewicz G. (2006). Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed. Dent. J.*, 30(2), 55-60.
18. Kuru B.E., Laleman I., Yalnizoglu T., Kuru L., Teughels W. (2017). The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J. Periodontol.*, 88(11), 1115-1123. DOI:10.1902/jop.2017.170213
19. Lang N.P., Berglundh T. (2011). Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now? Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J. Clin. Periodontol.*, 38 Suppl 11:178-81. DOI:10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x
20. Lang N.P., Bosshardt D.D., Lulic M. (2011). Do mucositis lesions around implants differ from gingivitis lesions around teeth? *J. Clin. Periodontol.*, 38 Suppl 11:182-7. DOI:10.1111/j.1600-051X.2010.01667.x
21. Lee C-T., Huang Y-W., Zhu L., Weltman R. (2017). Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J. Dent.*, 62, 1-12. DOI:10.1016/j.jdent.2017.04.011
22. Lee J.K., Kim S.J., Ko S.H., Ouwehand A.C., Ma D.S. (2015). Modulation of the host response by probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 in experimental gingivitis. *Oral Dis.*, 21(6), 705-12. DOI:10.1111/odi.12332
23. Lindhe J., Meyle J. Group D of European Workshop on Periodontology (2008). Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J. Clin. Periodontol.*, 35(8 Suppl), 282-5. DOI:10.1111/j.1600-051X.2008.01283.x
24. Maximo M.B., de Mendonca A.C., Renata S.V., Figueiredo L.C., Feres M., Duarte P.M. (2009). Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clin. Oral Implants Res.*, 20(1), 99-108. DOI:10.1111/j.1600-0501.2008.01618.x
25. Meurman J.H., Antila H., Salminen S. (1994) Recovery of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium. *Microb Ecol Health Dis.*, 7(6), 295-298.
26. Mombelli A., Van Oosten M.A.C., Schiirch E., Lang N.P. (1987). The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol. Immunol.* 2(4):145-51. DOI:10.1111/j.1399-302x.1987.tb00298.x
27. Mongardini C., Pilloni A., Farina R., Di Tanna G., Zeza B. (2017). Adjunctive efficacy of probiotics in the treatment of experimental peri-implant mucositis with mechanical and photodynamic therapy: a randomized, cross-over clinical trial. *J. Clin. Periodontol.*, 44(4), 410-417. DOI:10.1111/jcpe.12689
28. Monje A., Wang H.L., Nart J. (2017). Association of Preventive Maintenance Therapy Compliance and Peri-Implant Diseases: A Cross-Sectional Study. *J. Periodontol.*, 88(10), 1030-1041. DOI:10.1902/jop.2017.170135
29. Nadkerny P.V., Ravishankar P.L., Pramod V., Agarwal L.A., Bhandari S. (2015). A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study. *J. Indian Soc. Periodontol.*, 19(6), 633-9. DOI:10.4103/0972-124X.168491

30. Oliveira L.F.F., Salvador S.L., Silva P.H.F., Furlaneto F.A.C., Figueiredo L., Casarin R., Ervolino E., Palioto D.B., Souza S.L.S., Taba Jr. M., Novaes Jr. A.B., Messora M.R. (2017). Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol.*, 88(2), 197-208. DOI:10.1902/jop.2016.160217
31. Peña M., Barallat L., Vilarrasa J., Vicario M., Violant D., Nart J. (2019). Evaluation of the effect of probiotics in the treatment of peri-implant mucositis: a triple-blind randomized clinical trial. *Clin. Oral Investig.*, 23(4), 1673-1683. DOI:10.1007/s00784-018-2578-8
32. Pontoriero R., Tonelli M.P., Carnevale G., Mombelli A., Nyman S.R., Lang N.P. (1994). Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin. Oral Implants Res.*, 5(4), 254-9. DOI:10.1034/j.1600-0501.1994.050409.x
33. Renvert S., Roos-Jansaker A.M., Claffey N. (2008) Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J. Clin. Periodontol.*, 35(8 Suppl):305-15. DOI:10.1111/j.1600-051X.2008.01276.x
34. Ricoldi M.S.T., Furlaneto F.A.C., Oliveira L.F.F., Teixeira G.C., Pischiotini J.P., Moreira A.L.G., Ervolino E., de Oliveira M.N., Bogsan C.S.B., Salvador S.L., Messora M.R. (2017). Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One.* 29, 12(6): e0179946. DOI:10.1371/journal.pone.0179946
35. Roos-Jansaker A.M., Almhojd U.S., Jansson H. (2017). Treatment of peri-implantitis: clinical outcome of chloramine as an adjunctive to non-surgical therapy, a randomized clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* 28(1), 43-48. DOI:10.1111/clr.12612
36. Rosier B.T., Marsh P.D., Mira A. (2018). Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J. Dent. Res.*, 97(4), 371-380. DOI:10.1177/0022034517742139
37. Salvi G.E., Aglietta M., Eick S., Sculean A., Ramseier C.A. (2012). Reversibility of experimental peri-implant mucositis compared with experimental gingivitis in humans. *Clin. Oral Implants Res.*, 23(2), 182-190. DOI:10.1111/j.1600-0501.2011.02220.x
38. Schwarz F., Becker K., Sager M. (2015). Efficacy of professionally administered plaque removal with or without adjunctive measures for the treatment of peri-implant mucositis. A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.*, 42 Suppl 16:S202-13. DOI:10.1111/jcpe.12349
39. Staab B., Eick S., Knöfler G., Jentsch H. (2009). The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J. Clin. Periodontol.* 36(10), 850-6. DOI:10.1111/j.1600-051X.2009.01459.x
40. Strooker H., Rohn S., Van Winkelhoff A.J. (1998). Clinical and microbiologic effects of chemical versus mechanical cleansing in professional supportive implant therapy. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 13(6), 845-50.
41. Tekce M., Ince G., Gursoy H., Dirikan Ipci S., Cakar G., Kadir T., Yılmaz S. (2015). Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J. Clin. Periodontol.* 42(4), 363-72. DOI:10.1111/jcpe.12387
42. Thone-Muhling M., Swierkot K., Nonnenmacher C., Mutters R., Flores-de-Jacoby L., Mengel, R. (2010). Comparison of two full-mouth approaches in the treatment of peri-implant mucositis: a pilot study. *Clin. Oral Implants Res.*, 21(5), 504-12. DOI:10.1111/j.1600-0501.2009.01861.x
43. Twetman S., Derawi B., Keller M., Ekstrand K., Yucel–Lindberg T., Stecksén–Blicks C. (2009). Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand.*, 67(1), 19-24. DOI:10.1080/00016350802516170

44. Yu X.L., Chan Y., Zhuang L.F., Lai H.C., Lang N.P., Lacap-Bugler D.C., et al. (2016). Distributions of Synergistetes in clinically-healthy and diseased periodontal and peri-implant niches. *Microb. Pathog.*, 94, 90-103. DOI:10.1016/j.micpath.2015.11.029

**Table 1** – Demographic characteristics of the sample at baseline according to experimental group.

| Variable                                                                   | Experimental groups |           | Between-group comparisons |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------|---------------------------|
|                                                                            | Test                | Control   |                           |
|                                                                            | n= 18               | n= 18     |                           |
| <b>Individuals</b>                                                         |                     |           |                           |
| Age (mean ±SD)                                                             | 63.39±12.06         | 62.3±9.50 | NS*                       |
| Sex (f/m)                                                                  | 11/07               | 8/10      | NS**                      |
| <b>Implants</b>                                                            |                     |           |                           |
| Number of implants (mean number ±SD)                                       | 4.38±0.77           | 4.36±0.83 | NS*                       |
| Number of implants with mucositis (mean number ±SD)                        | 2.44±1.54           | 2.52±1.50 | NS*                       |
| <b>Oral hygiene:</b> number of oral hygiene episodes/day (mean number ±SD) | 2.77±0.42           | 2.5±1.02  | NS*                       |
| <b>Completely edentulous dental arch rehabilitated with implants</b>       |                     |           |                           |
| Upper (total number)                                                       | 13                  | 12        | NS**                      |
| Lower (total number)                                                       | 5                   | 6         |                           |
| <b>Denture</b>                                                             |                     |           |                           |
| Fixed (Brånemark protocol)                                                 | 18                  | 18        |                           |
| <b>HKM</b> (mean ±SD)                                                      | 2.09±0.40           | 2.57±0.35 | NS*                       |

SD = standard deviation; f = female; m = male; HKM = height of keratinized mucosa; NS\* = Nonsignificant (Student's t test,  $p > 0.05$ ); NS\*\* = Nonsignificant (Fisher's exact test,  $p > 0.05$ ).

**Table 2** – Means and standard deviation of PD and BOP, and changes in these parameters at 12 and 24 weeks when compared to baseline ( $\Delta$  12-0 /  $\Delta$  24-0) in the test and control groups.

| Variable       | Period   | Experimental groups |                                                    |                    |                                                    | Between-group comparison |        |        |
|----------------|----------|---------------------|----------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|--------|--------|
|                |          | Test                |                                                    | Control            |                                                    | Mann-Whitney test        |        |        |
|                |          | n=18                |                                                    | n=18               |                                                    | p value                  |        |        |
|                |          | Mean $\pm$ SD       | Delta $\pm$ SD<br>$\Delta$ 12-0 /<br>$\Delta$ 24-0 | Mean $\pm$ SD      | Delta $\pm$ SD<br>$\Delta$ 12-0 /<br>$\Delta$ 24-0 | Mean differences         | Mean   | Delta  |
| <b>PD (mm)</b> | Baseline | 2.19 $\pm$ 0.93     |                                                    | 1.9 $\pm$ 0.48     |                                                    | 0.29                     | NS     |        |
|                | 12 weeks | 1.91 $\pm$ 1.03     | -0.28 $\pm$ 0.34                                   | 1.55 $\pm$ 0.38*   | -0.35 $\pm$ 0.31                                   | 0.35                     | NS     | NS     |
|                | 24 weeks | 1.49 $\pm$ 0.40*    | -0.7 $\pm$ 0.8                                     | 1.62 $\pm$ 0.55*   | -0.28 $\pm$ 0.45                                   | 0.13                     | NS     | NS     |
| <b>BOP (%)</b> | Baseline | 52.42 $\pm$ 6.94    |                                                    | 53.01 $\pm$ 10.74  |                                                    | 0.59                     | NS     |        |
|                | 12 weeks | 13.19 $\pm$ 12.08*  | -39.23 $\pm$ 12.09                                 | 25.17 $\pm$ 19.40* | -27.84 $\pm$ 19.67                                 | 11.98                    | 0.0223 | 0.0733 |
|                | 24 weeks | 5.47 $\pm$ 6.52*    | -46.95 $\pm$ 6.71                                  | 21.08 $\pm$ 16.59* | -31.93 $\pm$ 17.98                                 | 15.61                    | 0.0003 | 0.0028 |

SD = standard deviation; PD = probing depth; BOP = bleeding on probing; NS = nonsignificant. \*Significant difference when compared to baseline (Friedman's test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons,  $p < 0.05$ ).

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Flowchart of the clinical trial.

**Figure 2.** mPI % (scores 0, 1, 2, and 3) and standard deviations for the test and control groups at baseline and at 12 and 24 weeks. \* and <sup>x</sup> indicate significant differences in the within-group comparisons. Identical symbols above the columns indicate significant differences in the comparisons between experimental periods within the same mPI score (Friedman's test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons,  $p < 0.05$ ).

**Figure 3.** mSBI % (scores 0, 1, 2, and 3) and standard deviations in the test and control groups at baseline and at 12 and 24 weeks. #, + and <sup>x</sup> indicate significant differences in the within-group comparisons. Identical symbols above the columns indicate significant differences in the comparisons between experimental periods within the same mSBI score (Friedman's test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons,  $p < 0.05$ ). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences in the between-group comparisons. Identical symbols above the columns indicate significant differences between the groups considering the same mSBI score and same period of analysis (Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ).

**Figure 4.** Number of patients with less than 10% of BOP and with more than 10% of BOP in the test and control groups 12 weeks (A) and 24 weeks (B) after the treatment of implants with mucositis (12 weeks - Fisher's exact test,  $p = 0.6267$ ; 24 weeks- Fisher's exact test,  $p = 0.005$ ).

**Figure 5.** Number of patients in the test and control groups with and without peri-implant mucositis at 12 and 24 weeks, including only those implants without BOP at baseline. \*Statistically significant difference when compared to the control group in the same column (Fisher's exact test,  $p = 0.0489$ ).

