



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

RIBAMAR LAZANHA LUCATELI

Efeitos de duas cepas probióticas em ratas ovariectomizadas com e sem periodontite experimental: estudo microtomográfico, histomorfométrico, imunohistoquímico e imunoenzimático

RIBEIRÃO PRETO

2023

RIBAMAR LAZANHA LUCATELI

Efeitos de duas cepas probióticas em ratas ovariectomizadas com e sem periodontite experimental: estudo microtomográfico, histomorfométrico, imunohistoquímico e imunoenzimático

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

2023

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

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Lucateli, Ribamar Lazanha.

Efeitos de duas cepas probióticas em ratas ovariectomizadas com e sem periodontite experimental: estudo microtomográfico, histomorfométrico, imunohistoquímico e imunoenzimático./ Ribamar Lazanha Lucateli; orientador Michel Reis Messoria. - Ribeirão Preto, 2023.

105p. : il.

Tese (Doutorado)—Universidade de São Paulo, 2020.

1. Periodontite. 2. Osteoporose. 3. Probióticos. 4. Ratos

LUCATELI, R. L. Efeitos de duas cepas probióticas em ratas ovariectomizadas com e sem periodontite experimental: estudo microtomográfico, histomorfométrico, imunohistoquímico e imunoenzimático.

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

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista à **Deus**; minha Maior fonte de inspiração, com a certeza de que sempre existirá algo melhor reservado para quem tem “garra”. O SENHOR faz tudo ser possível, me torna forte o suficiente para viver e superar os maiores e infinitos desafios. Obrigado Senhor pela capacidade e oportunidade em dialogar contigo todos os dias, por sempre me ouvir e ser o “meu melhor porto seguro”! Obrigado Senhor, pela proteção, pelo entusiasmo “no viver”, por gozar de boa saúde, pelas lições de vida, por me dar o prazer em sorrir e fazer sorrir, pelo amparo nos momentos difíceis e nas angústias; por me agraciar com o impulso da conquistar e me aliviar no momento da perda. Obrigado Deus pelo maravilhoso “Dom da Vida!”

Dedico também:

À minha querida esposa **Marina Angélica Marciano da Silva**, obrigado por ser parte fundamental da minha vida, pela infinita paciência, pela admirável educação, pelo empenho e dedicação em sempre me ajudar, por ser meu verdadeiro “braço forte”, em todas as horas, por me trazer felicidade todos os dias, simplesmente pela sua presença, pelo doce som da sua voz que me acalma, enfim pelo seu imenso e verdadeiro Amor que alimenta e transborda em meu coração.

À minha família, em especial à minha mãe **Elizabeth Lazanha Lucateli** (Amor Incondicional), obrigado por me ensinar os primórdios da vida, por me incentivar diante dos desafios, por evidenciar o quão importante é o “ser forte”, por me ensinar princípios básicos e valores dos homens, enfim, sem a educação “do berço”, sem seu carinho e principalmente seu amor materno, nada seria possível. Te amo minha Mãe!

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à **Universidade de São Paulo (USP)**, na pessoa do seu atual Reitor, **Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior**.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP)**, na pessoa do seu atual Diretor, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho** e Vice-Diretor **Ricardo Gariba Silva**.

À **Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral**, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por meio de sua coordenadora, **Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado** e vice-coordenadora **Profa. Dra. Selma Siessere**.

Ao **Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucal-Maxilo-Facial e Periodontia** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por meio de sua chefe **Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto Bulle**.

Ao **Departamento de Biologia Básica e Oral** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por meio de sua chefe **Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco**.

Ao meu Grande Amigo e orientador **Prof. Dr. Michel Reis Messor**, amigo esse, que através dessa amizade verdadeira, desde os tempos de graduação, têm sido um sólido apoio no infinito aprendizado da Odontologia, fonte vasta de conhecimento, inspiração eminente, direção norteadora para o sucesso profissional, enfim um exemplo a ser seguido e praticado.

Aos demais Professores da disciplina de Periodontia e amigos **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**, **Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto**, **Profa. Dra. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto Messor**, **Prof. Dr. Mário Taba Júnior**, **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, por serem fonte de entusiasmo e por me fornecerem o conhecimento necessário para prática da excelência em Periodontia. Obrigado pelo tempo e paciência, pela dedicação, por se esforçarem na busca do melhor ensino sempre, por me permitirem realizar essa ilustre conquista louvável.

Aos **Prof. Dr. Sergio Luiz de Souza Salvador** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e **Profa. Dra. Selma Siessere** pelo apoio e parceria fundamentais ao estudo, e também pelas valorosas contribuições durante o exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Edilson Ervolino** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP) pela ajuda na realização da análise imunohistoquímica.

Ao **Prof. Dr. Haiter Francisco Neto** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) pela disponibilização do microtomógrafo para escaneamento das peças.

À técnica **Marina Del Arco**, do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, agradeço por toda ajuda no preparo e cultivo das cepas bacterianas, aos técnicos **Adriana Luisa Gonçalves de Almeida**, pela contribuição com as leituras microtomográficas; ao amigo **Luiz Gustavo de Sousa** do laboratório de anatomia, pela simpatia e disponibilidade no ensino e realização das ovariectomias, e não foram poucas; à técnica **Milla Sprone Tavares** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por todo auxílio na realização de etapas laboratoriais do estudo. A ajuda de vocês foi de grande importância.

A secretária da Pós-Graduação **Imaculada Jainaira Miguel**, pela simpatia e amizade além de toda atenção e ajuda burocrática expedida durante o cumprimento desse período de Doutorado.

A todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, que de uma forma contribuíram direta ou indiretamente, durante o período da execução do Doutorado.

Ao colega e Grande Amigo de Pós-Graduação **Pedro Henrique Felix Silva** pela incessante e dedicada ajuda em todas as etapas do meu estudo. Seu apoio foi essencial para o êxito deste trabalho, sem você nada seria possível, você nunca será esquecido.

Aos também colegas de Pós-Graduação **Cristhiam de Jesus Hernandez Martinez**, **Giselle Aparecida da Silva (in memoriam)**, **Luiz Fernando Ferreira de Oliveira** e **Natasha Malu Miranda da Costa**, pela ajuda durante as etapas cirúrgicas nos animais.

Ao colega **Thiago Bessa Marconato Antunes**, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pela ajuda durante a etapa de escaneamento em micro-CT.

E a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização do estudo e fizeram parte desta etapa da minha vida.

*“Nossa vida é feita da mesma substância
que os sonhos e, entre um sonho e outro
decorre nossa curta existência”*

Willian Shakespeare

RESUMO

LUCATELI, R. L. **Efeitos de duas cepas probióticas em ratas ovariectomizadas com e sem periodontite experimental: estudo microtomográfico, histomorfométrico, imunohistoquímico e imunoenzimático:** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Biologia Oral).

O aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias é um fator importante na patogênese e progressão da doença periodontal e da osteoporose. A modulação da expressão de marcadores do tecido ósseo e de permeabilidade intestinal por meio de probióticos pode ser uma potencial alternativa de tratamento quando ambas as condições estão associadas. O propósito deste estudo foi avaliar o efeito de dois agentes probióticos, *Bifidobacterium animalis subs. Lactis* HN019 (HN019) e *Lactocaseibacillus casei* 01 (LC01) em ratas ovariectomizadas (OVX) com e sem doença periodontal (DP) induzida por ligadura. Foram utilizadas 66 ratas divididas em 6 grupos (n=11): C-OVX (controle), C-OVX-HN019 (controle, com probiótico HN019), C-OVX-LC01 (controle, com probiótico LC01), DP-OVX (doença periodontal) e DP-OVX-HN019 (doença periodontal, com HN019), DP-OVX-LC01 (doença periodontal, com LC01). No dia 0 do experimento, todos os animais foram submetidos à OVX. Após 8 semanas, os animais dos grupos HN019 e LC01 receberam administração sistêmica da cepa probiótica (*B. lactis* HN019 ou *L. casei* 01), durante 8 semanas. 14 semanas após o início do experimento, foi induzida DP nos animais dos grupos DP-OVX, DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01. Estes animais também receberam administrações tópicas da terapia probiótica no dia de colocação das ligaduras, e aos 3 e 7 dias após. Os animais foram eutanasiados 16 semanas após o início do experimento. Nos tecidos periodontais foram analisados a perda óssea e de inserção conjuntiva por meio de micro-CT e histomorfometria, e marcadores de metabolismo ósseo (fosfatase ácida resistente ao tartarato - TRAP, osteoprotegerina - OPG e ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa B - RANKL), por imunohistoquímica. Nos tecidos intestinais foram analisadas as alturas de vilosidade e profundidades de cripta, por meio de histomorfometria, e a expressão de marcadores de permeabilidade intestinal (E-caderina e Claudina-1), por imunohistoquímica. Os níveis de estradiol foram avaliados por meio de ensaio imunoenzimático. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). O grupo DP-OVX apresentou maior perda de osso alveolar, maiores razões RANKL/OPG, maior expressão de TRAP e menores níveis de estradiol quando comparado ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Considerando os grupos com DP e tratados com probióticos, apenas o grupo DP-OVX-LC01 apresentou maior área e volume de osso nas análises microtomográficas e histométricas quando comparado ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). Na análise de parâmetros que refletem a qualidade da microarquitetura óssea (análise microtomográfica), os grupos DP-OVX-LC01 e DP-OVX-HN019 demonstraram menor espaçamento de trabéculas ósseas, maior número de trabéculas ósseas e maior densidade de conectividade óssea quando comparados ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). O grupo DP-OVX-LC01 apresentou menor

porosidade óssea quando comparado ao grupo DP-OVX-HN019 ($p < 0,05$). Uma menor expressão de TRAP e da razão RANKL/OPG, bem como maiores expressão de E-caderina e Claudina-1 e maiores níveis de estradiol foram observados nos grupos DP-OVX-LC01 e DP-OVX-HN019 quando comparados ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). No ambiente intestinal, considerando os grupos com DP e tratados com probióticos, apenas o grupo DP-OVX-LC01 demonstrou maior altura de vilosidades quando comparado ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). Um efeito da terapia probiótica foi também observado nos grupos sem DP. Apenas o grupo C-OVX-LC01 apresentou maior quantidade e melhor qualidade ósseas (análises microtomográficas), bem como maior expressão de OPG nos tecidos periodontais e maior profundidade de criptas e altura de vilosidades intestinais quando comparado ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Ambos os grupos C-OVX-LC01 e C-OVX-HN019 apresentaram menores níveis de estradiol no soro e maior expressão de E-caderina e Claudina-1 nos tecidos intestinais quando comparados ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que: i) a terapia probiótica aumentou os níveis de estradiol e reduziu a permeabilidade intestinal em ratas ovariectomizadas e seus efeitos no osso alveolar e na morfologia intestinal foram cepa dependentes; ii) a cepa probiótica *Lactobacillus casei* 01 foi mais efetiva que a cepa probiótica *Bifidobacterium animalis subs. Lactis* HN019 para a redução da destruição de osso alveolar decorrente da doença periodontal experimental em ratas ovariectomizadas.

Palavras-chave: Periodontite; Osteoporose; Probióticos; Ratos.

ABSTRACT

LUCATELI, R. L. **Effects of two probiotic strains in ovariectomized rats with and without experimental periodontitis: a microtomographic, histomorphometric, immunohistochemical, and immunoenzymatic study:** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Biologia Oral).

The increased production of pro-inflammatory cytokines is an important factor in the pathogenesis and progression of periodontal disease and osteoporosis. Modulation of the expression of markers on bone tissue and intestinal permeability using probiotics may be a potential treatment alternative when both conditions are associated. The purpose of this study was to evaluate the effect of two probiotic agents, *Bifidobacterium animalis subs. lactis* HN019 (HN019) and *Lactocaseibacillus casei* 01 (LC01) in ovariectomized (OVX) rats with ligature-induced periodontitis. Sixty-six female rats were divided into 6 groups (n=11): C-OVX (control, without probiotic), C-OVX-HN019 (control, with probiotic *B. lactis* HN019), C-OVX-LC01 (control, with probiotic LC01), DP-OVX (periodontal disease) and DP-OVX-HN019 (periodontal disease, with HN019), DP-OVX-LC01 (periodontal disease, with probiotic LC01). On day 0 of the experiment, all animals were submitted to OVX. After 8 weeks, the animals in the HN019 and LC01 groups received systemic administration of the probiotic strain (*B. lactis* HN019 or *L. casei* 01) for 8 weeks. 14 weeks after the beginning of the experiment, the periodontitis was induced in the animals of the DP-OVX, DP-OVX-HN019 and DP-OVX-LC01 groups, using ligatures around the lower first molars. These animals also received topical administrations of probiotic therapy on the day of placement of the ligatures, as well as at 3 and 7 days after. All animals were euthanized 16 weeks after the beginning of the experiment. In periodontal tissues, the bone loss and interproximal attachment loss was assessed using micro-CT, histomorphometric analysis, and determination of bone metabolism markers (tartrate-resistant acid phosphatase - TRAP, osteoprotegerin - OPG and nuclear factor kappa B activator receptor ligand - RANKL) by immunohistochemistry. In intestinal tissues, the villous height and crypt depth were measured using histomorphometry and the expression of intestinal permeability markers (E-cadherin and Claudin-1), using immunohistochemistry. Estradiol levels were evaluated using an immunoenzymatic assay. The data obtained were submitted to statistical analysis ($p < 0.05$). The DP-OVX group showed increased alveolar bone loss, higher RANKL/OPG ratios, increased TRAP expression, and lower estradiol levels compared to the C-OVX group ($p < 0.05$). Among the DP groups treated with probiotics, only the DP-OVX-LC01 group exhibited greater area and volume of bone in microtomographic and histometric analyses compared to the DP-OVX group ($p < 0.05$). In the analysis of parameters reflecting the quality of bone microarchitecture (microtomographic analysis), both the DP-OVX-LC01 and DP-OVX-HN019 groups demonstrated reduced trabecular spacing, increased number of trabeculae, and higher bone connectivity density compared to the DP-OVX group ($p < 0.05$). The DP-OVX-LC01 group exhibited lower bone porosity compared to the DP-OVX-HN019 group ($p <$

0.05). Lower TRAP expression and RANKL/OPG ratio, as well as higher expression of E-cadherin and Claudin-1 and higher estradiol levels, were observed in the DP-OVX-LC01 and DP-OVX-HN019 groups compared to the DP-OVX group ($p < 0.05$). In the intestinal environment, considering the DP groups treated with probiotics, only the DP-OVX-LC01 group demonstrated greater villous height compared to the DP-OVX group ($p < 0.05$). A probiotic therapy effect was also observed in the non-DP groups. Only the C-OVX-LC01 group showed greater quantity and better quality of bone (microtomographic analyses), as well as higher expression of OPG in periodontal tissues and greater depth of crypts and height of intestinal villi compared to the C-OVX group ($p < 0.05$). Both the C-OVX-LC01 and C-OVX-HN019 groups exhibited lower serum estradiol levels and higher expression of E-cadherin and Claudin-1 in intestinal tissues compared to the C-OVX group ($p < 0.05$). Within the limits of this study, it can be concluded that: i) probiotic therapy increased estradiol levels and reduced intestinal permeability in ovariectomized rats, and its effects on alveolar bone and intestinal morphology were strain-dependent; ii) the probiotic strain *Lacticaseibacillus casei* 01 was more effective than the probiotic strain *Bifidobacterium animalis subs. lactis* HN019 in reducing alveolar bone destruction resulting from experimental periodontal disease in ovariectomized rats.