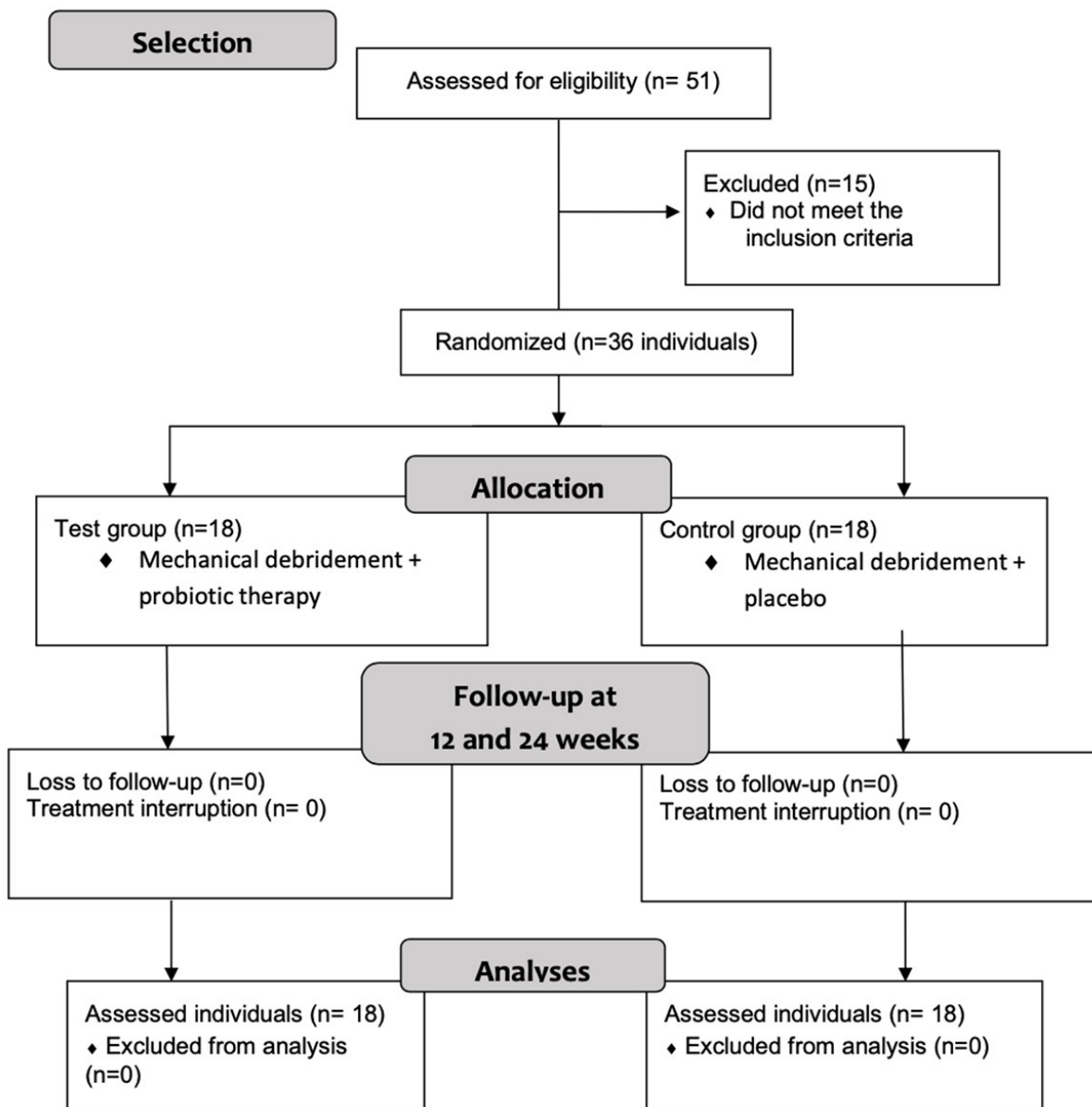


Figure 1

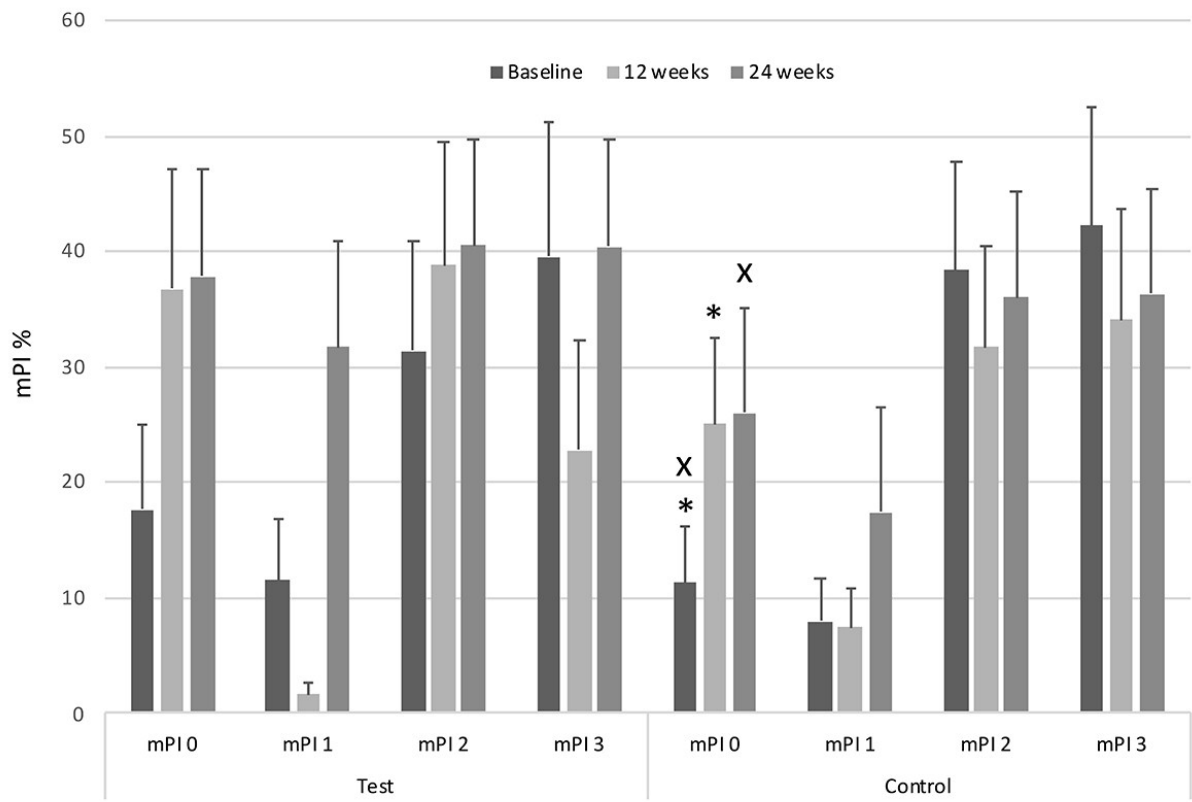


Figure 2

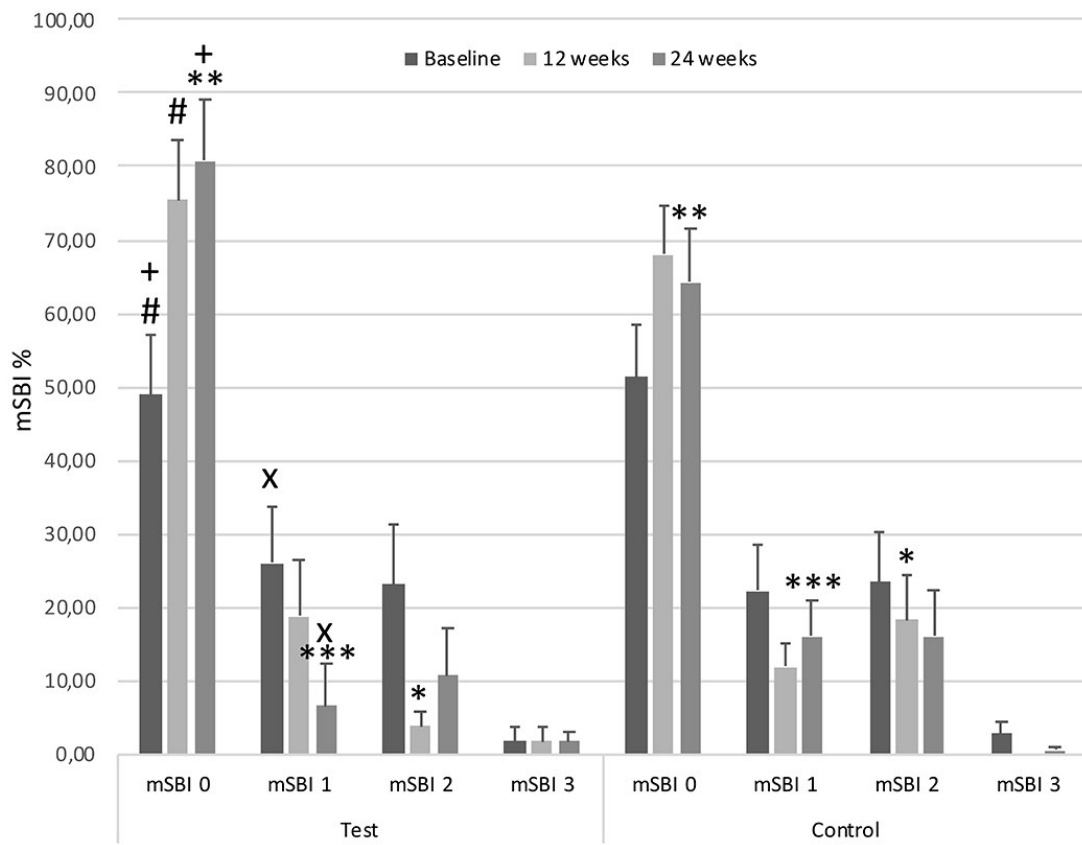


Figure 3



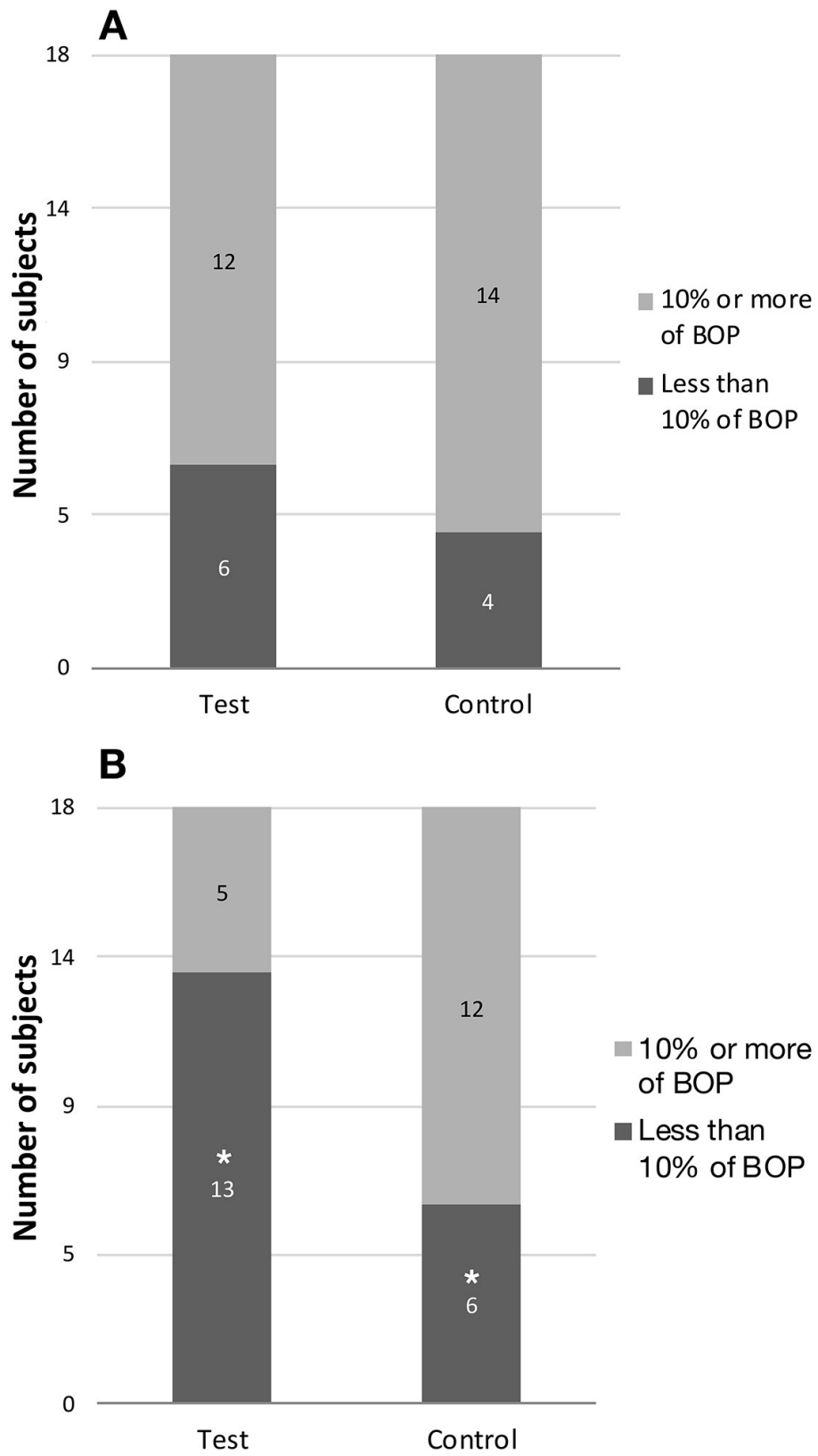
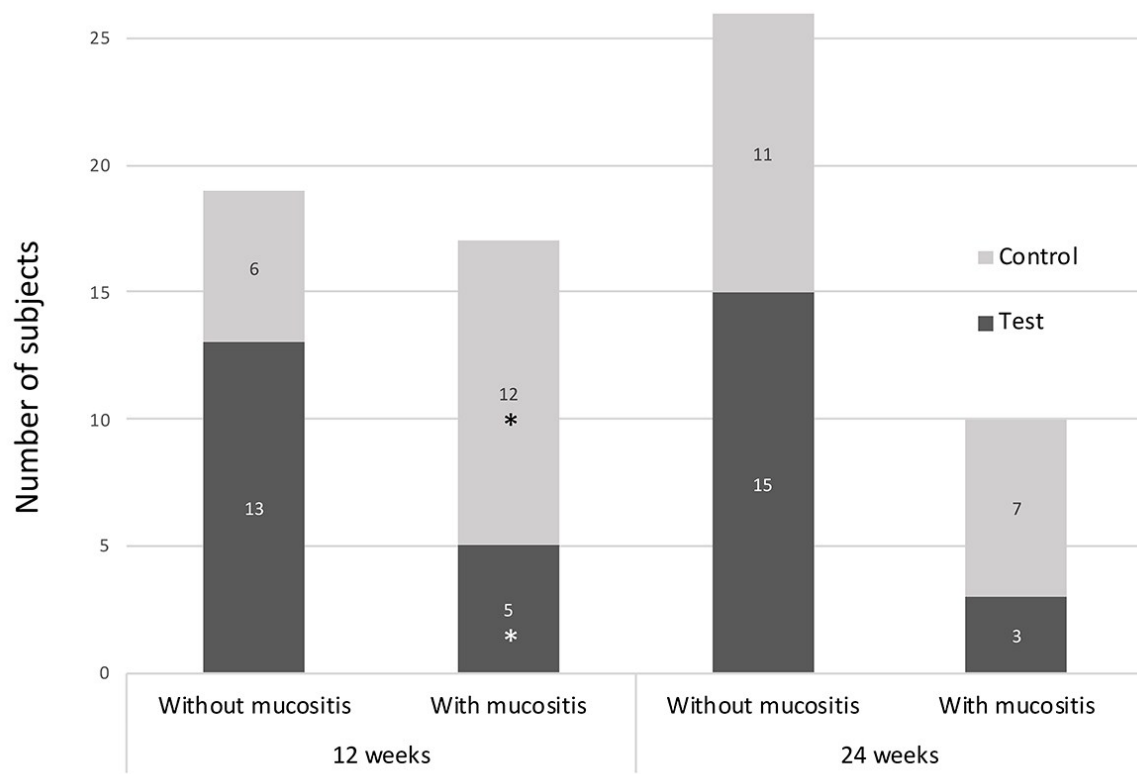


Figure 4

**Figure 5**

---

**ANEXO 4 – Artigo Científico Submetido para Publicação no Periódico Journal of Clinical Periodontal Research**

**Immunological effects of predatory bacteria on experimental periodontitis**

Pedro H. F. Silva, DDS, MS<sup>1</sup>; Luiz F. F. Oliveira, DDS, MS<sup>1</sup> Renata S. Cardoso, DDS, MS<sup>1</sup>; Sandro I. Santana, DDS, MS<sup>1</sup>; Renato Casarin DDS, PhD<sup>2</sup>; Edilson Ervolino DDS, PhD<sup>3</sup>; Sérgio L. Salvador, Pharm.D, PhD<sup>4</sup>; Daniela B. Palioto, DDS, PhD<sup>1</sup>; Flávia A. C. Furlaneto, DDS, PhD<sup>1</sup>; Michel R. Messoro, DDS, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto / SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Prosthodontics and Periodontics, School of Dentistry, Campinas State University, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Basic Sciences, Division of Histology, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University, São Paulo, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto / SP, Brazil.

**Corresponding author:**

Michel R. Messoro

Av. Café s/n Ribeirão Preto-SP 14020-150

Telephone number: +55 16 3315 4135 Fax number: +55 16 3315 4788

Email address: m.messoro@forp.usp.br

**Total number of tables/figures: 5**

**Funding information:** FAPESP (São Paulo Research Foundation) - 2013/25022-7 and 2015/11835-1

**Keywords:** bacteriotherapy, periodontitis, rats, immunology.

## ABSTRACT

**Background:** *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that predatory bacteria have an antimicrobial potential and can decrease alveolar bone loss caused by experimental periodontitis. However, the *in vivo* effects of these bacteria on the immune response of periodontal tissues are unknown. This study evaluated the immunological effects of *B. bacteriovorus* HD100 on experimental periodontitis (EP) in rats.

**Methods:** Thirty-two rats were divided into groups: control, C-HD100 (*B. bacteriovorus*), EP (experimental periodontitis), and EP-HD100. At day 0, animals from the EP and EP-HD100 groups received cotton ligatures around mandibular first molars (MFMs). In the C-HD100 and EP-HD100 groups, 1 mL of suspensions containing *B. bacteriovorus* HD100 was topically administered in the subgingival region of MFMs at days 0, 3, and 7. Animals were euthanized at day 14. Gingival tissue and hemimandibles were collected. Data were statistically analyzed.

**Results:** The EP-HD100 group revealed higher levels of MCP-1, RANTES, IL-10, and TGF- $\beta$  and lower levels of TNF- $\alpha$  than the EP group ( $p < 0.05$ ). There were no differences in IL-1 $\beta$ , IL-6, and M-CSF between the EP and EP-HD100 groups. As for BD, the EP-HD100 group showed a larger immunolabeling pattern for BD-1, BD-2, and BD-3 when compared to the EP group ( $p < 0.05$ ). The C-HD100 group exhibited a larger immunolabeling pattern for BD-1 when compared to the control group. No significant differences were observed in immunolabeling for TLR-2, TLR-4, CD4, CD8, and CD57 between the EP and EP-HD100 groups.

**Conclusion:** The topical use of *B. bacteriovorus* HD100 modulated the expression of innate and adaptive immune response markers in rats with experimental periodontitis.

## INTRODUCTION

The oral microbiota is the most well-established association between microorganisms and host. There are correlations between the qualitative components of the oral microbiota and health/disease status.<sup>1</sup> Recent studies have assessed the host-bacterium interaction and have revealed that not only do commensal bacteria protect the host against pathogenic bacteria by occupying the same niches, but they can also promote the proper development of tissue structures and functions. These findings indicate that polymicrobial communities associated with the host, such as those found in the oral cavity, have evolved with the host and have become an integral part of the same organism.<sup>2,3</sup>

Periodontitis is a chronic immunoinflammatory polymicrobial disease, and it is the most common cause of tooth losses worldwide. This disease seems to have multiple etiologies, which include microbial and immunological disorders.<sup>4,5,6</sup> Regarding immunological disorders, it is widely known that the host's innate immune defense system is highly active in healthy tissues. An imbalance or rupture in the expression of inflammatory mediators significantly contributes to the destruction of tooth-supporting tissues.<sup>7,8,9,10</sup> As far as microbial diseases are concerned, periodontitis appears to actually be associated with the oral microbiota. Therefore, how stable the microbial population encountered on biofilm is could be a predictive factor for periodontal health, as changes in this population are associated with changes in the clinical status of the host's tissues.<sup>11</sup>

A small, highly mobile and flagellated gram-negative bacterium was discovered in 1962 during attempts to isolate bacteriophages from pathogenic bacteria infecting plants.<sup>12</sup> They were called *Bdellovibrio bacteriovorus*, a name that describes the morphology and probable living habits of these bacteria. These microorganisms are curved and adhere to their preys, absorbing their contents.<sup>13</sup> These species belong to a group of microorganisms known as Bdellovibrio-and-like organisms (BALOs), which can destroy other gram-negative bacteria. *B. bacteriovorus* HD100<sup>14,15</sup> is the most widely investigated strain of this group.

A proof of concept study showed that BALOs have therapeutic potential for the treatment of periodontitis, preventing alveolar bone loss and connective tissue attachment loss in rats. The same study demonstrated that the use of the predatory bacteria causes changes in the ligature-associated microbiota in rats with experimental periodontitis (EP).<sup>16</sup> There are no studies on the effect of *B. bacteriovorus* on periodontal immunological profile, or on the expression of innate and adaptive immune markers in the host (beta defensins (BDs), TOLL-like receptors

(TLRs) and cluster of differentiation (CD)). This study evaluated the immunological effects of *B. bacteriovorus* HD100 on rats with EP.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics Committee**

This study was conducted after review and approval by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo – FORP/USP (process no. 13.1.136.53.5). The authors followed the ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) guidelines.<sup>17</sup>

This study is a secondary part of an immunological evaluation performed by Silva et al. (2019).<sup>16</sup> The same samples from the study by Silva et al. (2019)<sup>16</sup> were used for the immunological assessments in the present study. Silva et al. (2019)<sup>16</sup> used 32 adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), weighing 230 to 250 g (Central Animal Facility, FORP/USP). The rats were kept in a 12-hour light/dark cycle at temperatures between 22°C and 24°C. They were housed in individual cages, were fed a selected solid diet, and received water *ad libitum*. Rats were allocated to the following groups (n = 8): control group (rats without EP and not treated with *B. bacteriovorus* HD100), C-HD100 (rats without EP and treated with *B. bacteriovorus* HD100), EP (rats with EP and not treated with *B. bacteriovorus* HD100), and EP-HD100 (rats with EP and treated with *B. bacteriovorus* HD100). All analyses were performed by calibrated and blinded examiners. Sham procedures (irrigation with carboxymethyl cellulose alone) were performed in the control and EP groups.<sup>16,18</sup>

### **Induction of EP**

In the EP-HD100 and EP groups, the animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of xylazine\* (10 mg/kg body weight) and ketamine† (80 mg/kg body weight). A cotton ligature was placed around their mandibular first molars (MFMs), as previously described.<sup>16,19</sup>

### **Preparation of bacterial cultures and administration**

The administration of *B. bacteriovorus* to the animals was described by Silva et al (2019)<sup>16</sup> as follows: *B. bacteriovorus* HD100 (ATCC® 15356, Virginia, USA) was incubated in DNB medium (ATCC® Medium 1603, Virginia, USA) at 29°C to 30°C for 48 hours. To propagate *B. bacteriovorus* HD100, the *Escherichia coli* ML 35 host strain (ATCC® 43827, Virginia, USA) was previously cultured in Luria Bertani (LB) medium (Oxoid, Thermo Scientific,

Basingstoke, Hampshire, UK). Decline in the turbidity of the solution, indicating host cell lysis (*E. coli* ML35), was observed daily during the incubation period (6 to 10 days) following ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) recommendations. The observation of small, highly mobile, curved bacilli under phase contrast microscopy indicated the presence of *B. bacteriovorus*. For separation of the remaining host cells (*E. coli* ML35), filtration was performed using filter membranes (1.2 and 0.45  $\mu\text{m}$  pores). After centrifugation at 27,000 g for 20 minutes, the supernatant was discarded and the bacterial precipitate was suspended in HM (Hepes medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) containing 25 mM hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7.6).<sup>20</sup> The suspension was made at an optical density (OD) of 600 nm adjusted to 1 ( $\approx 1 \times 10^9$  colony-forming units [CFU]/mL) plus 2% carboxymethyl cellulose. An aliquot of the suspension was added to the HM agar medium under aerobic conditions for 24 hours at 29°C to 30°C for enumeration of total culturable CFU of *B. bacteriovorus*. To assure that no contaminants or prey cells were present, aliquots of this solution were grown in LB agar medium under aerobic conditions for 24 hours. In the control and C-HD100 groups, topical applications occurred in the following periods: 0, 3, and 7 days after the start of the experiment. For topical administration, an insulin syringe with a blunt needle was used, and 100  $\mu\text{L}$  of the suspension was used for subgingival irrigation of the mesial, distal, buccal, and lingual surfaces of the MFM of the animals.<sup>16</sup>

### **Euthanasia**

Animals were euthanized with a lethal dose (150 mg/kg body weight) of sodium thiopental at day 14 of the experiment. Hemimandibles, gingival tissue samples, and ligatures were collected.

### **Enzymatic immunoassay**

The gingival tissue of the right hemimandibles was removed for the enzymatic immunoassays (Luminex™ xMAP®). The gingiva was removed from the buccal and lingual regions of the MFMs of each animal using a sterile scalpel blade. Each tissue sample was homogenized, and total protein levels were measured (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, California, USA). The levels of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF)- $\alpha$ , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, IL-10, IL-1 $\beta$ , transforming growth factor beta (TGF)- $\beta$ , regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) were determined in gingival tissues using high sensitivity

available kits (RECYTMAG-65K-05, Milliplex Map, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) and the multiplexing instrument following the manufacturer's recommendations (MAGPIX analyzer, Luminex Corporation, Austin, TX, USA). After thawing the supernatants obtained through homogenization, the concentrations of each cytokine were estimated from the standard curve using a five-parameter polynomial equation with xPONENT® software (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). A total of 32 samples were analyzed.

### **Immunohistochemical analyses**

Immunohistochemical processing was performed through the indirect immunoperoxidase method, as previously described.<sup>18</sup> The histological slides were incubated with one of the following primary antibodies: rabbit anti-BD1 (1:200, M-69, sc-25573; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-BD2 (1:200, orb10531; Biorbyt, San Francisco, CA, USA), goat anti-BD3 (1:100, I-16, sc-10860; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-TLR-2 (1:100, orb11487; Biorbyt, San Francisco, CA, USA), rabbit anti-TLR-4 (1:100, orb11489; Biorbyt, San Francisco, CA, USA), goat anti-CD-4 (1:100, C-18, sc-1140; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-CD-8 (1:100, orb10325; Biorbyt, San Francisco, CA, USA), and rabbit anti-CD-57 (1:200, V-18, sc-49197; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Histologic sections were evaluated under light microscopy using an optical microscope. Three regions were analyzed: 1) area mesial to the MFM; 2) interproximal area between mandibular first and second molars; and 3) furcation area of the MFM. In each region, an area of 600– 800 mm was analyzed at 400X magnification. The coronal limit of these areas was the epithelial tissue (mesial and interproximal areas) or the roof of the furcation (furcation area). Semiquantitative analyses of the immunolabeling patterns<sup>18</sup> were conducted according to the following scores: 0: total absence of immunoreactivity in the area; 1: one-third of the area presenting immunoreactivity; 2: two-thirds of the area presenting immunoreactivity; and 3: almost the totality of the area presenting immunoreactivity.

### **Statistical analyses**

Normality and homoscedasticity of the data were verified. The significance level was set at 5%. The significance of differences among groups for IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-10, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , RANTES, and M-CSF was assessed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test. The significance of differences among groups for BD, TLR, and CD was assessed by the Kruskal-Wallis test (ANOVA) followed by Dunn's post-hoc test.



## RESULTS

### Enzyme immunoassays

The levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-10, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , RANTES, and M-CSF are shown in Figure 1, as well as the results for the comparisons among groups.

The EP-HD100 group exhibited higher MCP-1 and RANTES levels and lower TNF- $\alpha$  levels when compared to the EP group ( $p < 0.05$ ). No differences were observed in IL-1 $\beta$ , IL-6, and M-CSF levels between the EP and EP-HD100 groups. The C-HD100 group had higher IL-6, TNF- $\alpha$ , and MCP-1 levels than the control group ( $p < 0.05$ ).

The EP-HD100 group showed higher levels of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ) than did the EP group ( $p < 0.05$ ).

### Immunohistochemical analysis

The medians, interquartile ranges, and maxima and minima of the scores obtained in the different experimental groups for BD-1, BD-2, BD-3, TLR-2, and TLR-4, CD-4, CD-8, and CD-57, as well as the results for the comparisons among the groups are shown in Figure 2. Regarding BD, the EP-HD100 group exhibited a higher immunolabeling pattern for BD-1, BD-2, and BD-3 when compared to the EP group ( $p < 0.05$ ). The C-HD100 group had a higher immunolabeling pattern for BD-1 than did the control group. The EP group showed a higher immunolabeling pattern for BD-1, BD-2 and BD-3, as also observed in the control group. No significant differences in the immunolabeling pattern were observed for TLR-2, TLR-4, CD4, CD8, and CD57 between the EP and EP-HD100 groups. Both groups had a higher immunolabeling pattern for all TLRs and CDs assessed, except for CD-8, when compared to the control group.

Beta defensins were detected in the tissues of the periodontal attachment apparatus and periodontium of protection. There were qualitative and quantitative differences in the immunolabeling pattern of BD-1, BD-2, and BD-3 (Figure 3) in the different experimental groups. BD-1, BD-2, and BD-3 were detected in keratinocytes, gingival fibroblasts, gingival blood vessels, periodontal ligament fibroblasts, osteoblasts, osteoclasts, and alveolar bone osteocytes.

The immunohistochemical expression of TLR-2 and TLR-4 was detected in the tissues of the periodontal attachment apparatus and periodontium of protection (Figure 4). In the periodontium of protection, immunolabeling for TLR-2 and TLR-4 was found in gingival fibroblasts, inflammatory cells, and in some keratinocytes of the *stratum basale*. TLR-positive

cells were rare in the groups without EP. In the periodontal attachment apparatus, TLR-2 and TLR-4 immunolabeling was detected mainly in periodontal ligament fibroblasts in all experimental groups. In the groups with EP, immunolabeling was present in fibroblasts and inflammatory cells. Some osteoclasts were positive for TLR2 and TLR-4, especially in the EP groups.

CD-4, CD-8, and CD-57 immunolabeling was found in inflammatory cells of the *lamina propria* in the gingiva and in the periodontal ligament (Figure 5). In the control and C-HD100 groups, immunolabeled cells were diffusely distributed, whereas in those groups with EP, immunolabeled cells were observed in small clusters.

## DISCUSSION

This is the first *in vivo* study to assess the effects of BALOs on the immune response of periodontal tissues. The present study demonstrated that the topical administration of *B. bacteriovorus* HD100 in rats with ligature-induced periodontitis increased BD expression and modulated the profile of inflammatory cytokines in the periodontal tissues. These effects can explain the lower rates of alveolar bone loss pointed out by Silva et al. (2019)<sup>16</sup> in animals from the EP-HD100 group when compared to those of the EP group.

Immunoinflammatory response modulation in the host could aid in the treatment of periodontal diseases based on bacteriotherapy. Conversely, in the present study, bacteriotherapy seems to have increased the levels of proinflammatory cytokines. Animals from the C-HD100 group had significantly higher levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, and RANTES than those from the control group. Since predatory bacteria are gram-negative, their introduction into mammalian tissues may actually trigger the production of inflammatory cytokines in response to immunogenic components such as LPS<sup>26</sup>. However, this inflammatory response does not cause any tissue damage<sup>21-27</sup>. Despite the increase in the levels of proinflammatory cytokines, no damage was observed in lung<sup>22</sup>, intestinal,<sup>24</sup> and periodontal<sup>16</sup> tissues of the rats after inoculation with *Bdellovibrios*. It has been proposed that *B. bacteriovorus* could be intrinsically nonpathogenic to mammalian cells due to its individual neutrally charged LPS, which does not induce a robust immunogenic response in the cells.<sup>27</sup>

In the present study, a higher BD-1 expression was observed in the C-HD100 group when compared to the control group. A higher BD-1, BD-2, and BD-3 expression was found in the EP-HD100 group than in the EP group. Considering the results obtained for the groups

without EP (control and C-HD100 groups), it is not possible to rule out the direct stimulation of these antimicrobial peptides by the predatory bacteria used in the present study, which might have contributed to a higher BD expression in the EP-HD100 group when compared to the EP group. Owing to the lack of previous studies on the effects of predatory bacteria on BD expression, this hypothesis may be assumed based on studies that demonstrate the direct effects of probiotic microorganisms on the increase of BD expression.<sup>18,28</sup> This hypothesis could support the use of predatory bacteria not only as antimicrobial therapy, but also as a treatment that can modulate the host's response. Higher levels of IL-6, MCP-1, and RANTES were also observed in the C-HD100 group when compared to the control group. In *in vitro* studies, the production of these cytokines (IL-6, MCP-1, and RANTES) was directly linked to the increase of BD expression in keratinocytes.<sup>29</sup> Thus, in the present study, *B. bacteriovorus* might have modulated the expression of inflammatory cytokines via interaction with BD in periodontal tissues.

The EP and EP-HD100 groups in the present study had similar immunolabeling patterns for TLR. TLR can be stimulated not only by pathogenic microorganisms, but also by commensal bacteria. The administration of *Lactobacillus casei* in health mice, for instance, increased the number of TLR-4-positive cells when compared to animals that were not treated with this microorganism. This finding, as pointed out by the authors, could indicate some improvement in the physiological mechanisms of surveillance of pathogenic bacteria.<sup>30</sup> TLR activation may influence the expression of BD and of inflammatory markers, such as cytokines and matrix metalloproteinases (MMPs)<sup>31-33</sup>. The immunoinflammatory response related to TLR activation may vary depending on the type of bacterium that is stimulating the receptor.<sup>31</sup> Therefore, the same expression of TLR-2 and TLR-4 obtained for the EP and EP-HD100 groups in the present study might have led to different immunoinflammatory responses, as both groups exhibited some differences in the microbiological composition of the subgingival biofilm<sup>16</sup>. Silva et al. (2019)<sup>16</sup> demonstrated that animals from the EP-HD100 group showed significantly lower rates of *Fusobacterium nucleatum*-like species (a periodontopathogen), as well as larger rates of *Streptococcus sanguinis*-like species (a commensal microorganism) when compared to those from the EP group. While the interaction of *F. nucleatum* with TLR-2 may increase the synthesis of IL-6, IL-8, and MMP-9 in *in vitro* experiments, the interaction of TLR-2 with *S. sanguinis* may reduce MMP-9 and IL-8 levels<sup>34</sup>.

CD-57-positive natural killer (NK) cells are lymphocytes with different phenotype and function from those of T and B cells. In the present study, there were no significant differences in the immunolabeling pattern for CD-57 between the EP and EP-HD100 groups.

Actually, the literature on the relationship between NK cells and the severity of periodontal disease is still controversial. Even though several studies have demonstrated some correlation between periodontal status and the number and phenotype of NK cells,<sup>35-38</sup> some have not shown any relationship at all<sup>38,39</sup>. An important role of these cells is concerned with their potential interaction with *F. nucleatum*. When Ncr1 receptors expressed on NK cells interact with ligands in *F. nucleatum*, the release of TNF- $\alpha$  and tissue destruction<sup>40</sup> increase. Silva et al. (2019)<sup>16</sup> showed that the EP group had a higher rate of species similar to *F. nucleatum* than did the EP-HD100 group. The present study revealed higher TNF- $\alpha$  levels in the EP group than in the EP-HD100 group.

In addition to innate immunity, cells of the adaptive immune system play a role in the pathogenesis of periodontal disease, especially T CD4+ and CD8+ cells, known as T-helper (Th) cells. No significant differences in the immunolabeling pattern for CD-4 and CD-8 were observed between the EP and EP-HD100 groups. Given the fact that Silva et al. (2019) demonstrated that animals from the EP-HD100 group had a less destructive course of disease than those from the EP group, one can speculate that, notwithstanding the lack of difference in CD-4 and CD-8 immunolabeling between these two groups, the phenotype of T cells might have been different. The production of different cytokines and the biological functions of T CD8+ cell clones in inflamed periodontal tissues were assessed by Wassenaar et al. (1996)<sup>41</sup>. Their study showed the presence of at least two types of T CD8+ cells within the periodontal lesion, with differences in surface phenotypes, in cytokine production, and in mechanisms of action.<sup>41</sup> While some studies indicated the participation of T cells in the production of anti-inflammatory cytokines,<sup>42,43</sup> other studies associated these cells with the production of proinflammatory cytokines.<sup>36,40</sup> In the present study, the EP-HD100 group revealed higher levels of IL-10 and TGF- $\beta$  (anti-inflammatory cytokines) and lower levels of TNF- $\alpha$  (proinflammatory cytokine) when compared to the EP group.

Silva et al. (2019)<sup>16</sup> demonstrated that the EP-HD100 group presented greater levels of osteoprotegerin (OPG) than did the EP group, which could explain the differences in alveolar bone loss in both groups. OPG is a potent anti-osteoclastogenic factor that preserves bone mass.<sup>44</sup> BD-3 is another potential anti-osteoclastogenic factor, which was assessed in the present study. Cui et al. (2017)<sup>45</sup> demonstrated that the administration of BD-3 for the treatment of EP reduces TNF- $\alpha$  levels and modulates bone apposition and resorption. Bone resorption itself is mediated by the coupling between receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) and TNF- $\alpha$  receptor (TNFr1), which stimulates the production of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANK-L).<sup>46</sup> In the present study, there was an

increase in BD-3 levels and a decrease in TNF- $\alpha$  in periodontal tissues of animals from the EP-HD100 group when compared to the EP group. Looking at the data obtained in the present study and at those reported by Silva et al. (2019),<sup>16</sup> it is possible to observe the participation of OPG, BD-3, and TNF- $\alpha$  in bone resorption in the EP groups, as well as the influence of bacteriotherapy on this immunological mechanism.

The present study showed that the topical use of *B. bacteriovorus* HD100 modulated the immune response of periodontal tissues in rats. Nevertheless, it is not possible to conclude whether the observed effects were due to *in vivo* predation or to the immunoinflammatory response generated by bacterial components (lipopolysaccharides, for instance) from dead or living *B. bacteriovorus*. Future studies using dead or non-predatory mutant control and transcriptome analyses are important to elucidate this issue and the numerous mechanisms that underlie the interaction of predatory bacteria with the host. In the future, predatory bacteria could be used as a tool to enhance the effects of scaling and root planing on the treatment of periodontitis and to reduce the use of systemic antibiotics.

## CONCLUSION

The topical use of *B. bacteriovorus* HD100 modulated the expression of innate and adaptive immune markers in rats with EP.

## Acknowledgements

The authors thank São Paulo Research Foundation (FAPESP – Funding 2013/25022-7 and 2015/11835-1). The authors also thank Marina Del Arco (Laboratory Assistant, Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto / SP, Brazil) for technical support during the microbiological procedures. All authors declare that there are no conflicts of interest related to this study.

## REFERENCES

1. Curtis MA, Zenobia C, Darveau RP. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host & Microbe*, 2011; 10(4):302-306.
2. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 2008; 320(5883):1647-1651.

3. Roberts FA, Darveau RP. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontology* 2000, 2015; 69(1):18-27.
4. Hajishengallis G, Darveau, RP, CURTIS MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 2012; 10(10):717.
5. Hajishengallis G, Lamont R. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*, 2012; 27(6):409-419.
6. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol* 2000. 2011;55(1):36–47. doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x
7. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:9-11.
8. Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontology* 2000; 2003; 31(1):167-180.
9. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1601–1608. doi:10.1902/jop.2008.080173.
10. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 2010; 8(7), 481-490.
11. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 2006; 44(10):3665-3673.
12. Stolp H, Starr MP. *Bdellovibrio bacteriovorus* gen.etsp.n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1963; 29:217-48.
13. Harini K, Vidya A, Shruthi H. *Bdellovibrio bacteriovorus*: A future antimicrobial agent? *J Indian S Periodontol*, 2013; 17(6), 823-825.
14. Sockett RE, Lambert C. *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nat Rev Microbiol*; 2004; 2:669-675.
15. Van Essche M, Quirynen M, Sliepen I, Van Eldere J, Teughels W. *Bdellovibrio bacteriovorus* attacks *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Dent Res*. 2009; 88(2):182-186.
16. Silva PHF, Oliveira LFF, Cardoso RS, et al. The impact of predatory bacteria on experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2019; 90:1053–1063. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0485>.
17. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 2010; 8(6), e1000412.
18. Oliveira LF, Salvador SL, Silva PH et al. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* probiotic in experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*, 2017; 88(2), 197-208.
19. Messoria MR, Oliveira LF, Foureaux RC, Taba Jr M, Zangerônimo MG, Furlaneto FA, Pereira LJ. 2013. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 84(12):1818-1826.

20. Jurkevitch E. Isolation and classification of *Bdellovibrio* and like organisms. *Curr Protoc Microbiol.* 2006; Chapter 7:Unit 7B1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc07b01s00>.
21. Shatzkes K, Chae R, Tang C, Ramirez GC, Mukherjee S, Tsenova L, Connell ND, Kadouri DE. Examining the safety of respiratory and intravenous inoculation of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* in a mouse model. *Sci Rep.* 2015; 5:12899.
22. Shatzkes K, Singleton E, Tang C et al. 2016. Predatory bacteria attenuate *Klebsiella pneumoniae* burden in rat lungs. *MBio.* 2016; 7(6):e01847-16.
23. Shatzkes K, Singleton E, Tang C et al. Examining the efficacy of intravenous administration of predatory bacteria in rats. *Sci Rep.* 2017a; 7(1):1864.
24. Shatzkes K, Tang C, Singleton E et al. Effect of predatory bacteria on the gut bacterial microbiota in rats. *Sci Rep.* 2017b; 7: 43483.
25. Raghunathan D, Radford PM, Gell C et al. Engulfment, persistence and fate of *Bdellovibrio bacteriovorus* predators inside human phagocytic cells informs their future therapeutic potential. *Scientific Reports*, 2019; 9(1), 4293.
26. Gupta S, Tang C, Tran M, Kadouri DE. Effect of predatory bacteria on human cell lines. *PLoS One*, 2016; 11(8): e0161242.
27. Schwudke D, Linscheid M, Strauch E et al. The obligate predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* possesses a neutral lipid A containing  $\alpha$ -D-Mannoses that replace phosphate residues similarities and differences between the lipid as and the lipopolysaccharides of the wild type strain *B. bacteriovorus* HD100 and its host-independent derivative HI100. *Journal of Biological Chemistry*, 2003:278(30), 27502-27512.
28. Fusco A, Savio V, Cammarota M, Alfano A, Schiraldi C, Donnarumma G. Beta-defensin-2 and beta-defensin-3 reduce intestinal damage caused by *Salmonella typhimurium* modulating the expression of cytokines and enhancing the probiotic activity of *Enterococcus faecium*. *Journal of immunology research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6976935>.
29. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N et al. Antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007; 127(3):594-604.
30. Castillo NA, Perdigón G, de LeBlanc ADM. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in mice. *BMC microbiology*, 2011; 11(1), 177.
31. Asai Y, Jinno T, Ogawa T. Oral treponemes and their outer membrane extracts activate human gingival epithelial cells through toll-like receptor 2. *Infection and Immunity*, 2003; 71(2):717-725.
32. Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y et al. Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *Journal of dental research*, 2006; 85(6):524-529.
33. Andrian E, Mostefaoui Y, Rouabhia M, Grenier D. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by *Porphyromonas gingivalis* in an engineered human oral mucosa model. *Journal of cellular physiology*, 2007; 211(1):56-62.