Keywords: Periodontitis, Osteoporosis, Probiotics, Rats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Delineamento experimental do estudo. Fonte: Autoral. Imagem criada com software online BioRender38
- Figura 2** - (A) Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais dorsais, antissepsia com álcool iodado e incisão na região entre a última costela e o joelho, correspondente a localização dos ovários. (B) Após a realização das incisões, o tecido muscular foi divulsionado e os ovários direito e esquerdo foram expostos para excisão39
- Figura 3** - (A) *B. lactis* HN019 cultivado em meio MRS Agar. (B) As placas foram mantidas por 48 horas a 37°C sob condições de anaerobiose41
- Figura 4** - (A) Os animais foram apoiados em um suporte para manutenção da abertura bucal durante o procedimento de inserção das ligaduras. (B) A indução da doença periodontal foi realizada por meio de colocação de fio de sutura seda 4-0 ao redor dos primeiros molares inferiores42
- Figura 5** - Mensuração do nível ósseo alveolar (linhas vermelhas) nas regiões vestibular/lingual (A) e interproximal (B) e dos parâmetros volumétricos na região de bifurcação (C). Um retângulo tangenciando todas as raízes do 1º molar inferior (C) foi interpolado na região de bifurcação para a realização de mensurações volumétricas44
- Figura 6** - (A) Mensuração da área de perda óssea na região de bifurcação do 1º molar inferior. Foi delimitada a área entre o teto da bifurcação até a crista óssea (linha amarela apontada com a seta na imagem à esquerda). (B) Mensuração da perda de inserção interproximal, mensurada na região entre o 1º e 2º molares inferiores. Foi traçada uma linha entre a junção cimento-esmalte e a inserção conjuntiva (linha amarela apontada com a seta na imagem à direita). Todas as mensurações foram realizadas com o software ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, EUA).46
- Figura 7** - Imagem representativa de uma amostra intestinal do grupo C-OVX-HN019. Foram mensurados, em milímetros, as medidas da altura de vilosidade (indicado na imagem com a seta preta) e a profundidade das criptas de Lieberkühn (indicado na imagem com a seta branca), sendo mensuradas 10 vilosidades e 10 criptas por lâmina. As imagens foram analisadas por meio do software ImageLab 2000 (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil). Coloração Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento 20x47
- Figura 8** - Médias e desvio-padrão da perda óssea alveolar (POA), em micrômetros (µm), para os grupos avaliados53
-
-

Figura 9	-	Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais dos grupos C-OVX (A, B), C-OVX-HN019 (C, D), C-OVX-LC01 (E, F), DP-OVX (G, H), DP-OVX-HN019 (I, J) e DP-OVX-LC01 (K, L). Vista da superfície vestibular externa (A, C, E, G, I e K). Secção sagital da superfície interna (B, D, F, H, J e L). Imagens obtidas por meio do software CTVOx (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do pixel = 7,96 µm. Fonte: Autoral.....	54
Figura 10	-	Médias e desvio-padrão da porcentagem de volume ósseo (BV/TV) para os grupos avaliados	55
Figura 11	-	Médias e desvio-padrão dos dados de porosidade óssea total (Po.Tot) dos grupos avaliados	56
Figura 12	-	Médias e desvio-padrão do número de trabéculas ósseas (Tb.N), em mm ⁻¹ , entre os grupos experimentais	57
Figura 13	-	Médias e desvio padrão do espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), em mm ⁻¹ , para os grupos avaliados.....	58
Figura 14	-	Médias e desvio padrão dos dados de espessura trabecular (Tb.Sp), em mm ⁻¹ , para os grupos experimentais	59
Figura 15	-	Médias e desvio padrão dos dados de densidade de conectividade (Conn.Dn), em 1/mm ³ , para os grupos avaliados	60
Figura 16	-	(A) Médias e desvio-padrão da área de perda óssea, em micrômetros (µm ²), na região de bifurcação dos primeiros molares; (B) Médias e desvio-padrão da perda de inserção conjuntiva, em micrômetros (µm), na região interproximal entre o primeiro e segundo molares	61
Figura 17	-	Tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º molar inferior dos grupos C-OVX (A, B, C), C-OVX-HN019 (D, E, F), C-OVX-LC01 (G, H, I), DP-OVX (J, K, L), DP-OVX-HN019 (M, N, O) e DP-OVX-LC01 (P, Q, R)....	63
Figura 18	-	Tecidos periodontais da região interproximal entre o 1º e 2º molar inferior dos animais dos grupos C-OVX (A), C-OVX-HN019 (B), C-OVX-LC01 (C), DP-OVX (D), DP-OVX-HN019 (E) e DP-OVX-LC01 (F)	64
Figura 19	-	Médias e desvio-padrão da (A) altura de vilosidade no intestino delgado, em milímetros; (B) profundidade de cripta, em milímetros no intestino delgado	65
Figura 20	-	Tecidos intestinais da região do jejuno dos animais.....	66
Figura 21	-	Médias e desvio-padrão dos escores para imunomarcção de (A) RANKL, (B) OPG, (C) RANKL/OPG e (D) TRAP.....	68
Figura 22	-	Padrão de imunomarcção para RANKL na região de bifurcação do primeiro molar	69

Figura 23 - Padrão de imunomarcção para OPG na região de bifurcação do primeiro molar	70
Figura 24 - Padrão de imunomarcção para TRAP na região de bifurcação do primeiro molar.	71
Figura 25 - Médias e desvio-padrão dos escores para imunomarcção de (A) E-caderina e (B) Claudina-1.....	72
Figura 26 - Padrão de imunomarcção para E-caderina no intestino	73
Figura 27 - Padrão de imunomarcção para Claudina-1 no intestino	74
Figura 28 - Médias e desvio-padrão dos níveis sanguíneos de estradiol (pg/mL).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de acordo com os procedimentos realizados.....40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	Interação entre microbiota e hospedeiro.....	17
1.2	Associação entre doença periodontal e osteoporose.....	18
1.3	Probióticos como modalidade terapêutica para a doença periodontal e a osteoporose.....	21
1.4	<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i> HN019 e <i>Lacticaseibacillus casei</i>	24
2	PROPOSIÇÃO	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	Cálculo amostral e apreciação ética.....	37
3.2	Delineamento experimental	37
3.3	Ovariectomia (OVX)	38
3.4	Exame do ciclo estral.....	39
3.5	Distribuição dos grupos experimentais.....	40
3.6	Preparo das culturas probióticas e administração aos animais de forma tópica e sistêmica.....	40
3.7	Indução da doença periodontal experimental com ligadura.....	42
3.8	Eutanásia e coleta dos tecidos para as análises	43
3.9	Avaliação óssea alveolar com microtomografia computadorizada (micro-CT)	43
3.10	Análise histomorfométrica e histopatológica dos tecidos periodontais.....	45
3.11	Análise histomorfométrica e histopatológica dos tecidos intestinais	46
3.12	Análise imunohistoquímica dos tecidos periodontais e intestinais	47
3.13	Análise imunoenzimática (ELISA) da concentração sanguínea de estradiol	49
3.14	Análise estatística dos dados obtidos.....	50
4	RESULTADOS	53
4.1	Exame do Ciclo Estral	53
4.2	Avaliação óssea alveolar em microtomografia computadorizada (micro-CT)	53
4.3	Análise histomorfométrica e histopatológica dos tecidos periodontais.....	60

4.4	Análise histomorfométrica e histopatológica dos tecidos intestinais	64
4.5	Análise imunohistoquímica dos tecidos periodontais	67
4.6	Análise imunohistoquímica para E-caderina e Claudina-1 no intestino.....	72
4.7	Análise imunoenzimática (ELISA) da concentração sanguínea de estradiol	75
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXO	105

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Interação entre microbiota e hospedeiro

A cavidade bucal é colonizada por complexas comunidades polimicrobianas que interagem entre si e com o hospedeiro (LAMONT; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018). Em condições de saúde, essas populações microbianas coexistem em harmonia. A destruição dos tecidos periodontais é iniciada quando há um desequilíbrio na microbiota (MARSH; ZAURA, 2017). Vários processos estão associados à transição de uma microbiota a um estado de disbiose, dentre eles o acúmulo de biofilme bacteriano, as alterações no sistema imune do hospedeiro e a dieta (CURTIS; DIAZ; VAN DYKE, 2020; HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2012). À medida que uma comunidade se desenvolve, os subprodutos do metabolismo microbiano e da resposta imune do hospedeiro podem causar mudanças no ambiente local, que facilitam o crescimento ou a proeminência de microrganismos associados com um estado disbiótico (LAMONT; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018). Este conceito foi resumido na hipótese da placa ecológica proposta por MARSH em 1994, na qual a seleção de bactérias patogênicas está diretamente associada a alterações no ambiente.

Embora o microbioma disbiótico da periodontite envolva diferentes patógenos como o *Streptococcus gordonii*, *Prevotella intermedia*, e *Fusobacterium nucleatum* (SOCRANSKY *et al.*, 1998), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) tem sido considerado um patógeno-chave no processo (KUBONIWA *et al.*, 2017; MYSAK *et al.*, 2014; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). O *P. gingivalis* altera o ecossistema subgingival e evade o sistema imunológico (CHOPRA; BHAT; SIVARAMAN, 2020). Este patógeno é capaz de beneficiar toda a comunidade microbiana, prejudicando a atividade dos leucócitos e promovendo respostas inflamatórias no hospedeiro (MAEKAWA; HAJISHENGALLIS, 2014; MAKKAWI *et al.*, 2017).