34. Peyret-Lacombe A, Brunel G, Watts M, Charveron M, Duplan, H. TLR2 sensing of *F. nucleatum* and *S. sanguinis* distinctly triggered gingival innate response. *Cytokine*, 2009; 46(2):201-210.
35. Kopp W. Density and localization of lymphocytes with natural-killer (NK) cell activity in periodontal biopsy specimens from patients with severe periodontitis. *J Clin Periodontol*, 1998; 15:595–600.
36. Stelin S, Ramakrishan H, Talwar A, Arun KV, Kumar TSS. Immunohistological analysis of CD1a<sup>+</sup> langerhans cells and CD57<sup>+</sup> natural killer cells in healthy and diseased human gingival tissue: A comparative study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2009; 13(3):150.
37. Wynne SE, Walsh LJ, Seymour GJ, Powell RN. In situ demonstration of natural killer (NK) cells in human gingival tissue. *Journal of periodontology*, 1986; 57(11): 699-702.
38. Fujita S, Takahashi H, Okabe H, Ozaki Y, Hara Y, Kato I. Distribution of natural killer cells in periodontal diseases: an immunohistochemical study. *Journal of periodontology*, 1992; 63(8):686-689.
39. Cobb CM, Singla O, Feil PH, Theiesen FC, Schultz RE. Comparison of NK-cell (Leu-7<sup>+</sup> and Leu-11b<sup>+</sup>) populations in clinically healthy gingiva, chronic gingivitis and chronic adult periodontitis. *Journal of periodontal research*, 1989; 24(1):1-7.
40. Wilensky A, Chaushu S, Shapira L. The role of natural killer cells in periodontitis. *Periodontology 2000*, 2015; 69(1):128-141.
41. Wassenaar A, Reinhardus C, Thepen T, Abraham-Inpijn L, Kievits F. (1995). Cloning, characterization, and antigen specificity of T-lymphocyte subsets extracted from gingival tissue of chronic adult periodontitis patients. *Infection and immunity*, 1995; 63(6):2147-2153.
42. Gilmour J, Lavender P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells. *Immunology*, 2008; 124(4):437-444.
43. Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD et al. Signaling and transcription in T helper development. *Annual review of immunology*, 2000; 18(1):451-494.
44. Ozaki Y, Koide M, Furuya 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).
45. Cui D, Lyu J, Li H, Lei L, Bian T, Li L, Yan F. Human  $\beta$ -defensin 3 inhibits periodontitis development by suppressing inflammatory responses in macrophages. *Molecular immunology*, 2017; 91:65-74.
46. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (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.



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Mean levels (pg/g) and standard deviations of IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), MCP-1 (C), M-CSF (D), TNF- $\alpha$  (E), RANTES (F), IL-10 (G), and TGF- $\beta$  (H) in the control, C-HD100, EP, and EP-HD100 groups. Different letters indicate significant differences among groups (ANOVA, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). IL = interleukin; MCP-1 = monocyte chemoattractant protein; M-CSF = macrophage colony-stimulating factor; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor alpha; RANTES = regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; TGF- $\beta$  = transforming growth factor beta.

**Figure 2.** Medians, interquartile ranges, and maxima and minima of scores attributed to the control, C-HD100, EP, and EP-HD100 groups in the analysis of immunolabeling pattern for BD-1 (A), BD-2 (B), BD-3 (C), TLR-2(D), TLR-4 (E), CD-57 (F), CD-4(G), and CD-8 (H). Different letters indicate statistically significant differences (Kruskal-Wallis and Dunn's tests,  $p < 0.05$ ). BD = beta defensin; TLR = toll-like receptor.

**Figure 3.** Immunolabeling pattern for BD-1 (A-D), BD-2 (E-H), and BD-3 (I-L) in periodontal tissue of the mandibular first molar of rats subjected or not to treatment with *B. bacteriovorus* HD100. Control (A-E-I), C-HD100 (B-F-J), EP (C-G-K), and EP-HD100 (D-H-L) groups. Arrows = cells positive for antibodies. Counterstaining: Harris hematoxylin. Original magnification: 1000x. Scale bars: 25  $\mu$ m. Hematoxylin counterstaining; original magnification 1000x.) PDL = periodontal ligament; AB = alveolar bone; CT = connective tissue; ET = epithelial tissue; BD = beta defensin.

**Figure 4.** Immunolabeling pattern for TLR-2 (A-D) and TLR-4 (E-H) in periodontal tissue of mandibular first molar of rats subjected or not to treatment with *B. bacteriovorus* HD100. Control (A-E), C-HD100 (B-F), EP (C-G), and EP-HD100 (D-H) groups. Arrows = cells positive for antibodies. Counterstaining: Harris hematoxylin. Original magnification: 1000x. Scale bars: 25  $\mu$ m. PDL = periodontal ligament; AB = alveolar bone; CT = connective tissue; ET = epithelial tissue; TLR = toll-like receptor.

**Figure 5.** Immunolabeling pattern for CD-57 (A-D), CD-4 (E-H), and CD-8 (I-L) in periodontal tissue of mandibular first molar of rats subjected or not to treatment with *B. bacteriovorus* HD100. Control (A-E-I), C-HD100 (B-F-J), EP (C-G-K), and EP-HD100 (D-H-L). Arrows = cells positive for antibodies. Counterstaining: Harris hematoxylin. Original magnification: 1000x. Scale bars: 25  $\mu$ m. Hematoxylin counterstaining; original magnification 1000x.) PDL = periodontal ligament; AB = alveolar bone; CT = connective tissue; ET = epithelial tissue; CD = cluster of differentiation.