O sistema de defesa imune inato é altamente ativo em tecidos saudáveis e o desequilíbrio na expressão de mediadores inflamatórios como a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e prostaglandina E2 (PGE2), contribui significativamente para a destruição dos tecidos periodontais. O aumento na expressão desses mediadores inflamatórios afeta a expressão do ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa-B (RANK-L) e osteoprotegerina (OPG), os quais estão envolvidos nos processos de reabsorção e aposição ósseas (COCHRAN, 2008; PAGE, 1991). Alguns microrganismos se beneficiam de substratos proteicos derivados da degradação do tecido inflamatório e, dessa forma, a

inflamação e a disbiose reforçam-se mutuamente, e as crescentes mudanças ambientais selecionam ainda mais a comunidade patogênica (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2014). Portanto, tem sido considerado que o principal componente de destruição de tecidos duros e moles na doença periodontal não são os patógenos em si, mas o resultado da ativação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro que estes promovem (SALVI; LANG, 2005).

1.2 Associação entre doença periodontal e osteoporose

A doença periodontal, por ser uma patologia polimicrobiana inflamatória disbiótica, tem sido apontada como fator de risco para a osteoporose (ANBINDER *et al.*, 2016; CARRIZALES-SEPÚLVEDA *et al.*, 2018; HAJISHENGALLIS; CHAVAKIS, 2021; MAU *et al.*, 2017). No sentido contrário, a literatura tem sugerido também que a osteoporose pode acentuar a resposta inflamatória decorrente da agressão bacteriana e, eventualmente, a susceptibilidade à doença periodontal (KINANE; PETERSON; STATHOPOULOU, 2006; PASSOS *et al.*, 2013; SALVI; LANG, 2005; VON WOWERN; KLAUSEN; KOLLERUP, 1994). Em 1994, Von Wowern, Klausen e Kollerup observaram uma significativa perda de inserção em indivíduos com osteoporose em comparação com indivíduos sem a doença sistêmica, indicando que a osteoporose pode participar na progressão da doença periodontal. Em 2017, Mau *et al.* realizaram um extenso estudo clínico no qual foi investigada a associação entre a doença periodontal e a osteoporose por um período de 6 anos. Este estudo avaliou uma amostra bastante significativa, composta por 1 milhão de indivíduos, e evidenciou um maior risco de desenvolvimento da osteoporose em indivíduos portadores de doença periodontal.

A idade é um fator que, indiretamente, influencia a progressão das duas doenças, especialmente nas mulheres. Na menopausa, ocorrem diversas alterações hormonais, como a diminuição nos níveis de estrógeno (KINANE; PETERSON; STATHOPOULOU, 2006; PERSSON, 2018). O estrógeno é fundamental para a homeostase esquelética e regula a remodelação óssea (RAISZ, 2005). Um dos mais importantes mediadores da ação do estrogênio no osso é o sistema osteoprotegerina (OPG)/ RANKL. O RANKL é uma citocina essencial para a diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos (HSU *et al.*, 1999; KONG *et al.*, 1999; LACEY *et al.*, 1998). O RANKL é produzido por uma variedade de células, como linfócitos T e linfócitos B (KONG *et al.*, 1999). A OPG é um receptor chamariz solúvel para RANKL que se liga a RANKL e, assim, inibe a osteoclastogênese (SIMONET *et al.*, 1997). O RANKL atua através do receptor ativador de fator nuclear kappa-B (RANK) que é expresso na membrana celular dos osteoclastos e células precursoras dos osteoclastos (LI *et al.*, 2000).

Portanto, RANKL, RANK e OPG são fatores essenciais e não redundantes para a biologia dos osteoclastos (STREICHER *et al.*, 2017). Estudos mostram que camundongos deficientes em RANK ou RANKL não possuem osteoclastos, levando à osteopetrose, enquanto camundongos deficientes em OPG exibem reabsorção óssea excessiva e osteoporose grave (BUWAY *et al.*, 1998; KONG *et al.*, 1999; STREICHER *et al.*, 2017).

A literatura demonstra amplamente a associação entre a doença periodontal e a osteoporose em mulheres pós-menopausa (ANBINDER *et al.*, 2016; GOMES-FILHO *et al.*, 2007; LAMONTE *et al.*, 2013; LEE, 2022; LIN *et al.*, 2015; MASHALKAR *et al.*, 2018; PASSOS *et al.*, 2013; YU; WANG, 2022; WACTAWSKI-WENDE, 2001). Estudos pré-clínicos frequentemente utilizam o modelo experimental animal de ovariectomia para a indução da osteoporose, sendo um modelo de estudo largamente aceito na literatura (COMELEKOGU *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 1994; OMI; EZAWA, 1995). A indução da doença periodontal em animais tem sido preconizada por meio do uso de ligaduras ao redor dos molares inferiores (DAL ACQUA *et al.*, 2022; DE MOLON *et al.*, 2018; JOHNSON, 1975; LIN *et al.*, 2021). Em 2016, Anbinder *et al.*, avaliaram os efeitos da periodontite experimental na perda óssea sistêmica e a influência da deficiência de estrógeno nesse contexto, utilizando um modelo de doença induzida em camundongo. A periodontite experimental foi induzida pela inserção de ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores e infecção por *P. gingivalis*. Já a deficiência de estrógeno foi induzida por meio da ovariectomia. Análises microtomográficas realizadas 48 dias após a infecção revelaram que a doença periodontal combinada com a deficiência de estrógeno resultou em perda óssea femoral e mandibular significativas em comparação com os grupos nos quais apenas a doença periodontal foi induzida e no grupo no qual apenas a deficiência de estrógeno foi induzida. Assim, os resultados sugeriram que, diante da deficiência de estrógeno, a doença periodontal pode ser um fator potencializador da perda óssea sistêmica.

Estudos clínicos também demonstram a associação entre as duas patologias em mulheres no período pós-menopausa (HILDEBOLT *et al.*, 2002; STRECKFUS *et al.*, 1997). Correlações positivas foram observadas entre a perda óssea alveolar e a redução na densidade mineral óssea (DMO). Em 2000, um amplo estudo transversal de Jeffcoat *et al.* envolvendo 468 mulheres na pós-menopausa indicou que a perda da altura da crista alveolar é 230% maior para mulheres com osteoporose em comparação com mulheres sem a doença. Foi observada uma maior perda óssea nas mulheres com idade acima de 70 anos. Houve também um aumento de mais de 3 vezes nas chances de redução na altura da crista alveolar em indivíduos com osteoporose.

A microbiota intestinal e a sua influência bastante significativa no metabolismo ósseo têm sido alvo de estudos para a compreensão do mecanismo da associação entre a doença periodontal e a osteoporose. Em 2015, Ohlsson e Sjögren introduziram o termo “osteomicrobiologia”, referindo-se ao reconhecimento de que tanto o sistema imunológico quanto o microbiota são críticos para a regulação do desenvolvimento esquelético pós-natal, o envelhecimento ósseo e a perda óssea sistêmica patológica (HSU; PACIFICI, 2018). A noção de que a microbiota intestinal desempenha um papel crítico no crescimento ósseo foi reportada pela primeira vez em 2012 por Sjögren *et al.* Os autores demonstraram que, camundongos livres de microbiota (*germ-free*), apresentavam um aumento da massa óssea associado a um número reduzido de osteoclastos, em comparação com os animais convencionais. Quando havia a colonização dos camundongos *germ-free* com uma microbiota intestinal compatível com a normalidade, havia uma normalização na massa óssea, sugerindo que a microbiota intestinal exerce um papel na regulação do metabolismo ósseo. Os resultados foram reforçados por estudos envolvendo o uso de antibióticos em camundongos (COX *et al.*, 2014; NOBEL *et al.*, 2015). Estes estudos demonstram claramente que o tratamento com antibiótico influencia a densidade óssea. Os antibióticos diminuem o número de bactérias e/ou alteram a diversidade da taxa microbiana dentro do lúmen intestinal, e assim influenciam no metabolismo ósseo (HSU; PACIFICI, 2018).