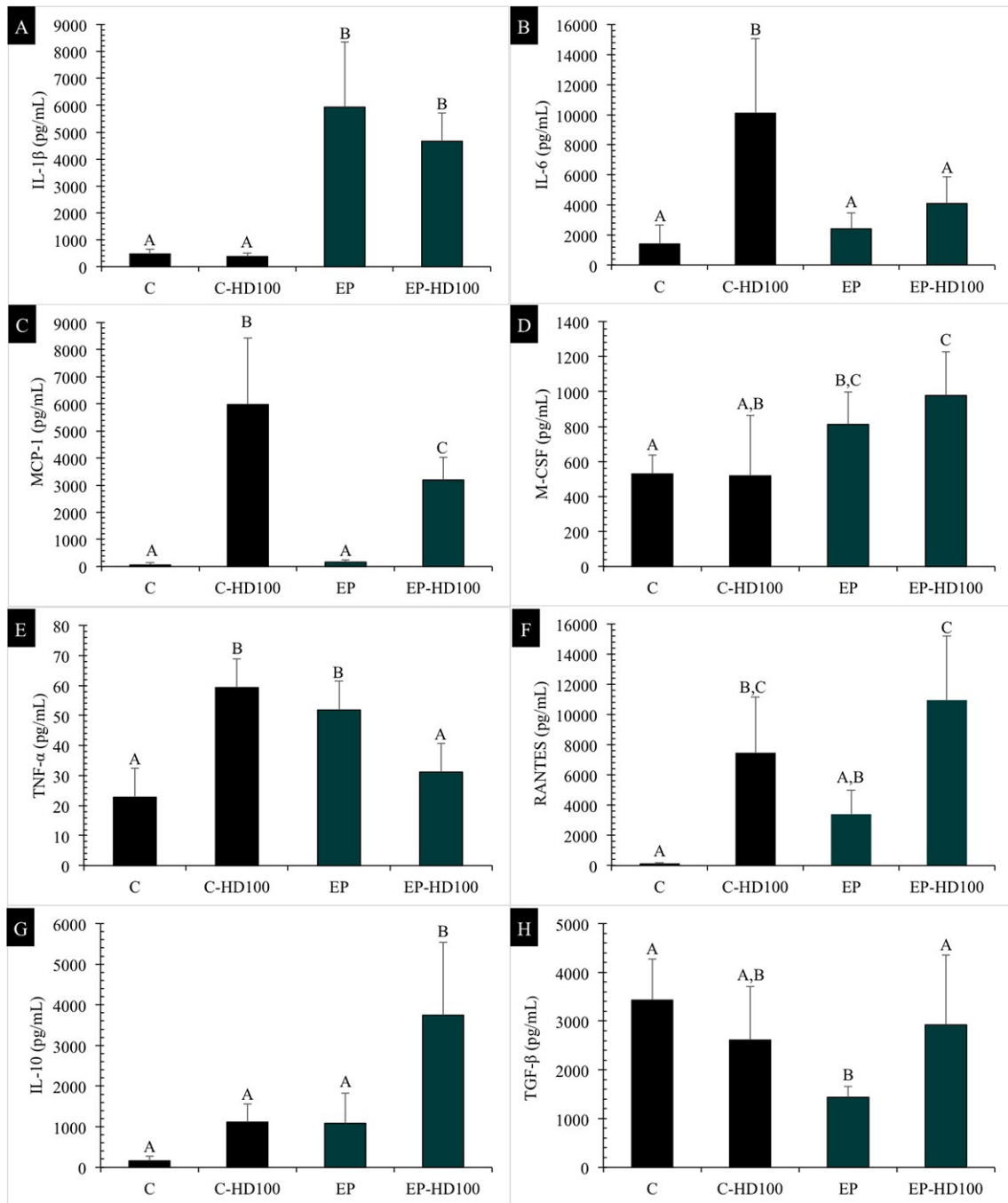


Figure 1

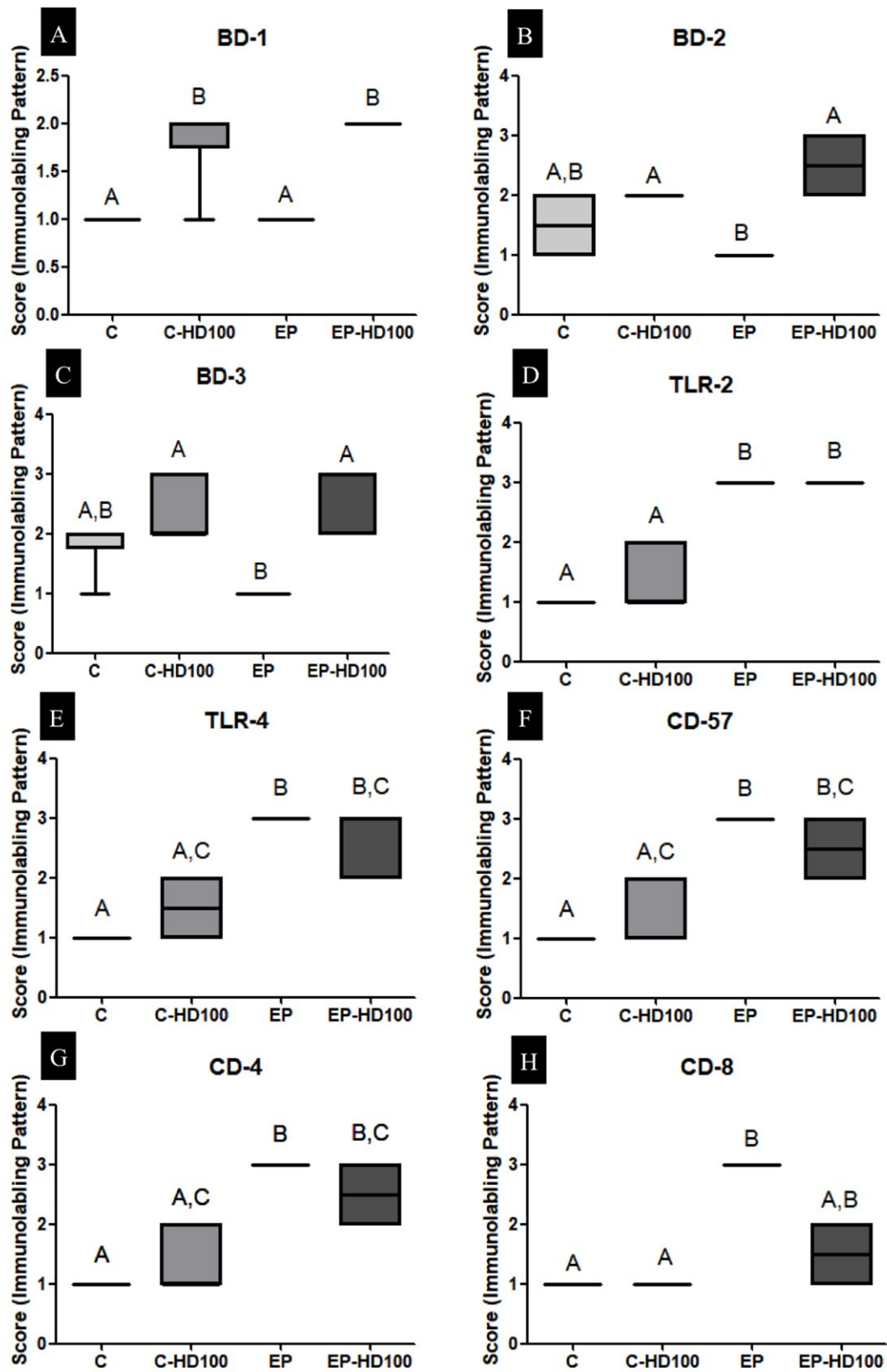


Figure 2

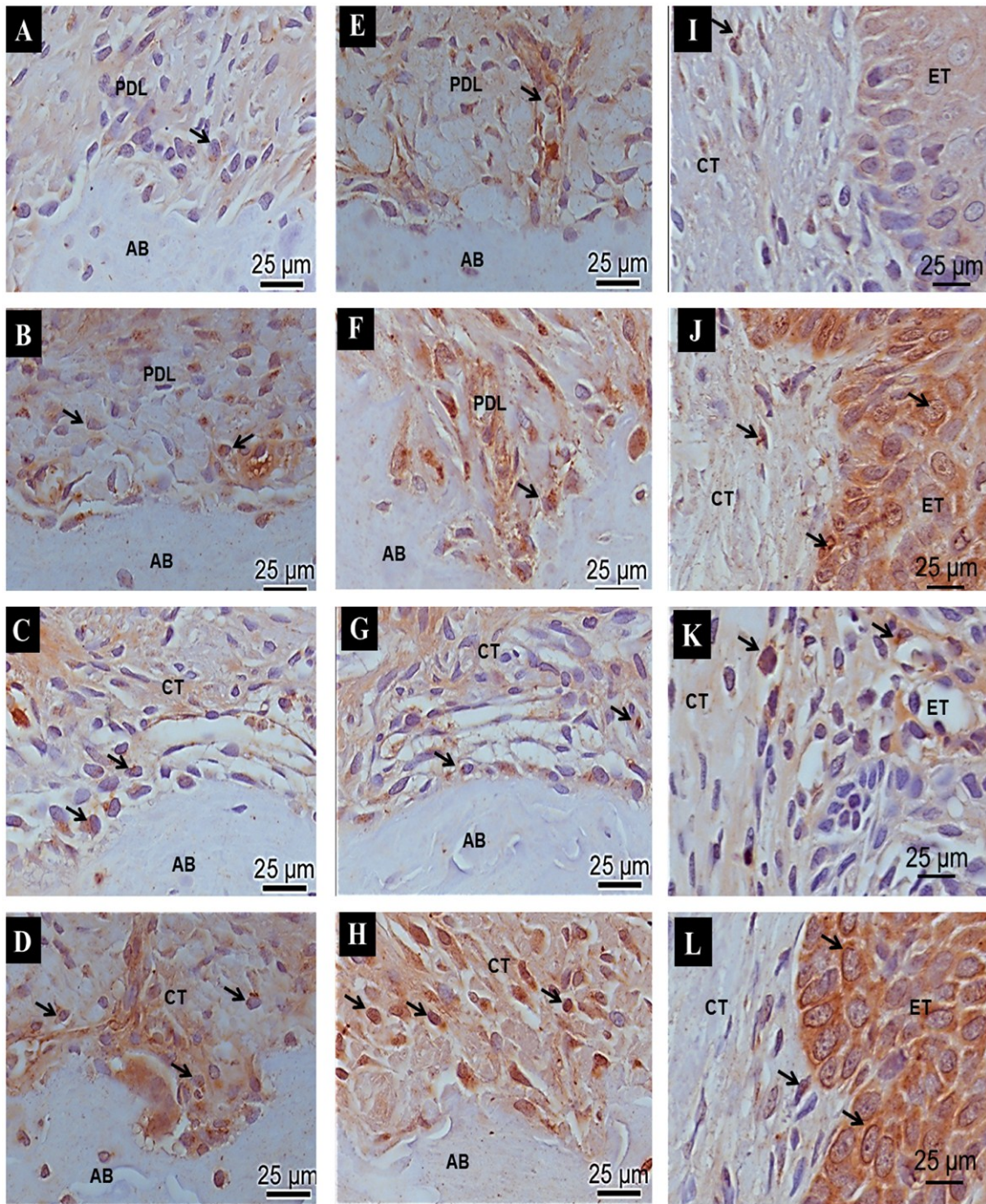


Figure 3

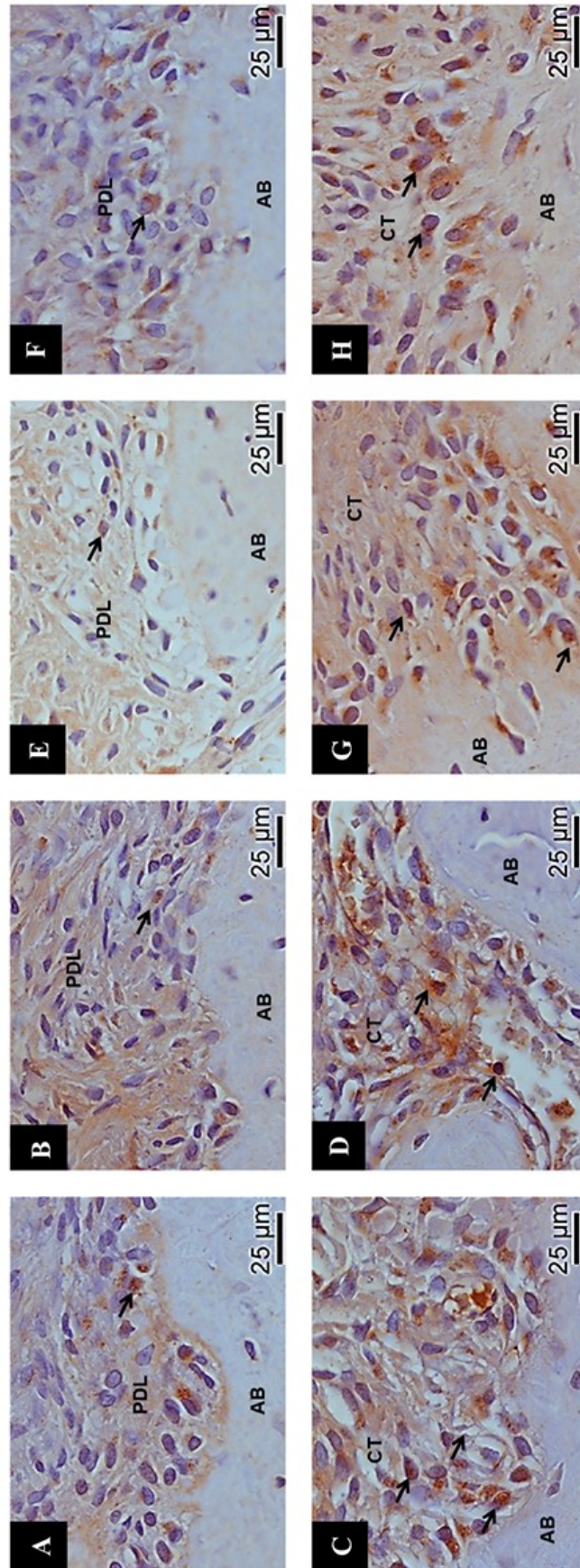


Figure 4

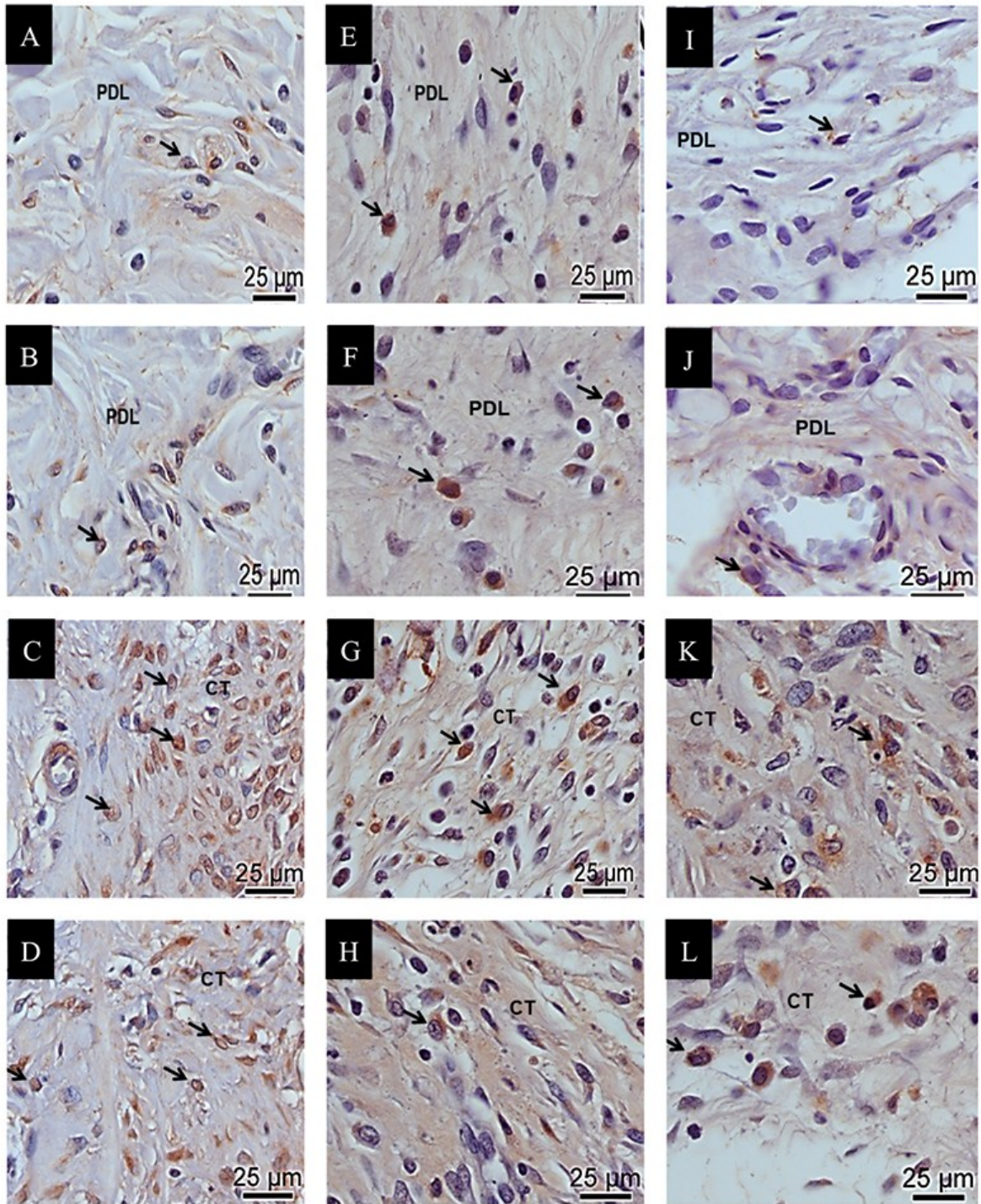


Figure 5

**ANEXO 5 – Artigo Científico Submetido para Publicação no Periódico Journal of Plos One**

***Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients.**

Marcos M. Invernici, DDS, PhD<sup>1</sup>; Flávia A. C. Furlaneto, DDS, PhD<sup>1</sup>; Sérgio L. Salvador, Pharm.D, PhD<sup>2</sup>; Arthur C. Ouwehand, PhD<sup>3</sup>; Seppo Salminen, PhD<sup>4</sup>; Anastasia Mantziari, Ms<sup>4</sup>; Gabriel Vinderola, PhD<sup>5</sup>; Edilson Ervolino, DDS, PhD<sup>6</sup>; Sandro Isaías Santana, DDS, Ms<sup>1</sup>; Pedro Henrique Felix Silva, DDS, Ms<sup>1</sup>; Michel R. Messoro, DDS, PhD<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto / SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto / SP, Brazil.

<sup>3</sup>Dupont, Nutrition and Health, Sokeritehtaantie 20, 02460 Kantvik, Finland.

<sup>4</sup>University of Turku, Functional Foods Forum, 20014 University of Turku, Finland.

<sup>5</sup>Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET), National University of the Litoral, Santa Fe, Argentina.

<sup>6</sup>Department of Basic Sciences, Division of Histology, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University, São Paulo, Brazil.

**Short title:** *Bifidobacterium* presents antimicrobial and oral immunological modulation potentials

**Name of the registry and registration number** (ClinicalTrials.gov): “Effects of probiotic therapy in the treatment of periodontitis”- NCT03408548

**Corresponding author:**

Flavia A. C. Furlaneto

Av. Café s/n Ribeirão Preto-SP 14020-150

Telephone number: +55 16 3315 4135 Fax number: +55 16 3315 4788

Email address: m.messoro@forp.usp.br

**ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate the effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (HN019) on clinical periodontal parameters (plaque accumulation and gingival bleeding), on the immunocompetence of gingival tissues [expression of beta-defensin (BD)-3, toll-like receptor 4 (TLR4), cluster of differentiation(CD)-57 and CD-4], and on immunological properties of saliva (IgA levels) in non-surgical periodontal therapy in generalized chronic periodontitis (GCP) patients. Adhesion to buccal epithelial cells (BEC) and the antimicrobial properties of HN019 were also investigated.

**Materials and Methods:** Thirty patients were recruited and monitored clinically at baseline (before scaling and root planing - SRP) and after 30 and 90 days. Patients were randomly assigned to Test (SRP+Probiotic, n=15) or Control (SRP+Placebo, n=15) group. Probiotic lozenges were used for 30 days. Gingival tissues and saliva were immunologically analyzed. The adhesion of HN019 associated or not with *Porphyromonas gingivalis* in BEC and its antimicrobial properties were investigated in *in vitro* assays. Data were statistically analyzed ( $p<0.05$ ).

**Results:** Test group presented lower plaque index (30 days) and lower marginal gingival bleeding (90 days) when compared to Control group. Higher BD-3, TLR4 and CD-4 expressions were observed in gingival tissues in Test group than in Control group. HN019 reduced the adhesion of *P. gingivalis* to BEC and showed antimicrobial potential against periodontopathogens.

**Conclusion:** Immunological and antimicrobial properties of *B. lactis* HN019 make it a potential probiotic to be used in non-surgical periodontal therapy of patients with GCP.

**Clinical Relevance:** *B. lactis* HN019 may be a potential probiotic to improve the effects of non-surgical periodontal therapy.

**Keywords:** Probiotics; Root Planing; Periodontitis; *Bifidobacterium lactis*.



## INTRODUCTION

In periodontal diseases, the first triggering mechanism is dental plaque accumulation as a result of poor oral hygiene [1]. Some studies have suggested that several periodontal pathogens may colonize supragingival biofilm, which can contribute to subgingival recolonization of recently treated sites [2-5]. This finding has led to strict professional plaque control (PPC) as part of the periodontal treatment [6,7], but with the inconvenience that it is difficult to ensure that patients return to the dental office frequently for long periods. Maintenance of gingival health after non-surgical periodontal therapy (NSPT) could prevent the increase of gingival crevicular fluid and, consequently, of proteins that act as a source of nutrients for periodontopathogens [1]. In fact, it has been demonstrated that one promising strategy for the control and treatment of periodontal diseases is the modulation of the host inflammatory response, since it is evident that some keystone pathogens are attracted by inflammation. Therefore, the control of inflammation is of paramount importance to manage the infection [8].

In this context, a possible adjuvant therapy for the prevention of gingival inflammation and dental plaque accumulation in non-surgical periodontal treatment is the use of probiotics. Probiotics are defined as “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” [9]. Probiotics might play a possible role in oral health by suppressing and displacing harmful bacteria and indirectly by producing immunomodulatory effects [10].

A number of *in vivo* studies have focused on the role of probiotics in the prevention and treatment of periodontal diseases [11-17]. It has been shown that probiotics are useful in reducing gingival inflammation [11-15] and plaque accumulation [12,13], improving periodontal health [11,16,17] and reducing proinflammatory cytokines in patients with gingivitis [14] and periodontitis [18].

To be effective against oral infections, probiotic bacteria need to adhere to the oral mucosa and to dental tissues as part of the biofilm and compete with the growth of dental pathogens. In fact, it has been demonstrated that some probiotic bacteria can interfere both quantitative and qualitatively with the oral biofilm [19-21]. Haukioja et al. 2006 demonstrated a trend for two *Bifidobacterium* strains to bind to buccal cells and intestinal mucus [22]. This ability suggests that probiotics might modulate innate and adaptive immune defenses by releasing soluble factors which can trigger signaling cascades in epithelial cells [23,24]. In short, different immune components actively kill, inhibit, and agglutinate microbes [lysozyme,

defensins, histatins, immunoglobulin (Ig) A], deprive them of iron (lactoferrin), prevent their adhesion (IgA, IgG, IgM), or act as opsonins (complement, IgG, IgM) that increase phagocytosis by immune cells [25].

*Bifidobacteria* occur naturally in the oral cavity [26] and are among the predominant anaerobic bacteria within the intestinal lumen. A body of evidence suggests that *bifidobacteria* play a critical role in maintaining the normal balance of the gut microbiota [27], and a number of probiotic-induced benefits to general health have been proposed. The possible impact on oral health has been poorly explored.

Kuru et al. (2017) demonstrated that the use of a probiotic yogurt supplemented with *B. animalis* could have a positive effect on plaque accumulation and on gingival inflammation after abstinence from oral hygiene practices [28]. Ricoldi et al. (2017) observed that *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) HN019 increased the expression of anti-inflammatory cytokines and reduced the expression of proinflammatory cytokines in rats with experimental periodontitis [29]. Oliveira et al. (2017) verified greater osteoprotegerin and beta-defensins (BD) expressions in periodontal tissues of rats with experimental periodontitis treated with *B. lactis* HN019 when compared with untreated rats [30].

A recent study demonstrated the effects of *B. lactis* HN019 as an adjunct to non-surgical therapy in generalized chronic periodontitis (GCP) patients [31]. The patients treated with probiotic presented superior results regarding decrease in probing pocket depth and clinical attachment gain. Besides, they demonstrated fewer periodontal pathogens of red and orange complexes and reduced proinflammatory cytokine levels in gingival crevicular fluid when compared with the patients not treated.

However, to the authors' knowledge, no studies have examined the mechanisms of action, including immunomodulatory properties, of *Bifidobacterium*-supplemented probiotics in the oral mucosa of patients with periodontitis. Also, no evaluations regarding the adhesion of *B. lactis* HN019 to buccal epithelial cells and *B. lactis* HN019 antimicrobial activity have been performed. The aim of this study was to evaluate the effects of *B. lactis* HN019 on clinical periodontal parameters (plaque accumulation and gingival bleeding), on the immunocompetence of gingival tissues [expression of BD-3, Toll-like receptor 4 (TLR4), cluster of differentiation(CD)-57 and CD-4], and on immunological properties of saliva (IgA levels) in non-surgical periodontal therapy in GCP patients. Adhesion to buccal epithelial cells and the antimicrobial properties of *B. lactis* HN019 were also investigated.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient population

This study includes part of the sample of patients from the study by Invernici et al. [31]. Thirty patients were selected from the population referred to the Periodontal Clinic at the School of Dentistry of Ribeirão Preto – University of São Paulo (FORP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil). All eligible patients were thoroughly informed of the nature and potential risks and benefits of their participation in the study and signed an informed consent form. The study protocol was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of FORP-USP (protocol number: 06278012.1.0000.5419). Registered in ClinicalTrials.gov (NCT03408548). The research was conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and additional requirements.

### Inclusion and exclusion criteria

All patients were diagnosed with GCP according to the 1999 classification of the American Academy of Periodontology [32]. The inclusion criteria were: (1) age over 30 years, (2) 30% or more of the sites with probing pocket depth (PPD)  $\geq$  4 mm and clinical attachment level (CAL)  $\geq$  4 mm, (4) presence of bleeding on probing (BOP) and a minimum of five teeth with at least one site with CAL and PPD  $\geq$  5 mm. All patients had to be in good general health. The exclusion criteria were: (1) cause-related periodontal therapy in the previous 6 months, (2) systemic and topic antimicrobial therapy (i.g. antibacterials, antifungals, antivirals and antiseptics) in the previous 6 months, (3) systemic conditions that could influence the progression of periodontitis or treatment response (i.e., diabetes mellitus, immunological disorders), (4) pregnancy, (5) smoking, (6) extensive prosthetic appliances, (7) need of prophylactic antibiotic therapy for routine dental procedures, and (8) long-term administration of anti-inflammatory medications.

### Experimental design, allocation concealment, and treatment protocol

According to a random numeric table generated by a computer software, the study coordinator (M.R.M.) allocated each patient to one of the following groups: Control (Scaling and root planing – SRP + placebo; 15 patients) or Test (SRP + probiotic therapy, 15 patients; Fig. 1). Before the study began, the selected individuals were identified by a numeric code that designated the experimental group to which they belonged. The study coordinator (M.R.M.)

revealed the meaning of each code only after conducting the statistical analysis of the experimental data.

The patients received lozenges containing 10 mg of probiotic (Test group) or placebo (Control group). In the Test group, the lozenges had  $10^9$  colony-forming units (CFUs) of *B. lactis* HN019 (HOWARU® Bifido LYO 40 DCU-S, DuPont™ Danisco® Sweeteners Oy, Kantvik, Finland). The same pharmacy prepared identical probiotic and placebo lozenges (i.e., same aspect, taste, and color). Identical plastic bottles containing the probiotic/placebos were sent to the study coordinator (M.R.M.), who wrote the number code of each patient on each bottle, according to the therapy they were assigned to. The coded bottles were given to the examiner (M.S.M.S.), who distributed them to the patients and did not have any access to information about the content of the lozenges. In addition, the patients were blinded to the content of the lozenges and treatment assignment during the study.

Seven days prior to NSPT, all patients received supragingival plaque control and oral hygiene instructions. Within 24 h, a specialist in periodontics (M.M.I.), who was blinded to the experimental groups, performed supragingival and subgingival SRP on all teeth with periodontal involvement, using hand (Gracey Curettes, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) and ultrasonic instruments. The patients were instructed (immediately after SRP) to take one lozenge twice a day (in the morning and before bedtime) for 30 days. They were also instructed not to take any other probiotic product during the study. The patients received 14 lozenges (placebo or probiotic) per week. At the end of each week, they had to be seen at the FORP-USP Periodontal Clinic. During their visit, they should bring the packs of lozenges taken during the week and then they received new lozenges for the subsequent week. During the visit, the patients answered a questionnaire about their perception of any side effect observed during the consumption of the dietary supplement. One research assistant (P.H.F.S.) conducted these procedures and monitored the patient's compliance with medication dosage. This assistant was not examiner or operator in this study.

All patients received immunological and clinical monitoring at baseline, at 30 days, and at 90 days. The evaluations (pre- and post-intervention) were conducted by a single trained and calibrated examiner (M.S.M.S.), who was blinded to the experimental groups.

### **Examiner calibration**

The Kappa coefficient was used to evaluate examiner calibration regarding the collection of clinical periodontal parameters for calculation of intra-examiner agreement. Ten patients with gingivitis (with both bleeding and non-bleeding on probing) not included in the study were

evaluated by the examiner on two separate occasions 48 h apart. Plaque index (PI) and bleeding on marginal probing (BOMP) were measured. Calibration was accepted if measurements at baseline and at 48 h were consistent in 90% of the measurements.

### **Clinical measurements**

PI was employed to assess the patients' oral hygiene status. The BOMP value was described 30 s after gently running a periodontal probe (PCPUNC156, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) into the gingival sulcus. PI and BOMP were scored as absent or present visual plaque and bleeding (0 or 1, respectively). BOMP and PI were measured at four sites per tooth at baseline, at 30 days, and at 90 days.

### **Analysis of salivary Immunoglobulin A (IgA) levels**

At baseline, and also at 30 and 90 days after NSPT, unstimulated saliva was collected in the morning, after a fasting period of at least 8 h. The patients were instructed not to move the tongue, cheeks, or lips during saliva collection. Two minutes after instructions, the patients spat into the spit sink, thus eliminating initial residues. After that, collection began. Three 3-minute cycles were run, during which the patients kept the saliva in the oral cavity. At the end of that period, the patients' residual saliva was collected into a 50-mL polypropylene Falcon tube (Corning Inc, Corning, NY, USA). The procedure was repeated twice and total collection time was 9 min. The saliva samples were then transferred into two graduated Eppendorf tubes using a handheld micropipette. Each tube with 1 mL of saliva was stored at -80 °C. IgA levels (mg/dL) were measured in a clinical analysis laboratory by nephelometry at 1.59 to 41.45 mg/dL.

### **Gingival biopsies and immunohistochemical analysis**

At baseline, and also at 30 days after NSPT, samples of gingival tissues (epithelial and connective tissues) were harvested from a healthy site (PPD < 3 mm) and from a diseased site (PPD > 5 mm) of each patient. Gingival biopsies were obtained through internal bevel incisions including supracrestal epithelial and connective tissues. Gingival biopsies were embedded in paraffin. Serial sections (4 µm) were performed for visualization of epithelial and connective tissues. Histological sections were deparaffinized in xylol and hydrated in a decreasing ethanol series (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). Antigen retrieval was performed by immersion of the histological slides in Diva Decloaker buffer (Biocare Medical, Inc., Concord, CA, USA), in a pressurized chamber (Decloaking Chamber, Biocare Medical, Inc.,

Concord, CA, USA) at 95° C for 10 min. The samples were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) 0.1M - pH 7.4 between each immunohistochemical step. The histological sections were immersed in 3% hydrogen peroxide for 1 h and in 1% bovine serum albumin for 12 h to block endogenous peroxidase activity and nonspecific sites, respectively. Histological slides with samples from all experimental groups were categorized into four lots. Each lot was incubated for 24 h using the following primary antibodies: anti-BD-3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-CD-57 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) or anti-CD-4 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Universal LSAB™+ Kit/HRP (Dako North America, Inc., Carpinteria CA, USA) was used in the subsequent stages. The histological sections were incubated in biotinylated secondary antibody for 2 h and treated with a streptavidin–horseradish peroxidase conjugate for 1 h. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (Liquid DAB+, Dako North America, Inc., Carpinteria CA, USA) was used as chromogen, and the histological sections were counterstained with Harris hematoxylin. As negative control, the specimens were subjected to the procedures described earlier, without primary antibodies.