Alguns autores sugerem que as bolsas periodontais possam atuar como reservatórios de patógenos microbianos e seus produtos, bem como mediadores e imunocomplexos que podem disseminar para outros locais do corpo humano, incluindo o intestino (BECK *et al.*, 2019; GENCO; SANZ, 2020; HAJISHENGALLIS, 2022; KUMAR, 2017; WILLIAMS; OFFENBACHER, 2020). A disbiose na microbiota oral pode causar um desequilíbrio na microbiota em outros locais do corpo, como o intestino, e desencadear respostas imunológicas que se refletem sistemicamente (KITAMOTO; KAMADA, 2022). Bao *et al.*, (2022) demonstraram que a doença periodontal induz a disbiose na microbiota intestinal por meio do fluxo salivar. Os autores observaram uma diminuição na profundidade das criptas da barreira intestinal e na expressão de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10). Por outro lado, houve um aumento significativo na expressão de proteínas de junção como as claudinas e fatores pró-inflamatórios como a interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6).

A permeabilidade intestinal também é considerada fundamental no contexto do metabolismo ósseo, uma vez que citocinas osteoclastogênicas produzidas por células imunes no intestino podem sistemicamente influenciar a densidade óssea (HSU; PACIFICI, 2018). A depressão de estrógeno faz aumentar a permeabilidade intestinal, levando ao aumento da

translocação bacteriana e ao aumento dos níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos (COLLINS *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2016; LOOIJER-VAN LANGEN *et al.*, 2011). A deficiência dos esteróides sexuais resulta em níveis reduzidos da transcrição de uma série de proteínas de junção das lacunas intestinais, como as proteínas da família das claudinas que regulam a permeabilidade intestinal (ULLUWISHEWA *et al.*, 2011; ZEISSIG *et al.*, 2007). Concluindo, com aumento da permeabilidade intestinal após a depleção dos esteróides sexuais, temos uma maior carga antigênica que entra na submucosa epitelial e provoca a produção de citocinas inflamatórias (HSU; PACIFICI, 2018). Portanto, qualquer abordagem terapêutica que possa diminuir a permeabilidade do intestino será uma terapia promissora para prevenir a perda óssea induzida por depleção de esteróides sexuais (HSU; PACIFICI, 2018).

1.3 Probióticos como modalidade terapêutica para a doença periodontal e a osteoporose

As abordagens terapêuticas que visam alterar a microbiota de forma a induzir efeitos esqueléticos benéficos, ou que vislumbrem diminuir a permeabilidade intestinal com o objetivo de prevenir a perda óssea induzida pela depleção de esteróides sexuais, parecem ser extremamente promissoras (DEVINE; MARSH, 2009; HSU; PACIFICI, 2018). Neste contexto, terapêuticas de suplementação nutricional com probióticos têm sido amplamente avaliadas (HSU; PACIFICI 2018).

Os probióticos são definidos, de acordo com a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP), como microrganismos vivos que, quando administrados em doses adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (HILL *et al.*, 2014). A terapia com probióticos tem sido estudada em diversas condições patológicas como distúrbios gastrointestinais (RITCHIE; ROMANUK, 2012), imunológicos (BAKHSHANDEH, 2023; CARDOSO *et al.*, 2020), doenças metabólicas (MOREIRA *et al.*, 2023) e patologias bucais, como a doença periodontal (MESSORA *et al.*, 2013). A proposta do uso de probióticos na terapia periodontal se baseia no conceito de sinergismo e disbiose polimicrobiana (AMATO *et al.*, 2022; MESSORA *et al.*, 2013; NGUYEN *et al.*, 2021; TEUGHELIS *et al.*, 2007). Os probióticos podem apresentar propriedades imunomoduladoras, influenciando a produção de citocinas e melhorando a imunocompetência do hospedeiro (TEUGHELIS *et al.*, 2013).

A literatura sugere que o uso de probióticos pode prevenir a perda de massa óssea resultante da diminuição do estrógeno (BRITTON *et al.*, 2014; OHLSSON *et al.*, 2014; PARVANEH *et al.*, 2014). Um dos primeiros estudos avaliando o uso de probióticos como tratamento preventivo à osteoporose foi publicado em 2014 por Ohlsson *et al.* Os autores

verificaram que o tratamento com *Lacticaseibacillus paracasei subsp. paracasei* (*L. paracasei*) e com uma mistura de três cepas, *L. paracasei* DSM13434, *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* (*L. plantarum*) DSM 15312 e DSM 15313, protegeu os camundongos da perda óssea cortical e da reabsorção óssea, induzidas por ovariectomia. O estudo demonstrou também que tratamento com probióticos reduziu a expressão de duas citocinas inflamatórias, $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$, e aumentou a expressão de OPG, um potente inibidor da osteoclastogênese. O estudo permitiu concluir que os tratamentos com probióticos alteraram o estado imunológico no osso, resultando em reabsorção óssea atenuada em camundongos ovariectomizados. No mesmo ano, BRITTON et al. verificaram resultados semelhantes com outra cepa probiótica, o *Limosilactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 (*L. reuteri*). O estudo mostrou também que, além de proteger de forma significativa os camundongos ovariectomizados da perda óssea, os marcadores e ativadores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos (fosfatase ácido tartarato resistente -TRAP e RANKL), bem como a osteoclastogênese foram significativamente diminuídos. O tratamento com *L. reuteri* também suprimiu o aumento do número de linfócitos T CD4+ na medula óssea. Em 2016, Li et al. investigaram os efeitos de probióticos na camada epitelial do intestino delgado e na regulação das proteínas de junção que formam a camada epitelial do intestino. O tratamento com cepas probióticas diferentes reduziu a perda óssea induzida pela ovariectomia e proporcionou aumento da massa óssea, além de uma diminuição na permeabilidade e inflamação intestinal. Dessa forma, o estudo reforçou a hipótese de que os efeitos dos probióticos na saúde óssea relacionam-se, em parte, ao fortalecimento da barreira intestinal (HSU; PACIFICI, 2018; OHLSSON et al., 2014).

O uso de probióticos tem sido estudado como uma estratégia complementar à terapia convencional para diminuir a perda óssea decorrente da doença periodontal. Na doença periodontal, além do aumento de bactérias patogênicas, há também a diminuição dos níveis de bactérias benéficas (HAJISHENGALLIS, 2014). Em pessoas saudáveis, a microbiota indígena desempenha uma importante função na limitação do crescimento e da colonização por bactérias patogênicas (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017), bem como na indução de uma resposta imunológica benéfica/protetora para os tecidos bucais (TEUGHELIS et al., 2008). Os probióticos podem desencadear um efeito direto sobre patógenos periodontais, afetando seu crescimento, adesão e colonização (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). As cepas probióticas podem produzir diversos componentes que atuam como agentes antimicrobianos, como ácido lático, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e substâncias inibitórias (OELSCHLAEGER, 2010).

Diferentes cepas têm sido avaliadas para o tratamento da doença periodontal, dentre elas bactérias do gênero e espécie *L. reuteri* (MORAES *et al.*, 2020; TEUGHELIS *et al.*, 2013; VIVEKANANDA *et al.*, 2010), *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (*L. lactis*) (GAO *et al.*, 2022) *Levilactobacillus brevis* (*L. brevis*) (MAEKAWA *et al.*, 2014), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) (GATEJ *et al.*, 2018), *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) (OLIVEIRA *et al.*, 2017; RICOLDI *et al.*, 2017), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) (MESSORA *et al.*, 2013; MESSORA *et al.*, 2016; TSUBURA *et al.*, 2009) e *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) (MESSORA *et al.*, 2016). Um dos primeiros estudos a avaliar os efeitos da terapia probiótica na doença periodontal foi publicado em 2007 por TEUGHELIS *et al.* Os autores avaliaram sete bactérias presumidamente benéficas quanto à sua capacidade de interferir, excluir ou deslocar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) de células epiteliais *in vitro*. As cepas *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*), *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) e *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*) mostraram efeitos inibitórios proeminentes sobre a *A. actinomycetemcomitans*. Este estudo foi importante pois confirmou a hipótese de que interações bacterianas benéficas podem inibir a colonização por patógenos e abriu novas perspectivas para a aplicação deste conceito na terapia periodontal. No mesmo ano, TEUGHELIS *et al.* (2007) realizaram a aplicação subgingival das mesmas cepas de *Streptococcus* após a raspagem e alisamento radicular em dentes de cães com bolsas periodontais. O tratamento diminuiu o grau de inflamação dos tecidos periodontais e modificou a composição microbiana dos sítios tratados, reduzindo e atrasando a recolonização dos mesmos por periodontopatógenos. Este estudo introduziu o conceito de recolonização guiada de bolsas periodontais mediante o uso de bactérias compatíveis com a saúde bucal como uma estratégia de tratamento para a periodontite.

O eixo boca-intestino pode ser uma via de ligação entre as doenças periodontais e sistêmicas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022). Está bem estabelecido na literatura que a ação dos probióticos no tratamento da doença periodontal refere-se à modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro. No mesmo sentido, a manipulação da microbiota intestinal levando a efeitos imunomoduladores é recomendada para reduzir os efeitos da perda óssea pela diminuição do estrógeno. Em 2013, MESSORA *et al.* avaliaram a influência da suplementação com probióticos, *B. subtilis*, na periodontite induzida por ligadura e na morfologia intestinal em ratos. O grupo que recebeu a terapia probiótica apresentou menores perdas de inserção e do nível ósseo alveolar. No intestino, foi observada maior altura das vilosidades e profundidade das criptas em comparação com o grupo com doença periodontal e sem a suplementação probiótica. Os resultados sugeriram que o probiótico, além de diminuir a perda óssea resultante

da doença periodontal, promoveu alterações morfológicas no intestino que, possivelmente, diminuíram a permeabilidade intestinal e protegeram os animais da perda óssea. O estudo trouxe uma importante sinalização de que os probióticos podem ser uma alternativa interessante para o tratamento das duas condições associadas. Em 2022, de OLIVEIRA *et al.* avaliaram, por meio de um estudo clínico randomizado, os efeitos a curto prazo da administração sistêmica de probióticos como adjuvante à terapia periodontal (raspagem subgingival) a fim de conduzir as microbiotas do ambiente oral e intestinal para um estado saudável e melhorar a condição clínica periodontal. O probiótico administrado continha cinco cepas de *Lactobacillus spp.* (*Lactobacillus acidophilus* La-14, *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32, *Lactobacillus casei* Lc-11, *Lactobacillus salivarius* Ls-33 e *Lactobacillus plantarum* Lp-115) e três de *Bifidobacterium spp.* (*Bifidobacterium lactis* Bl-04, *Bifidobacterium longum* Bl-05 e *Bifidobacterium breve* Bb-03). Os resultados demonstraram que o uso adjuvante de probióticos sistêmicos com o tratamento periodontal resultou em uma diminuição significativa nas espécies subgingivais, porém sem afetar significativamente a composição e diversidade da microbiota intestinal. Houve uma melhora clínica semelhante entre os grupos, com tendência a melhor resposta para o grupo que recebeu a terapia probiótica. O estudo permitiu detectar nos pacientes cinco perfis microbianos orais-intestinais distintos relacionados à periodontite e que parecem responder de forma diferente aos tratamentos periodontais e à terapia probiótica propriamente dita, introduzindo um conceito de personalização como fator determinante de resultados no uso de probióticos.

1.4 *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 e *Lactocaseibacillus casei*

As cepas bacterianas mais estudadas para fins probióticos pertencem ao gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). O *B. lactis* geralmente está presente no microbioma intestinal e apresenta uma relação simbiótica com o hospedeiro (RUSSELL *et al.*, 2011). É considerado um potencial probiótico por possuir propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas (RUSSELL *et al.*, 2011). Alguns estudos demonstraram que o *B. lactis* altera a colonização de bactérias cariogênicas e previne a cárie dentária, bem como diminui os índices de placa (ÇAGLAR *et al.*, 2008; TOIVAINEN *et al.*, 2015). O *B. lactis* apresenta resultados bastante satisfatórios na literatura para o tratamento da doença periodontal. Em 2017, OLIVEIRA *et al.* investigaram os efeitos da administração tópica de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) na periodontite experimental em ratos. As análises microtomográficas realizadas demonstraram que os animais com doença

periodontal induzida por ligadura e tratados por meio de irrigações subgengivais com os microrganismos probióticos apresentaram menores porosidade óssea, separação de trabéculas ósseas e perda de inserção conjuntiva, bem como maior volume ósseo em comparação com os animais que receberam irrigações subgengivais com uma solução sem probióticos. Considerando o perfil imunoinflamatório dos animais, o grupo que recebeu o probiótico apresentou maior expressão de OPG e de beta-defensinas (BD), bem como menores níveis de Interleucina-1 β e RANKL nos tecidos gengivais. Resultados semelhantes foram reportados posteriormente também com a administração sistêmica do *B. lactis* HN019 (OLIVEIRA *et al.*, 2023).

Os efeitos do probiótico *B. lactis* HN019 como adjunto à raspagem e alisamento radicular em ratos com periodontite experimental foram avaliados por RICOLDI *et al.* (2017). O grupo que recebeu o tratamento convencional associado ao probiótico apresentou reabsorção óssea alveolar reduzida e menor perda de inserção quando comparado com o grupo que recebeu apenas a raspagem e alisamento radicular. Além disso, o grupo tratado com probióticos mostrou significativamente menos osteoclastos, expressão aumentada de citocinas anti-inflamatórias e expressão reduzida de citocinas pró-inflamatórias.

Clinicamente, esta cepa probiótica apresenta também resultados bastante promissores no tratamento da doença periodontal. Em 2018, INVERNICI *et al.*, avaliaram o efeito desta cepa administrada na forma de pastilhas como adjuvante à raspagem e alisamento radicular em pacientes com periodontite crônica generalizada. O grupo que recebeu o probiótico apresentou diminuição da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica significativamente maiores do que o grupo sem probiótico. Esse grupo de pacientes tratados com probióticos também demonstrou significativamente menos patógenos periodontais dos complexos vermelho e laranja, e níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias quando comparado ao grupo sem probiótico. Estudo semelhante conduzido em 2020 por INVERNICI *et al.* reportou maior expressão de BD-3, receptor toll-like 4 (TLR4) e grupamento de diferenciação (CD)-4 nos tecidos gengivais no grupo que recebeu a terapia convencional associada ao probiótico, em comparação com o grupo sem probiótico. Adicionalmente, o *B. lactis* HN019 reduziu a adesão de *P. gingivalis* às células epiteliais e mostrou potencial antimicrobiano contra periodontopatógenos.

B. lactis HN019 tem sido avaliado como adjuvante no tratamento da doença periodontal associada a diferentes condições sistêmicas, como a artrite reumatóide e a síndrome metabólica. A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica autoimune que afeta as articulações (SCOTT, 2002). A literatura mostra que, de forma semelhante ao que ocorre com a osteoporose,

o microbioma intestinal está envolvido na patogênese da artrite reumatóide (MAEDA *et al.*, 2016). A microbiota intestinal atua como mediador da resposta imunoinflamatória e a disbiose pode resultar em maior suscetibilidade à artrite (FERRO *et al.*, 2021; HORTA-BAAS *et al.*, 2017). Em 2020, CARDOSO *et al.*, avaliaram os efeitos da administração sistêmica do probiótico *B. lactis* HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos com artrite reumatóide experimental. Os autores observaram que, para o grupo com artrite e periodontite tratados com o probiótico, houve redução da perda óssea alveolar, de TNF- α e de IL-6 e aumento dos níveis de IL-17 quando comparado ao grupo que não recebeu a terapia probiótica. O estudo concluiu que a administração sistêmica de *B. lactis* HN019 promoveu efeito protetor contra a destruição do tecido periodontal, diminuindo tanto a perda óssea quanto os níveis de mediadores inflamatórios e aumentando a proporção de bactérias compatíveis com a saúde periodontal em ratos com artrite reumatóide e doença periodontal. A síndrome metabólica é definida pela OMS como uma condição patológica caracterizada pela presença de três ou mais condições, dentre elas: obesidade, resistência à insulina, hipertensão e hiperlipidemia. As condições associadas a síndrome metabólica aumentam o risco de doença coronariana, diabetes, acidente vascular cerebral e outros problemas de saúde (National Heart, Lung and Blood Institute, NIH). Estudos mostram um efeito positivo da administração sistêmica do probiótico *B. lactis* HN019 na síndrome metabólica (BERNINI *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2023; SILVA *et al.*, 2022). Clinicamente, o consumo de *B. lactis* HN019 foi capaz de reduzir significativamente os índices de massa corporal, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade, TNF- α e IL-6 (BERNINI *et al.*, 2016). Foi também demonstrada uma redução significativa na severidade da doença periodontal em animais com síndrome metabólica (SILVA *et al.*, 2022). Além da modulação dos parâmetros imunoinflamatórios e metabólicos sistêmicos na doença periodontal, foi demonstrado que o *B. lactis* HN019 é capaz de alterar os parâmetros morfológicos e microbiológicos intestinais, modulando a expressão de genes lipogênicos em animais com a síndrome (MOREIRA *et al.*, 2023).