The histological sections were analyzed semiquantitatively by a researcher who was blinded to the experimental groups. The immunolabeled areas were standardized using 250x magnification in a 400 µm x 600 µm area at the center of the histological section. The long axis of this rectangle was perpendicular to an imaginary line at the interface between the epithelial and connective tissues. The rectangle was positioned in such a way that its upper half contained predominantly epithelial tissue, whereas its lower half contained predominantly connective tissue. Immunolabeling was defined as a brownish precipitate in cells and/or in the extracellular matrix captured by a digital camera coupled to a light microscope and later saved in a computer file. Immunolabeling scores were used as follows: 0 – no immunolabeling (no immunoreactivity in the area); score 1 – extremely low immunoreactivity (around 1/5 of the area was immunoreactive); score 2 – low immunoreactivity (around 2/5 of the area were immunoreactive); score 3 – moderate immunoreactivity (around 3/5 of the area were immunoreactive); score 4 – high immunoreactivity (around 4/5 of the area were immunoreactive); score 5 – extremely high immunoreactivity (almost the whole area was immunoreactive).

### **In vitro assay of the adhesion of *B. lactis* HN019 and *Porphyromonas gingivalis* to buccal epithelial cells (BEC)**

The assay was performed as previously described [22], with some modifications as follows: BEC were collected from one healthy male volunteer. Cells were washed and suspended in buffered KCl to obtain an optical density (OD)<sub>600</sub> of 0.500. Bacterial suspensions were made from overnight cultures in buffered KCl to obtain an OD<sub>600</sub> of 0.1 [=  $2 \times 10^7$  colony forming units (CFU)/mL]. Equal amounts of BEC and bacterial suspensions were incubated for 60 min. Control cells were treated with buffer only. After washing, the cells with adherent bacteria were stained with crystal violet and safranin solutions. All bacteria (indigenous bacteria, *B. lactis* HN019, and *P. gingivalis* - ATCC 33277) adhered to BEC were counted under a light microscope. Thirty cells were counted from each sample. All bacterial strains were tested in parallel and the experiments were repeated twice.

### **In vitro analysis of the antimicrobial activity of *B. lactis* HN019**

The *in vitro* antimicrobial activity of *B. lactis* HN019 was assessed against the following periodontopathogens using the agar diffusion method, as described by Zhu et al. [33]: *P. gingivalis* (W83), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 33393). For that purpose, 200- $\mu$ L aliquots ( $10^9$  CFU/mL) of *B. lactis* HN019, previously grown on MRSA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), were inoculated into 15-mm wells in Tryptic soy agar - TSA (Difco), supplemented with 5  $\mu$ g/mL of hemin, 1  $\mu$ g/mL of menadione, and 5% of defibrinated sheep blood, previously seeded ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) with indicator microorganisms. After pre-incubation for 30 min at room temperature, TSA plates were incubated at 37° C for 72 h under anaerobic (BD GasPak™ EZ container systems, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, and *F. nucleatum*) or microaerophilic (*A. actinomycetemcomitans*) conditions. Thereafter, the diameter (mm) of inhibition halos was measured using a digital caliper. Each indicator strain was tested three times in duplicate.

The means and standard deviations of the zones of inhibition observed in the sensitivity of different periodontopathogens to *B. lactis* HN019 were calculated.

### **Statistical analysis**

Each variable was computed per participant and then averaged across patients in both groups. The significance level was set at 5%.

The within-group and between-group differences for i) PI; ii) BOMP; and iii) IgA levels were assessed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc* test and by Student's t test, respectively.

The relative frequencies of the scores were calculated for the analysis of immunohistochemical data on BD-3, TLR4, CD-57 and CD-4 immunolabeling, at baseline and at 30 days for each experimental group, considering healthy and unhealthy sites separately. Significant differences between groups were determined by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* test.

The between-group and within-group differences for adhesion of the strains to BEC were evaluated by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* test.

## RESULTS

This study started in December 2015 and ended in August 2016. The sample was comprised of 15 patients in the control group with mean age  $\pm$  standard deviation (SD) of  $47.67 \pm 9.49$  years and 15 patients in the test group with mean age  $\pm$  SD of  $47.60 \pm 9.97$  years. The Test group presented 10 female and 5 male. The control group presented 7 female and 8 male. The means of teeth in the mouth  $\pm$  SD were  $22.86 \pm 2.85$  and  $24.53 \pm 2.97$  in Test and Control groups, respectively. There were no statistically significant differences between these variables. Postoperative healing was uneventful in all cases. No adverse effects of probiotic therapy were observed.

### Clinical monitoring

Table 1 shows mean percentage rates for BOMP and PI. Test group presented lower BOMP at 90 days and lower PI at 30 days when compared to Control group ( $p < 0.05$ ).

### Analysis of salivary IgA levels

IgA levels are shown in Fig. 2A. No significant changes were observed in IgA levels at 30 and 90 days, compared to baseline, for Test and Control groups ( $p > 0.05$ ). Fig. 2B shows mean IgA ratios (changes in IgA levels in relation to baseline values) at 30 and 90 days. There were no significant differences between Test and Control groups at 30 and 90 days ( $p > 0.05$ ).



### **Gingival biopsies and immunohistochemical analysis**

The relative frequencies of scores of healthy and diseased sites in Control and Test groups before and after probiotic therapy are shown in Figs. 3 and 4.

The immunohistochemical technique was highly specific for the detection of BD-3 (Fig. 5, A-H), TLR4 (Fig. 5, I-P), CD-57 (Fig. 6, A-H) and CD-4 (Fig. 6, I-P). No immunoreactivity was observed in the negative controls of immunohistochemical reactions. Immunolabeling stains were defined as dark brown and were circumscribed to cytoplasm and, to a lesser extent, to extracellular matrices. Immunolabeling of BD-3 was predominantly present in keratinocytes of epithelial tissue and in fibroblasts of connective tissue. Immunolabeling of TLR4 was predominantly present in cells of connective tissue. Immunolabeling of CD-4 and CD-57 was present mainly in inflammatory and macrophage-like cells.

Only the healthy sites of patients treated with probiotics exhibited significantly higher BD-3 and TLR4 immunoreactivity (Figs. 3 and 5) at 30 days when compared to baseline ( $p < 0.05$ ). At diseased sites, there was significantly higher BD-3 and TLR4 immunoreactivity in both groups at 30 days when compared to baseline ( $p < 0.05$ ). The Test group exhibited significantly higher BD-3 and TLR4 expressions on diseased sites at 30 days when compared to Control group ( $p < 0.05$ ). In CD-57 analysis, there were no significant differences in intra-groups or inter-groups comparisons in healthy or diseased sites. No inter or intra-groups differences in the expression of CD-4 in healthy sites were observed. Considering diseased sites, only Test group showed a significantly greater immunoreactivity pattern of CD-4 at 30 days when compared with baseline ( $p < 0.05$ ). At 30 days, CD-4 immunoreactivity pattern in diseased sites of Test group was also greater ( $p < 0.05$ ) than the one of Control group (Figs. 4 and 6).

### ***In vitro* assay of the adhesion of *B. lactis* HN019 and *P. gingivalis* to BEC**

A background of approximately 13 indigenous bacteria/cells were attached to washed and untreated BEC. Table 2 shows the mean adhesion of *B. lactis* HN019 and *P. gingivalis* to BEC alone and combined. There was a lower mean adhesion of *P. gingivalis* combined with *B. lactis* HN019 when compared to the mean adhesion of *P. gingivalis* alone ( $p < 0.05$ ). Similarly, the adhesion of *B. lactis* HN019 was influenced by the presence of *P. gingivalis*.

### ***In vitro* analysis of *B. lactis* HN019 antimicrobial activity**

Means and standard deviations (mm) of the zones of inhibition obtained for the sensitivity of different periodontopathogens to *B. lactis* HN019 are displayed in Fig. 7. The probiotic strain inhibited the growth of all periodontopathogens assessed.

## DISCUSSION

This double-blind randomized controlled trial assessed clinical and immunological effects of *B. lactis* HN019 during non-surgical periodontal therapy in individuals with GCP. The findings demonstrate that probiotic therapy improved plaque control, reduced BOMP, and increased BD-3, TLR4 and CD-4 expressions in periodontal tissues. *B. lactis* HN019 also inhibited the growth of periodontopathogens in *in vitro* tests and reduced the adhesion of *P. gingivalis* to BEC.

In the present study, the Test group had lower PI than the Control group at 30 days. Some previous studies revealed that *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* could quantitatively influence oral biofilm formation [19, 20]. Some probiotic strains may form biofilm on hard and soft tissues, preventing the adhesion of pathogenic bacteria, and they may also change the protein composition of the acquired salivary pellicle by binding and/or degradation of salivary proteins [22].

Bacterial coaggregation mechanisms are also likely to affect the quantity and quality of oral biofilm. The probiotic strain used in the present study can perfectly adhere to subgingival biofilms containing *P. gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, and *F. nucleatum* [34] and can coaggregate with *F. nucleatum* [22]. The latter act as an actual “biological bridge” in oral biofilm formation, as they adhere to virtually all oral bacteria [22]. The possible coaggregation of *Bifidobacterium* with *F. nucleatum* may have reduced the number of binding sites for other bacteria, affecting the quality and quantity of biofilm in patients from the Test group in the present study. Moreover, *B. lactis* HN019 may have directly inhibited the growth of different periodontopathogens. Previous *in vitro* studies demonstrated that *Bifidobacterium* could inhibit the growth of periodontopathogens [33, 34]. In the present study, *B. lactis* HN019 showed antimicrobial potential against *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, and *A. actinomycetemcomitans* in *in vitro* sensitivity tests.

Probiotic therapy, even when administered for a short time period, seems to promote remarkable resilience of the oral microbiome to risk factors for periodontitis, such as bacterial plaque accumulation [35]. Notwithstanding a PI similar to that of the Control group at 90 days, the Test group had a lower BOMP, which indicates a possible delayed effect of probiotic therapy on gingival inflammation. Lee et al. (2015) showed that *Lactobacillus brevis* lozenges significantly delayed the onset of gingival inflammation in healthy individuals who refrained from oral hygiene [36].

There are at least two ways to explain the lower gingival inflammation observed in patients from the Test group in the present study. The first one is related to the possible competition between probiotic bacteria and periodontopathogens for binding sites. Mendi et al. (2016) conducted an *in vitro* study and demonstrated that *Lactobacillus rhamnosus* can adhere to mesenchymal stem cells in the gingiva, possibly protecting them from being colonized by *P. gingivalis* [37]. In the *in vitro* assays performed in this study, *B. lactis* HN019 was able to adhere to BEC and could reduce the adhesion of *P. gingivalis* to these cells. This is the first study to assess the potential adhesion of *B. lactis* HN019 to BEC. The mean adhesion observed in the present study was similar to the one found by Haukioja et al. (2006) for *Lactobacillus rhamnosus* GG in BEC [22]. The second explanation could be related to a possible interference of probiotic bacteria in the expression of markers involved in regulating the immunocompetence of the epithelial barrier. The gingival biopsies of diseased sites showed an increase in BD-3 expression in Test group. A previous study showed that *B. lactis* HN019 also increased BD-3 expression in periodontal tissues and reduced periodontal inflammation in rats with experimental periodontitis [30]. BD are antimicrobial peptides that play an important role in epithelial innate immunity and their differential expressions are associated with periodontal diseases [38]. Among BDs, BD-3 is differentially induced by infectious or inflammatory stimuli [39-41]. Some studies [42-44] demonstrated that inflamed periodontal sites have lower BD-3 levels than do healthy sites. In the present study, Test group also exhibited higher TLR4 expression than Control group. TLR4 is a recognition receptor that plays a crucial role in the host's innate response, as it helps identify lipopolysaccharides (LPS) of gram-negative bacteria [45]. The administration of *Lactobacillus casei* CRL 431 in healthy mice increased the number of TLR4-positive cells when compared to animals that were not treated with the probiotic. This finding, according to the authors, could indicate some improvement in physiological surveillance mechanisms against pathogenic bacteria [46].

In this study, gingival biopsies of diseased sites presented greater expressions of CD-57 than the ones of healthy sites. Natural killer (NK) cells, which are CD-57-positive, are lymphocytes different from B and T cells due to their phenotype and function. The response of NK cells to pathogens and tumoral cells is almost immediate and occurs before the development of the adaptive immune response [47]. Kopp (1988) observed an increase in NK cells in the gingiva of patients with chronic periodontitis when compared with the gingiva of healthy subjects [48]. In the present study, there were no significant differences in CD-57 immunolabeling pattern between Test and Control groups, although there was less marginal

gingival bleeding in Test group. In fact, there are controversies in the literature regarding the relation between NK cells and the severity of periodontal disease. While several studies demonstrated some correlation between periodontal status and the number and phenotype of NK cells, others did not show any relation between them [48-52].

Besides innate immunity, cells of the adaptive immunity act in the pathogenesis of periodontal diseases, specially CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, named T-helper (Th) cells. In the present study, diseased sites of patients of Test group presented greater expression of CD4<sup>+</sup> cells than the ones of Control group. In fact, probiotic therapy may influence the expression of CD4<sup>+</sup> cells. Probiotic administration increased CD4<sup>+</sup> cells in the lamina propria of the small intestine of mice that were exposed to an experimental model of stress induced by food and mobility restriction [53]. Daily consumption of probiotics over a prolonged period of time may improve CD4<sup>+</sup> count in people living with HIV [54]. It is important to emphasize that, in the pathogenesis of periodontal diseases, CD4<sup>+</sup> cells function over other cell types can be dual according to the cytokines produced [55]. In the present study, it is likely that CD4<sup>+</sup> cells of Test group presented a phenotype related to the production of anti-inflammatory cytokines. Invernici et al. (2018) demonstrated that patients treated with *B. lactis* HN019 presented lower proinflammatory cytokine levels in gingival crevicular fluid than the patients not treated [31]. IgA is an important defense factor found in the saliva and it influences the oral microbiota, interfering with bacterial adhesion and metabolism [56]. The probiotic therapy used in the present study did not change IgA levels in the saliva. Studies on immunoregulatory effects of probiotic bacteria involving IgA have shown contradictory and inconclusive outcomes [57]. While several studies showed that probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus* [58-62] did not increase IgA levels, other studies revealed high IgA concentrations [63-67] in patients treated with probiotic strains of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, or *Enterococcus*. There could be many reasons for the conflicting findings, such as heterogeneous research models, type of saliva, and analytical methodology [57]. Furthermore, the assessed saliva might not fully indicate the composition of salivary glands.

The short period of assessment is a limitation of this study. A long-term follow-up of the patients would be important to evaluate whether the additional effects obtained with probiotic therapy during non-surgical periodontal therapy will be sustained over time. It is also important that future investigations evaluate new methods of administration of *B. lactis* HN019 and other therapeutic regimens for the treatment of periodontal patients. The effect of *B. lactis* HN019 on patients with gingivitis should be investigated as well.

## CONCLUSIONS

In conclusion, the immunological and antimicrobial properties of *B. lactis* HN019 make it a potential probiotic to be used in non-surgical periodontal therapy of patients with GCP.

## NOTES

### Compliance with ethical standards

### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest related to this study.

### Funding

The study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – process #480982/2013-9) awarded to Michel R. Messora. E.I DuPont de Nemours & Co. Danisco Sweeteners Oy (Kantvik, Finland) donated the probiotics.

### Ethical Approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

### Informed Consent

All eligible patients were thoroughly informed of the nature and potential risks and benefits of their participation in the study and signed an informed consent form.

## REFERENCES

- 1 Marsh PD (2003) Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149 (Pt 2):279-294. doi:10.1099/mic.0.26082-0
- 2 Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS (2000) The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *Journal of clinical periodontology* 27 (9):637-647
- 3 Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Favari M, Feres M (2008) Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clinical oral implants research* 19 (10):975-982. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x

- 4 Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X (2008) Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral microbiology and immunology* 23 (3):196-205. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x
- 5 Sanz-Sanchez I, Ortiz-Vigon A, Herrera D, Sanz M (2016) Microbiological effects and recolonization patterns after adjunctive subgingival debridement with Er:YAG laser. *Clinical oral investigations* 20 (6):1253-1261. doi:10.1007/s00784-015-1617-y
- 6 Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L, Bratthall G (1982) Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. A clinical study. *Journal of clinical periodontology* 9 (2):115-128
- 7 Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B (1984) Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *Journal of clinical periodontology* 11 (3):193-207
- 8 Mark Bartold P, Van Dyke TE (2017). Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontology 2000* 75 (1):317-329.
- 9 FAO/WHO J (2002) Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London. Ontario, Canada
- 10 de Vrese M, Schrezenmeir J (2008) Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 111:1-66. doi:10.1007/10\_2008\_097
- 11 Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC (2013) Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of clinical periodontology* 40 (11):1025-1035. doi:10.1111/jcpe.12155
- 12 Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G (2006) Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swedish dental journal* 30 (2):55-60
- 13 Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trinchieri V, Amicosante G, Cifone MG (2007) Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral diseases* 13 (4):376-385. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x
- 14 Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C (2009) Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta odontologica Scandinavica* 67 (1):19-24. doi:10.1080/00016350802516170
- 15 Stenstrom M, Koch G, Coric S, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Birkhed D, Wendt LK (2014) Oral administration of *Lactobacillus reuteri* during the first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age. *Caries research* 48 (2):111-117. doi:10.1159/000354412
- 16 Tekce M, Ince G, Gursoy H, Dirikan Ipci S, Cakar G, Kadir T, Yilmaz S (2015) Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *Journal of clinical periodontology* 42 (4):363-372. doi:10.1111/jcpe.12387
- 17 Ince G, Gursoy H, Ipci SD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yilmaz S (2015) Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *Journal of periodontology* 86 (6):746-754. doi:10.1902/jop.2015.140612

- 18 Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpiński TM (2014) Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 62 (6):495-500. doi: 10.1007/s00005-014-0277-y.
- 19 Kuru BE, Laleman I, Yalnizoglu T, Kuru L, Teughels W (2017) The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of periodontology* 88 (11):1115-1123. doi:10.1902/jop.2017.170213.
- 20 Penala S, Kalakonda B, Pathakota KR, Jayakumar A, Koppolu P, Lakshmi BV, Pandey R, Mishra A (2016) Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: A randomized controlled trial. *Journal of research in pharmacy practice* 5 (2):86-93. doi:10.4103/2279-042X.179568.
- 21 Nissen L, Sgorbati B, Biavati B, Belibasakis GN (2014) *Lactobacillus salivarius* and *L. gasseri* down-regulate *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* exotoxins expression. *Annals of microbiology* 64:611-617.
- 22 Haukioja A, Yli-Knuutila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, Tenovuo J (2006) Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral microbiology and immunology* 21 (5):326-332. doi:10.1111/j.1399-302X.2006.00299.x
- 23 Corthesy B, Gaskins HR, Mercenier A (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *The Journal of nutrition* 137 (3 Suppl 2):781S-790S
- 24 Menard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2004) Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 53 (6):821-828
- 25 Wilson M (2005) *Microbial inhabitants of humans: their ecology and role in health and disease*. Cambridge University Press,
- 26 Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL (2002) Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of clinical microbiology* 40 (3):1001-1009
- 27 Fuller R, Gibson GR (1997) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement* 222:28-31. doi:10.1080/00365521.1997.11720714
- 28 Kuru BE, Laleman I, Yalnizoglu T, Kuru L, Teughels W (2017) The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of periodontology* 88 (11):1115-1123. doi:10.1902/jop.2017.170213
- 29 Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, Ervolino E, de Oliveira MN, Bogsan CSB, Salvador SL, Messoria MR (2017) Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PloS one* 12 (6):e0179946. doi:10.1371/journal.pone.0179946
- 30 Oliveira LF, Salvador SL, Silva PH, Furlaneto FA, Figueiredo L, Casarin R, Ervolino E, Palioto DB, Souza SL, Taba M, Jr., Novaes AB, Jr., Messoria MR (2017) Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *Journal of periodontology* 88 (2):197-208. doi:10.1902/jop.2016.160217