Estes estudos pré-clínicos e clínicos demonstram claramente o potencial de *B. lactis* HN019 em promover uma resposta imunomoduladora de interesse para o tratamento da doença periodontal e de algumas condições sistêmicas. Este mesmo probiótico pode ser um promissor adjuvante no tratamento da doença periodontal associada à osteoporose, como sugerido no estudo de JIA *et al.* (2022). Os autores avaliaram os efeitos terapêuticos de um preparado contendo 10 diferentes cepas probióticas, incluindo o *B. lactis* HN019, na doença periodontal em animais com osteoporose. A periodontite crônica foi induzida por meio de ligadura nos molares, enquanto a osteoporose foi induzida por meio da ovariectomia. Foram avaliados a

microbiota e permeabilidade intestinal, bem como a perda óssea alveolar. Os resultados mostraram que a administração da combinação de cepas probióticas preveniu significativamente a reabsorção óssea periodontal em ratos ovariectomizados. Adicionalmente, foi observada uma diminuição na permeabilidade intestinal e nos níveis séricos de citocinas inflamatórias. Diante dos resultados preliminares verificados na literatura, é possível que o *B. lactis* HN019 seja um probiótico com grande potencial para o tratamento da doença periodontal em uma condição sistêmica de osteoporose.

O *Lacticaseibacillus casei* 01 (*L. casei* 01) é uma outra cepa que desperta o interesse como probiótico para o tratamento da doença periodontal em indivíduos portadores de osteoporose. Esta cepa sobrevive ao trânsito intestinal e exerce efeitos benéficos *in vivo*, além de ser capaz de modificar a microflora digestiva e melhorar o sistema imunológico durante seu trânsito no trato digestivo (GUERIN-DANAN *et al.*, 1998; OOZEER *et al.*, 2002; PERDIGÓN *et al.*, 1990). Os efeitos benéficos do *L. casei* na microbiota intestinal têm sido amplamente estudados no tratamento da artrite reumatóide. Em 2013, NOTO LLANA *et al.* mostraram por meio de estudo pré-clínico que o consumo de *L. casei* diminuiu a inflamação intestinal e articular causadas por *Salmonella*. Foi observado também uma diminuição na permeabilidade intestinal e na expressão de TNF- α , IL-17, IL-23, IL-1 β e IL-6, parâmetros estes, de grande relevância para a osteoporose (OHLSSON *et al.*, 2014). Resultados semelhantes foram reportados por AMDEKAR *et al.* (2011), os quais verificaram que a administração oral de *L. casei* diminuiu significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias e reduziu a artrite em animais.

Os efeitos do *L. casei* como cepa probiótica sobre a placa subgengival foram estudados por IMRAN *et al.* (2015). Os autores avaliaram se a administração oral de probiótico contendo o *L. casei*, poderia alterar a população bacteriana na placa subgengival. O estudo mostrou redução na contagem de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*, sugerindo que o *L. casei* possa ter um efeito positivo no tratamento da doença periodontal. Estes resultados foram corroborados pelos reportados em 2019 por MONTAZERI-NAJAFABADY *et al.* Os autores compararam a eficácia de cinco cepas probióticas, dentre elas: *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *L. reuteri*, *L. casei*, *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) e *Bacillus coagulans* (*B. coagulans*), na proteção à perda óssea induzida por ovariectomia. Foram avaliados parâmetros bioquímicos, incluindo vitamina D, cálcio (Ca), fósforo (P) e fosfatase alcalina (ALP), bem como a DMO. O estudo mostrou que o *L. casei* aumentou significativamente os níveis de Ca e ALP e diminuiu o P nos grupos tratados. Além disso, o *L. casei* aumentou significativamente a vitamina D e produziu melhores efeitos na DMO. Os

autores concluíram que esta cepa apresentou os maiores efeitos em termos de densidade mineral óssea e parâmetros bioquímicos.

Ainda não se tem na literatura nenhum estudo demonstrando o uso do *L. casei* no tratamento da doença periodontal em uma condição sistêmica de osteoporose, porém os resultados apresentados até o momento, especialmente relacionando esta cepa com efeitos benéficos na modulação da microbiota intestinal e no tratamento da artrite reumatóide, sugerem que esta pode ser uma alternativa viável também para a doença periodontal associada à osteoporose (AMDEKAR *et al.*, 2011; NOTO LLANA *et al.*, 2013; PAUL *et al.*, 2021).

Considerando a estreita relação entre a doença periodontal e o aumento do risco de desenvolvimento de osteoporose, bem como o impacto das alterações hormonais durante a menopausa na progressão dessas condições, torna-se relevante explorar terapias que possam mitigar os efeitos adversos de ambas as doenças (ANBINDER *et al.*, 2016; LEE, 2022; MASHALKAR *et al.*, 2018; YU; WANG, 2022). A literatura demonstra amplamente o papel da disbiose na microbiota oral e sua influência nos desequilíbrios microbiológicos no intestino, desencadeando respostas imunológicas que afetam o sistema esquelético (HSU; PACIFICI, 2018; KITAMOTO; KAMADA, 2022). Neste contexto, terapias destinadas a modular a microbiota, como a utilização de probióticos, têm mostrado um grande potencial (HSU; PACIFICI, 2018; OHLSSON *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado consistentemente que o uso de probióticos pode reduzir a perda óssea induzida pela ovariectomia, fortalecer a barreira intestinal e afetar o crescimento, adesão e colonização de patógenos periodontais (DEVINE; MARSH, 2009; HSU; PACIFICI, 2018; STAMATOVA; MEURMAN, 2009). O *B. lactis* HN019 tem sido particularmente promissor em estudos pré-clínicos e clínicos como um adjuvante no tratamento da doença periodontal, assim como em outras condições sistêmicas (CARDOSO *et al.*, 2020; MAEDA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2022). Da mesma forma, o *L. casei* 01 desperta o interesse como um probiótico potencial para o tratamento da doença periodontal em indivíduos com osteoporose. Embora ainda não existam estudos específicos sobre o uso dessa cepa nesta condição, os resultados promissores obtidos em relação à capacidade do *L. casei* 01 de modular a microbiota intestinal e melhorar o sistema imunológico sugerem que ele pode ser uma alternativa viável (NOTO LLANA *et al.*, 2013; PAUL *et al.*, 2021). Portanto, considerando a associação entre a doença periodontal e a osteoporose, bem como a influência da microbiota intestinal na saúde óssea, é de grande relevância explorar o potencial das cepas probióticas *B. lactis* HN019 e *L. casei* 01 como adjuvantes no tratamento da doença periodontal em indivíduos com osteoporose. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar microtomograficamente, histomorfometricamente e imunologicamente os

efeitos da administração tópica e sistêmica das cepas probióticas *B. lactis* HN019 e *L. casei* 01 em animais ovariectomizados com doença periodontal induzida.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos dos agentes probióticos *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (HN019) e *Lactocaseibacillus casei* 01 (LC01) na doença periodontal induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar de forma linear e volumétrica, por meio de microtomografia computadorizada (micro-CT), a perda óssea alveolar e a microarquitetura óssea na região do 1º molar inferior;
 - Analisar, por meio de análise histomorfométrica, as características teciduais, a perda óssea alveolar e de inserção conjuntiva nas regiões de furca e interproximal do 1º molar inferior;
 - Avaliar histomorfometricamente as alterações na altura das vilosidades e profundidade de criptas intestinais;
 - Avaliar, por meio de reações imuno-histoquímicas, a expressão de TRAP, OPG e RANKL na região do 1º molar inferior, bem como a expressão de proteínas de junção epitelial (E-caderina e Claudina-1) nos tecidos intestinais;
 - Avaliar, por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), a concentração sanguínea de estradiol.
-
-

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cálculo amostral e apreciação ética