- 31 Invernici MM, Salvador SL, Silva PHF, Soares MSM, Casarin R, Palioto DB, Souza SLS, Taba M Jr, Novaes AB Jr, Furlaneto FAC, Messoria MR (2018) Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 45 (10):1198-1210. doi: 10.1111/jcpe.12995.
- 32 Armitage GC (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology* 4 (1):1-6. doi:10.1902/annals.1999.4.1.1
- 33 Zhu Y, Xiao L, Shen D, Hao Y (2010) Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. *Acta odontologica Scandinavica* 68 (5):261-268. doi:10.3109/00016357.2010.492235
- 34 Jasberg H, Soderling E, Endo A, Beighton D, Haukioja A (2016) Bifidobacteria inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. *European journal of oral sciences* 124 (3):251-258. doi:10.1111/eos.12266
- 35 Rosier BT, Marsh PD, Mira A (2017) Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *Journal of dental research*:22034517742139. doi:10.1177/0022034517742139
- 36 Lee JK, Kim SJ, Ko SH, Ouwehand AC, Ma DS (2015) Modulation of the host response by probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 in experimental gingivitis. *Oral diseases* 21 (6):705-712. doi:10.1111/odi.12332
- 37 Mendi A, Kose S, Uckan D, Akca G, Yilmaz D, Aral L, Gultekin SE, Eroglu T, Kilic E, Uckan S (2016) *Lactobacillus rhamnosus* could inhibit *Porphyromonas gingivalis* derived CXCL8 attenuation. *Journal of applied oral science : revista FOB* 24 (1):67-75. doi:10.1590/1678-775720150145
- 38 Wang P, Duan D, Zhou X, Li X, Yang J, Deng M, Xu Y (2015) Relationship between expression of human gingival beta-defensins and levels of periodontopathogens in subgingival plaque. *Journal of periodontal research* 50 (1):113-122. doi:10.1111/jre.12187
- 39 Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA (2000) Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infection and immunity* 68 (5):2907-2915
- 40 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *The Journal of biological chemistry* 276 (8):5707-5713. doi:10.1074/jbc.M008557200
- 41 Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB, Jr. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 263 (1-2):211-218
- 42 Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H (2007) Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *Journal of periodontal research* 42 (5):429-437. doi:10.1111/j.1600-0765.2006.00964.x
- 43 Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB, Jr., Guthmiller JM (2004) Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 33 (5):278-285. doi:10.1111/j.0904-2512.2004.00143.x



- 44 Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, Romanos GE, Sorsa T (2008) Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Archives of oral biology* 53 (2):175-186. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.09.010
- 45 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388 (6640):394-397. doi:10.1038/41131
- 46 Castillo NA, Perdigon G, de Moreno de Leblanc A (2011) Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC microbiology* 11:177. doi:10.1186/1471-2180-11-177.
- 47 Yokoyama WM1, Kim S, French AR (2004) The dynamic life of natural killer cells. *Annual review of immunology* 22:405-29.
- 48 Kopp W (1988) Density and localization of lymphocytes with natural-killer (NK) cell activity in periodontal biopsy specimens from patients with severe periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 15 (10):595-600.
- 49 Wynne SE, Walsh LJ, Seymour GJ, Powell RN (1996) In situ demonstration of natural killer (NK) cells in human gingival tissue. *Journal of periodontology* 57 (11):699-702.
- 50 Fujita S, Takahashi H, Okabe H, Ozaki Y, Hara Y, Kato I (1992) Distribution of natural killer cells in periodontal diseases: an immunohistochemical study. *Journal of periodontology* 63 (8):686-9.
- 51 Stelin S, Ramakrishan H, Talwar A, Arun KV, Kumar TS (2009) Immunohistological analysis of CD1a langerhans cells and CD57 natural killer cells in healthy and diseased human gingival tissue: A comparative study. *Journal of indian society of periodontology* 13 (3):150-154.
- 52 Cobb CM, Singla O, Feil PH, Theisen FC, Schultz RE (1989) Comparison of NK-cell (Leu-7+ and Leu-11b+) populations in clinically healthy gingiva, chronic gingivitis and chronic adult periodontitis. *Journal of periodontal research* 24 (1):1-7.
- 53 Palomar MM, Maldonado Galdeano C, Perdigon G (2014) Influence of a probiotic *Lactobacillus* strain on the intestinal ecosystem in a stress model mouse. *Brain, behavior, and immunity* 35:77-85. doi: 10.1016/j.bbi.2013.08.015.
- 54 Miller H, Ferris R, Phelps BR (2016) The effect of probiotics on CD4 counts among people living with HIV: a systematic review. *Beneficial microbes* 7 (3):345-351. doi: 10.3920/BM2015.0163.
- 55 Romagnani S (1997) The Th1/Th2 paradigm. *Immunology today* 8 (6):263-266.
- 56 Patil PB, Patil BR (2011) Saliva: A diagnostic biomarker of periodontal diseases. *Journal of Indian Society of Periodontology* 15 (4):310
- 57 Jorgensen MR, Keller MK, Kragelund C, Hamberg K, Ericson D, Nielsen CH, Twetman S (2016) *Lactobacillus reuteri* supplements do not affect salivary IgA or cytokine levels in healthy subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Acta odontologica Scandinavica* 74 (5):399-404. doi:10.3109/00016357.2016.1169439
- 58 Paineau D, Carcano D, Leyer G, Darquy S, Alyanakian MA, Simoneau G, Bergmann JF, Brassart D, Bornet F, Ouwehand AC (2008) Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *FEMS immunology and medical microbiology* 53 (1):107-113. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00413.x
- 59 Gleeson M, Bishop NC, Oliveira M, McCauley T, Tauler P, Lawrence C (2012) Effects of a *Lactobacillus salivarius* probiotic intervention on infection, cold symptom duration and severity, and mucosal immunity in endurance athletes. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 22 (4):235-242

- 60 Kekkonen RA, Lummela N, Karjalainen H, Latvala S, Tynkkynen S, Jarvenpaa S, Kautiainen H, Julkunen I, Vapaatalo H, Korpela R (2008) Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World journal of gastroenterology* 14 (13):2029-2036
- 61 Tiollier E, Chennaoui M, Gomez-Merino D, Drogou C, Filaire E, Guezennec CY (2007) Effect of a probiotics supplementation on respiratory infections and immune and hormonal parameters during intense military training. *Military medicine* 172 (9):1006-1011
- 62 Dong H, Rowland I, Thomas LV, Yaqoob P (2013) Immunomodulatory effects of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* Shirota in healthy older volunteers. *European journal of nutrition* 52 (8):1853-1863. doi:10.1007/s00394-012-0487-1
- 63 Surono IS, Koestomo FP, Novitasari N, Zakaria FR, Yulianasari, Koesnandar (2011) Novel probiotic *Enterococcus faecium* IS-27526 supplementation increased total salivary sIgA level and bodyweight of pre-school children: a pilot study. *Anaerobe* 17 (6):496-500. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.06.003
- 64 Rizzardini G, Eskesen D, Calder PC, Capetti A, Jespersen L, Clerici M (2012) Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12(R) and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. *casei* 431(R) in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The British journal of nutrition* 107 (6):876-884. doi:10.1017/S000711451100420X
- 65 Shimizu K, Sato H, Suga Y, Yamahira S, Toba M, Hamuro K, Kakumoto K, Kohda N, Akama T, Kono I, Kuno S (2014) The effects of *Lactobacillus pentosus* strain b240 and appropriate physical training on salivary secretory IgA levels in elderly adults with low physical fitness: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 54 (1):61-66. doi:10.3164/jcfn.13-62
- 66 Kotani Y, Shinkai S, Okamatsu H, Toba M, Ogawa K, Yoshida H, Fukaya T, Fujiwara Y, Chaves PH, Kakumoto K, Kohda N (2010) Oral intake of *Lactobacillus pentosus* strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Immunity & ageing : I & A* 7:11. doi:10.1186/1742-4933-7-11
- 67 Asama T, Arima TH, Gomi T, Keishi T, Tani H, Kimura Y, Tatefuji T, Hashimoto K (2015) *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of applied microbiology* 119 (3):818-826. doi:10.1111/jam.12889.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1.** Flowchart of the study design.

**Figure 2.** IgA levels (A) of Test and Control groups at baseline and at 30 and 90 postoperative days. Mean changes in IgA levels relative to baseline values obtained for the Test and Control groups are shown in (B).

**Figure 3** Relative frequency values for BD-3 and TLR4 immunolabeling scores for Test and Control groups at healthy and diseased sites at baseline and at 30 postoperative days, as well as within-group and between-group comparison results. \*Significant difference (Kruskal-Wallis, Dunn,  $p < 0.05$ ).

\*Significant difference when compared to Test baseline and Control baseline.

\*\*Significant difference when compared to Test baseline.

§Significant difference when compared to Control baseline.

¶Significant difference when compared to Test baseline.

#Significant difference when compared to Control 30 days.

**Figure 4.** Relative frequency values for CD-57 and CD-4 immunolabeling scores for Test and Control groups at healthy and diseased sites at baseline and at 30 postoperative days, as well as within-group and between-group comparison results. \*Significant difference (Kruskal-Wallis, Dunn,  $p < 0.05$ ).

\*Significant difference when compared to Test baseline and Control baseline.

#Significant difference when compared to Control 30 days.

**Figure 5.** Photomicrographs showing BD-3 (A-H) and TLR4 (I-P) immunolabeling in gingival biopsies at baseline (A, C, E, G, I, K, M, O) and 30 days (B, D, F, H, J, L, N, P) from healthy (A-D, I-L) and diseased (E-H, M-P) sites in Test (A, B, E, F, I, J, M, N) and Control (C, D, G, H, K, L, O, P) groups. Arrows = BD-3 and TLR4-positive cells; ep = Epithelial tissue; ct = Connective tissue. Scale = 25  $\mu$ m. Counterstaining: Hematoxylin.

**Figure 6.** Photomicrographs showing CD-57 (A-H) and CD-4 (I-P) immunolabeling in gingival biopsies (connective tissue) at baseline (A, C, E, G, I, K, M, O) and 30 days (B, D, F, H, J, L, N, P) from healthy (A-D, I-L) and diseased (E-H, M-P) sites in Test (A, B, E, F, I, J, M, N) and Control (C, D, G, H, K, L, O, P) groups. Arrows = CD-57 and CD-4 positive cells. Scale = 25  $\mu$ m. Counterstaining: Hematoxylin.

**Figure 7.** Growth inhibition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Fusobacterium nucleatum* (by *Bifidobacterium animalis subs. Lactis* HN019 (agar diffusion method. (A) The clear areas around the wells indicate zones of inhibition. (B) Means and standard deviations of the zone of inhibition observed in sensitivity of different periodontopathogens to *B. lactis* HN019.



CONSORT 2010 Flow Diagram

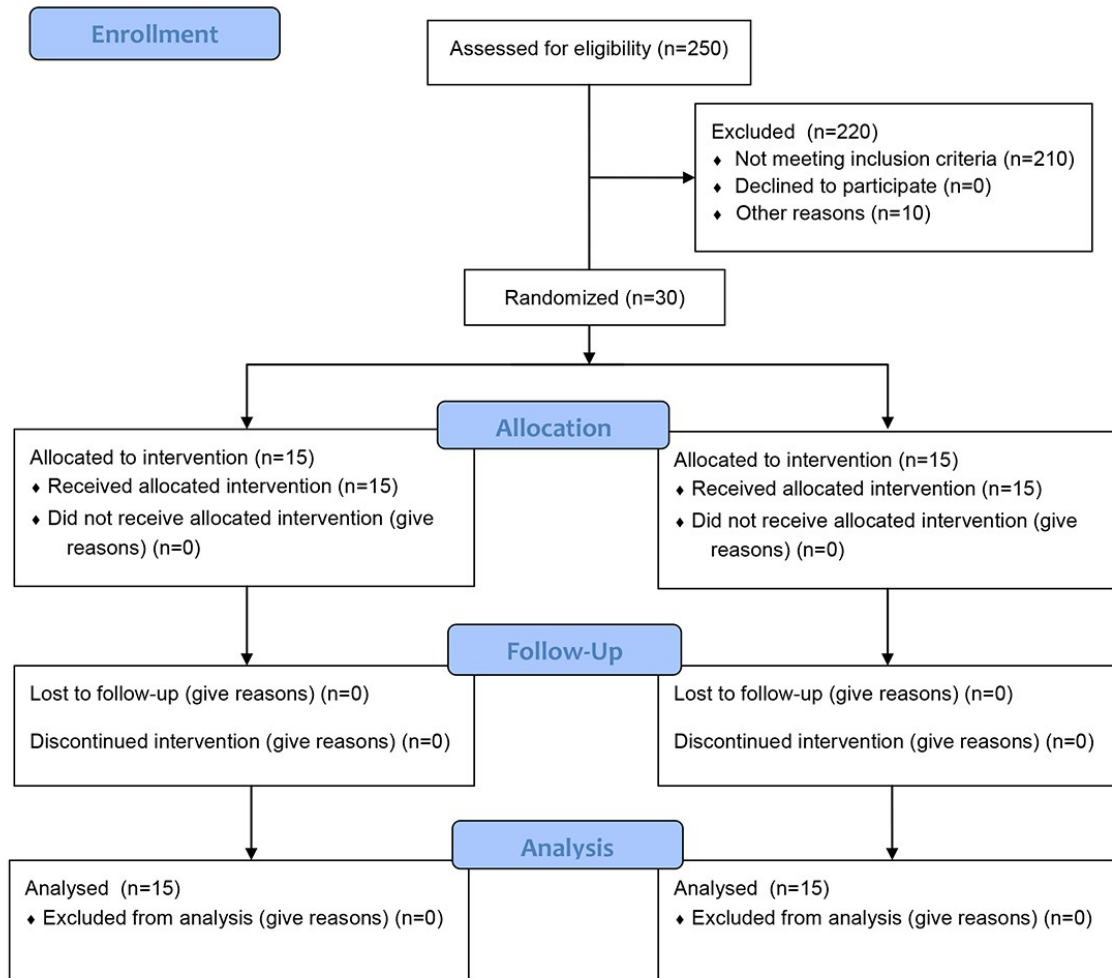


Figure 1

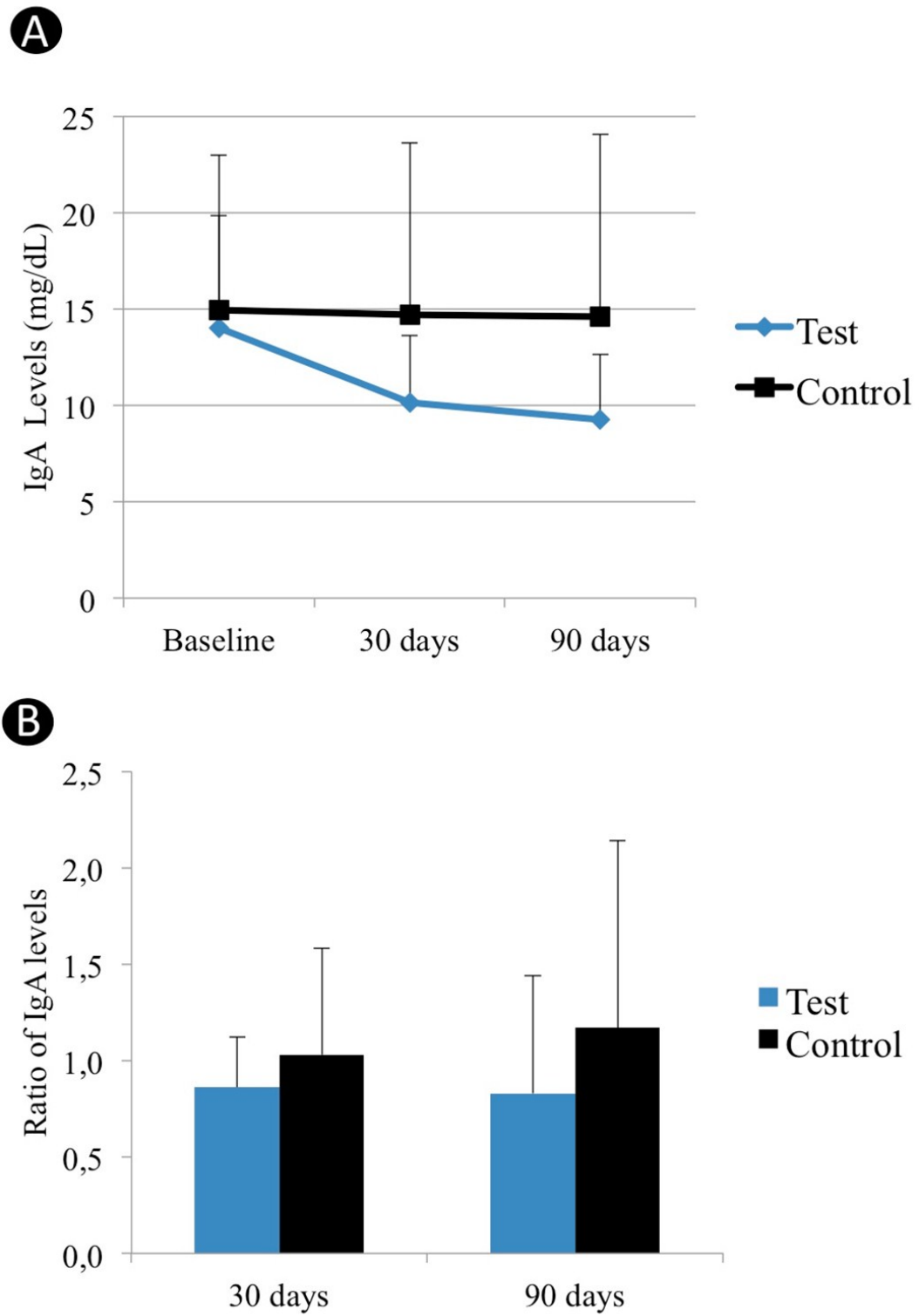


Figure 2

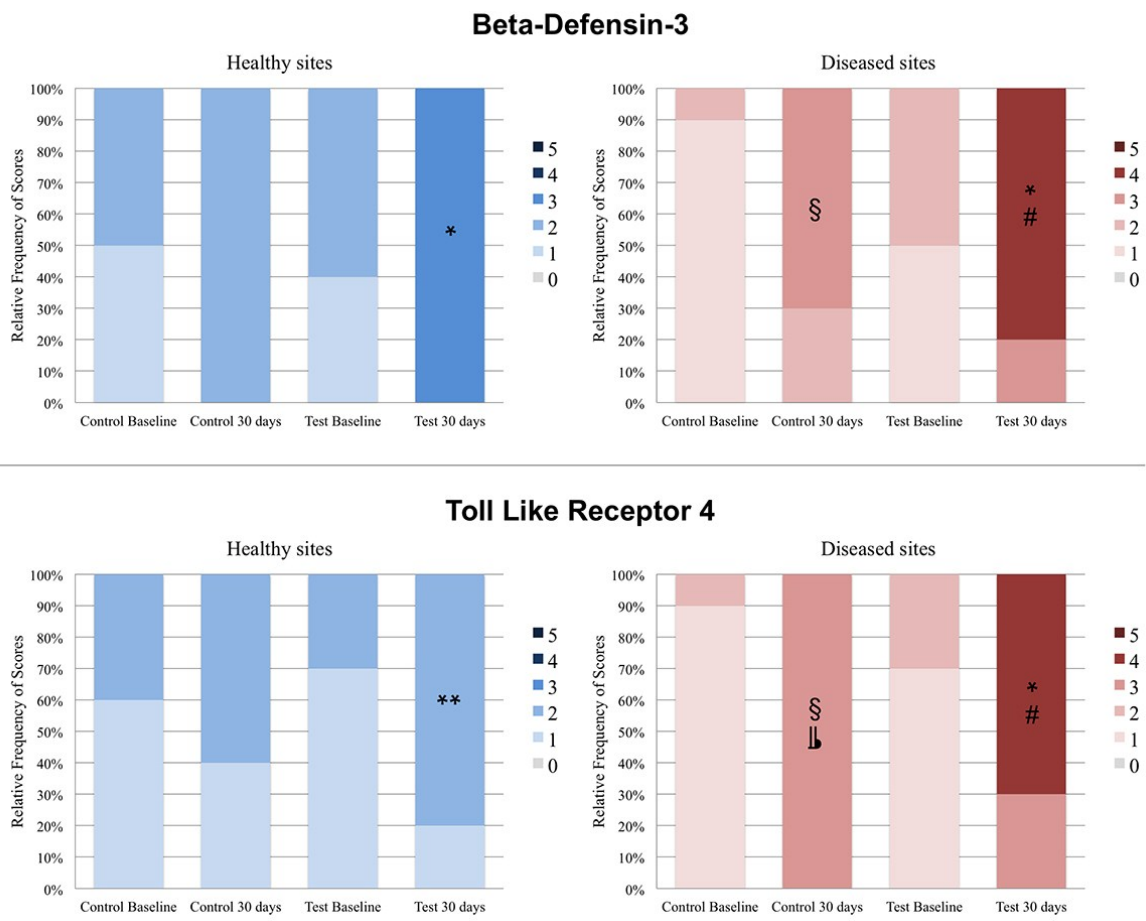
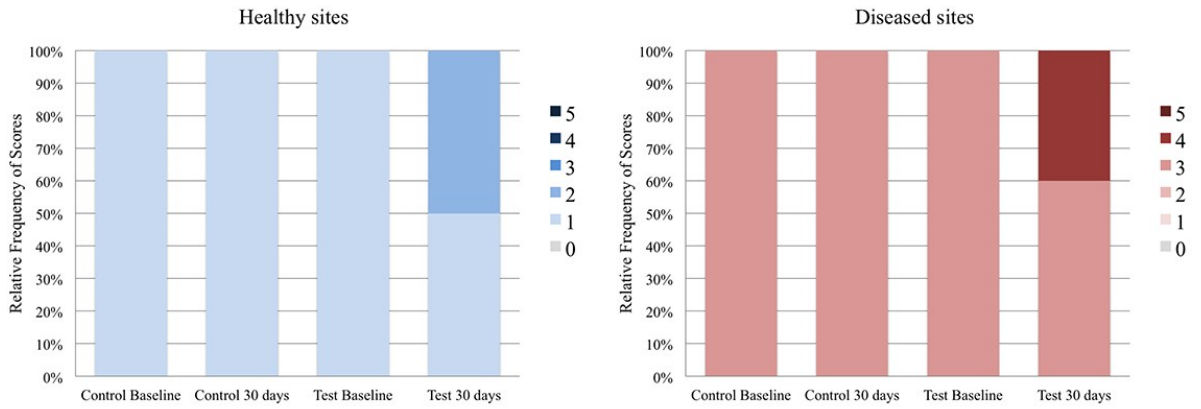
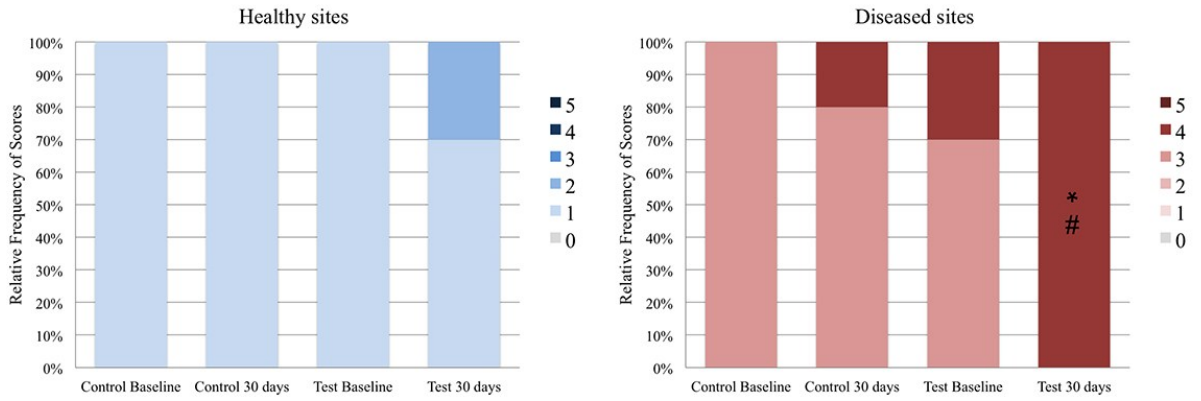


Figure 3

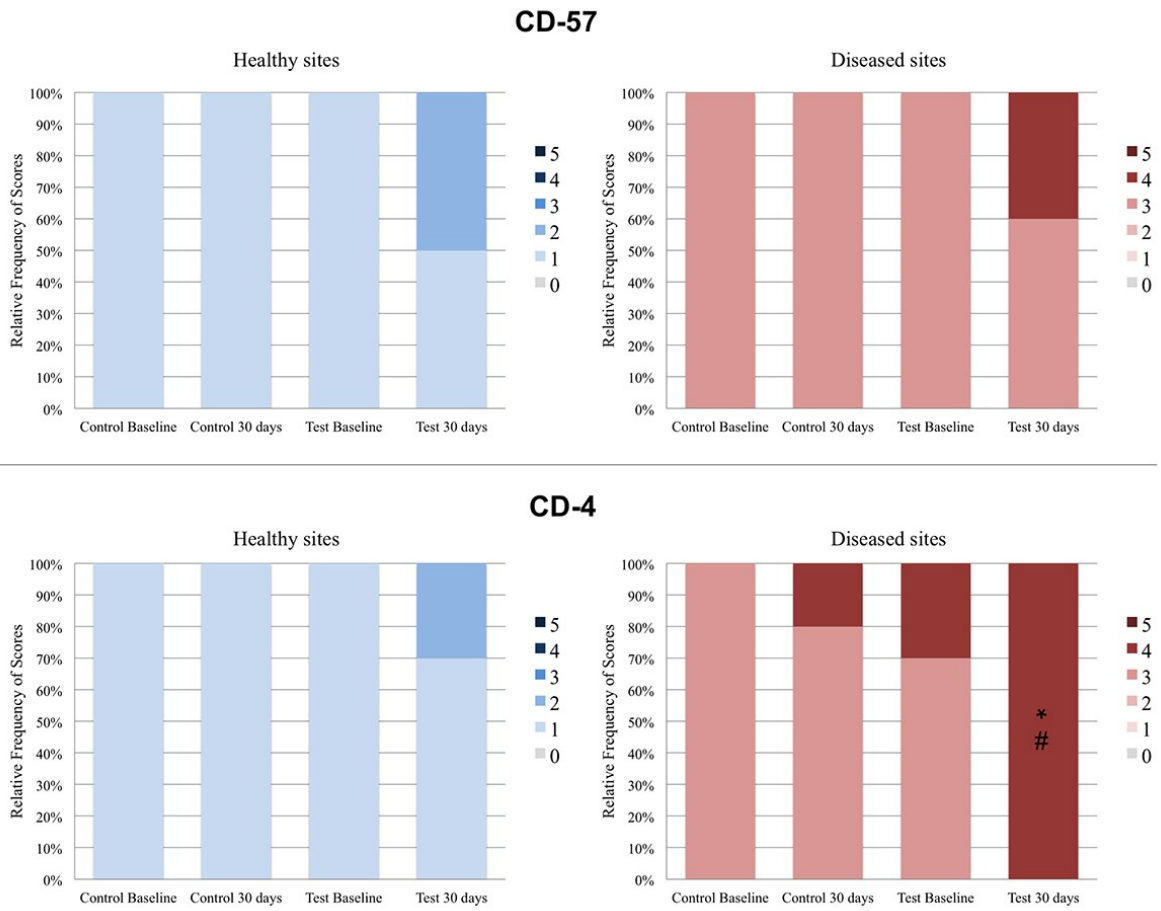
**CD-57**



**CD-4**



**Figure 3**



**Figure 4**



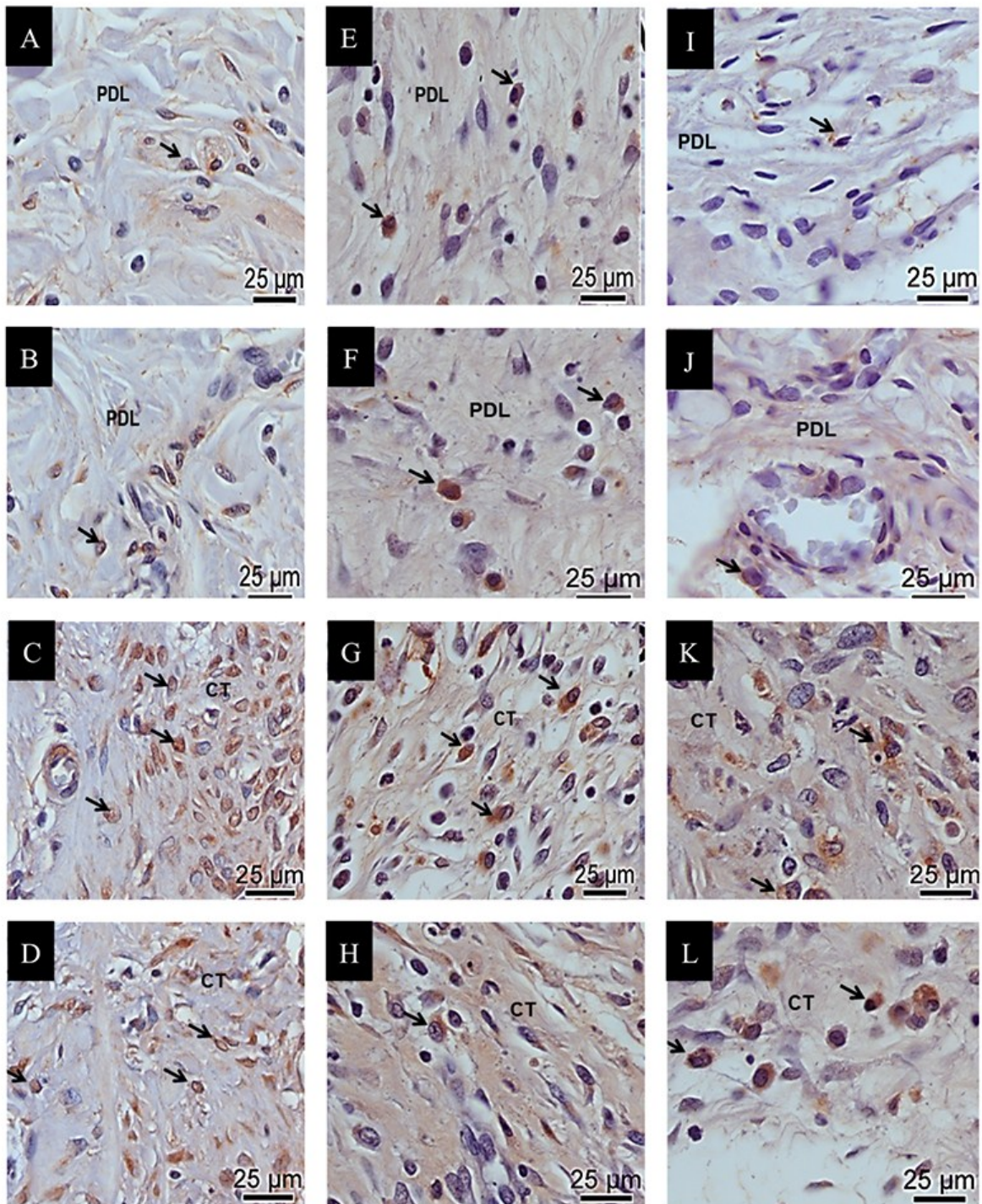


Figure 5

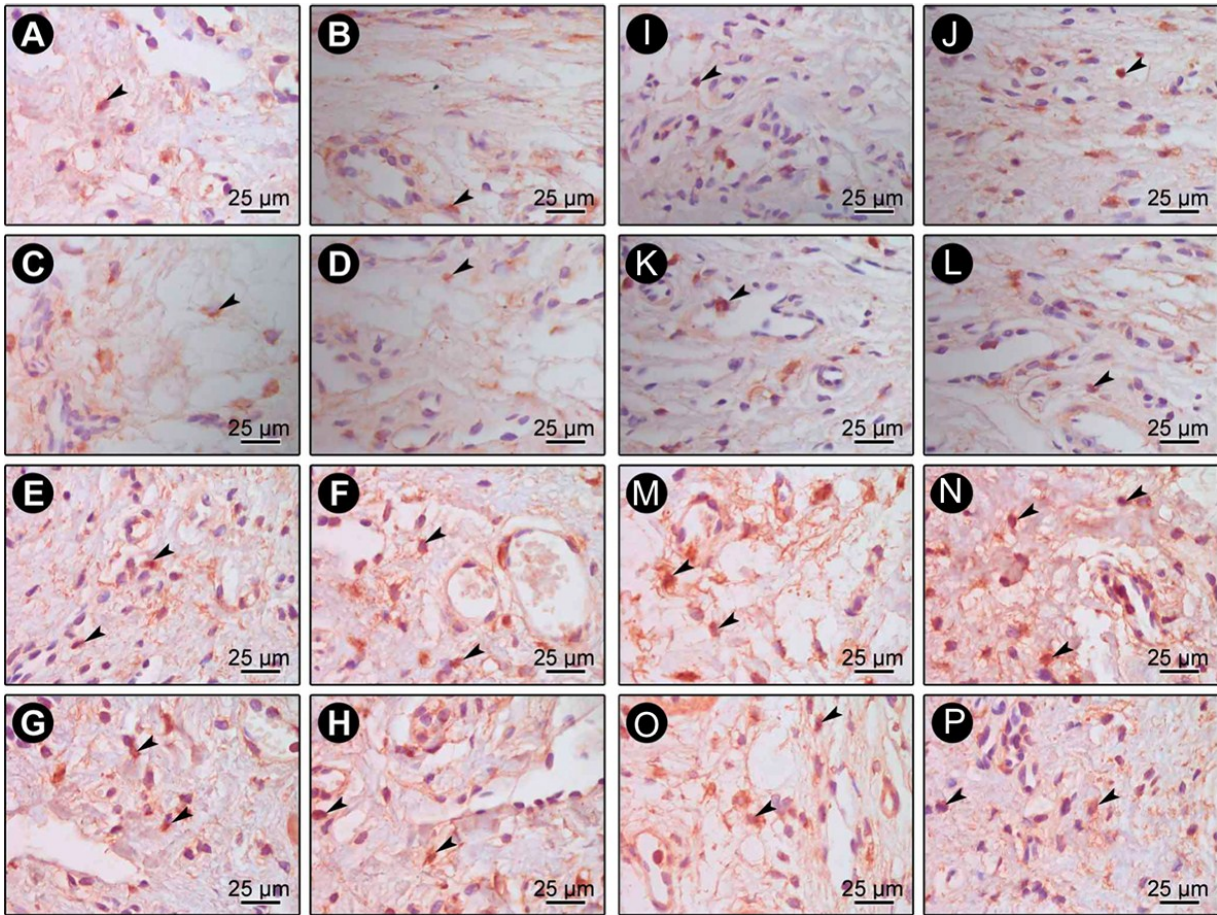
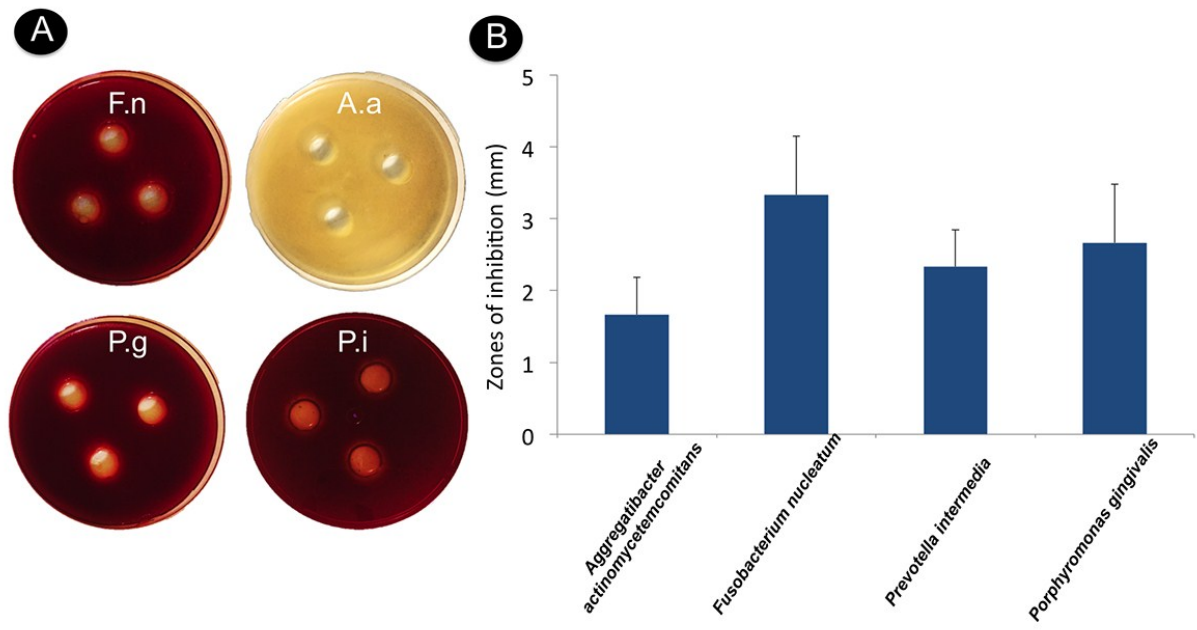


Figure 6



**Figure 7**