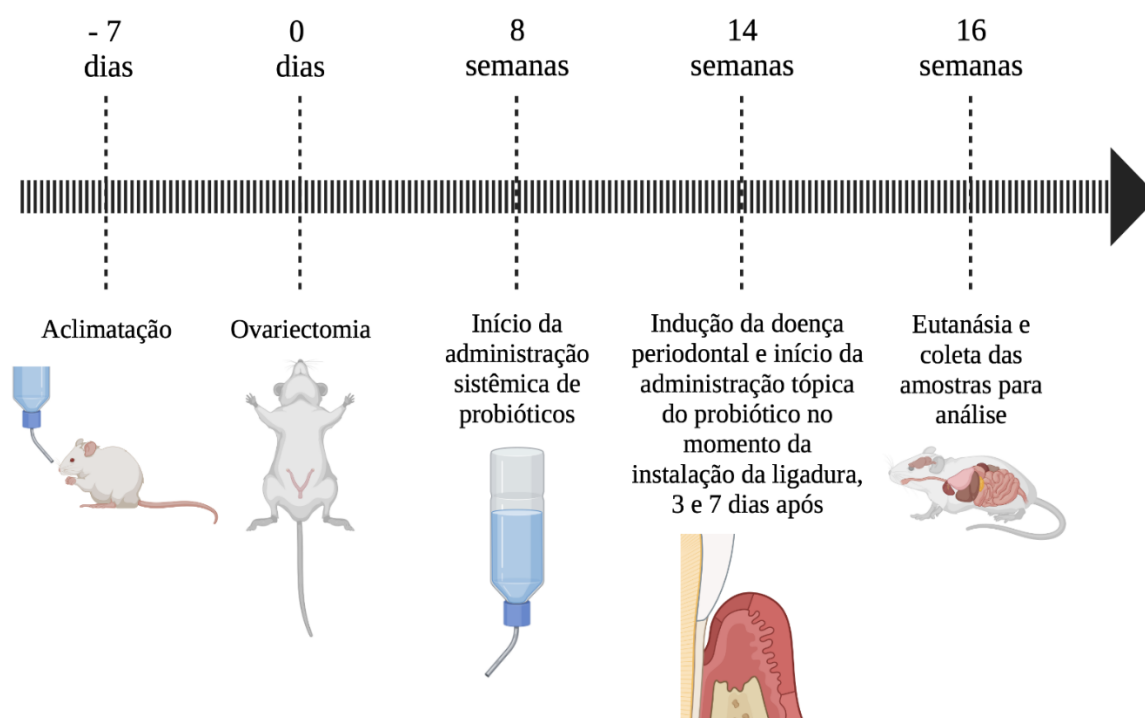
O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa *Graphpad Statemate 2.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi calculado considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão entre os grupos DP e C do estudo de OLIVEIRA *et al.* (2017), reconhecendo a diferença significativa de 5% (δ) entre os grupos, intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), desvio padrão (σ) de 23%, as mudanças na média do Volume Ósseo (VO) como variável primária e $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$. O cálculo da amostra por grupo foi baseado na fórmula: $n \geq \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$. O número mínimo necessário foi de 8 animais por grupo experimental. Considerando que estudos prévios realizados por nosso grupo apontam um percentual de 30% de animais que não desenvolvem a periodontite experimental com a utilização do modelo do presente estudo, foram utilizados 11 animais por grupo experimental.

A pesquisa foi realizada respeitando-se os princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos (Lei 11.794/2008), a Declaração Universal dos Direitos dos Animais da UNESCO (Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e a legislação em vigor (Lei 9605/1998). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP), (Protocolo CEUA número: 2018.1.448.58.2) (Anexo 1).

3.2 Delineamento experimental

Foram utilizadas 66 ratas (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), com idade entre 3 e 4 meses, pesando entre 150 e 250g (Biotério da FORP-USP, Ribeirão Preto, SP). Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno autoclaváveis, com 3 animais por caixa. A sala foi climatizada a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Durante o período de 7 dias, foi realizada a aclimatação dos animais com o ambiente e com a equipe de execução do projeto (Figura 1), para posterior início dos procedimentos cirúrgicos.

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo. Fonte: Autoral. Imagem criada com software online BioRender.

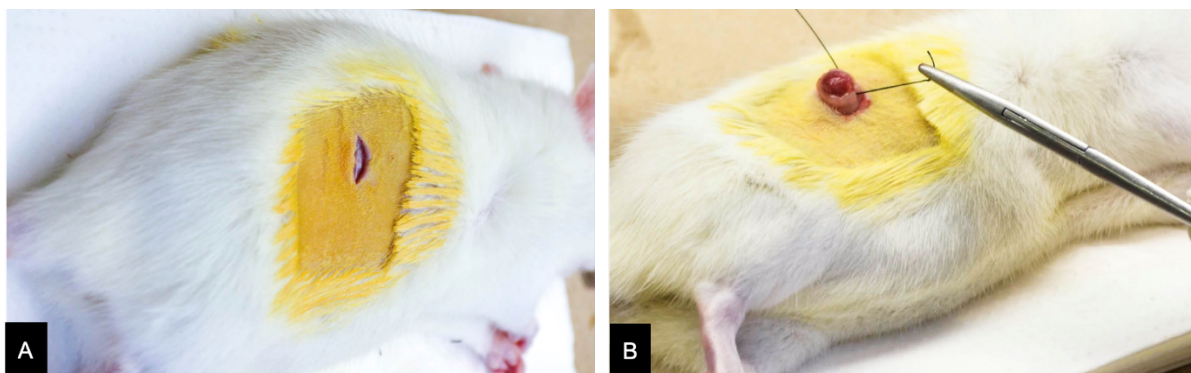


3.3 Ovariectomia (OVX)

Todos os animais foram submetidos à ovariectomia bilateral. Inicialmente, os animais foram anestesiados por meio de injeção intramuscular, com solução de cloridrato de Xilazina a 2% (2 mg/mL) e Cloridrato de Ketamina a 10% (10mg/mL), nas respectivas doses de 10 mg/kg (Xilazina) e 80 mg/kg (Ketamina). Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais dorsais, em uma região entre a última costela e o joelho. A antisepsia foi realizada com álcool iodado nos locais de incisão. As incisões foram cutâneas e bilaterais, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários (direito e esquerdo) e excisão (Figura 2 A e B) dos mesmos (KALU, 1991). Após a remoção dos ovários, realizou-se a sutura dos tecidos com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). No trans-operatório, foi realizada administração de anti-inflamatório e analgésico Flunixin meglumine (Banamine) na dosagem de 2,5 mg/kg, por via subcutânea. Em seguida, cada animal recebeu, por via intramuscular, uma única dose de 24.000 UI/Kg de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil). No pós-operatório, os animais receberam administração de anti-inflamatório e analgésico Flunixin meglumine (Banamine) na dosagem de 2,5 mg/kg, por via

subcutânea, por 2 dias, com um intervalo de 12 horas entre cada aplicação. Os animais foram, então, acompanhados por 4 meses.

Figura 2 – (A) Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais dorsais, antissepsia com álcool iodado e incisão na região entre a última costela e o joelho, correspondente a localização dos ovários. (B) Após a realização das incisões, o tecido muscular foi divulsionado e os ovários direito e esquerdo foram expostos para excisão.



(Fonte: Autoral).

3.4 Exame do ciclo estral

O exame do ciclo estral foi realizado na semana anterior e duas semanas após a ovariectomia por meio da coleta de líquido vaginal por um período de 5 dias consecutivos. Para o desenvolvimento desta técnica de observação, foi realizada a imobilização do animal e introdução, com o auxílio de uma ponteira pequena acoplada a uma micropipeta, de uma dose de solução salina (cerca de 1 mL) no interior da vagina de cada rata. Após a introdução, a solução foi rapidamente aspirada e seu conteúdo transferido para uma lâmina de vidro e imediatamente observado em microscopia óptica. Foram analisados o número de leucócitos presentes e a presença de células epiteliais. Este procedimento foi realizado bem no início da manhã, por volta das 7 horas. Esta análise teve como finalidade indicar as mudanças ocorridas no ciclo reprodutivo em decorrência do procedimento de ovariectomia (HOAR; HICKMAN, 1975; MARCONDES *et al.*, 2002).

3.5 Distribuição dos grupos experimentais

Após a ovariectomia, os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n = 11), de acordo com a presença ou ausência de doença periodontal induzida por ligaduras (DP ou C) e de acordo com a cepa probiótica administrada de forma tópica e sistêmica, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) e *Lacticaseibacillus casei* 01 (*L. casei* 01) (Tabela 1).

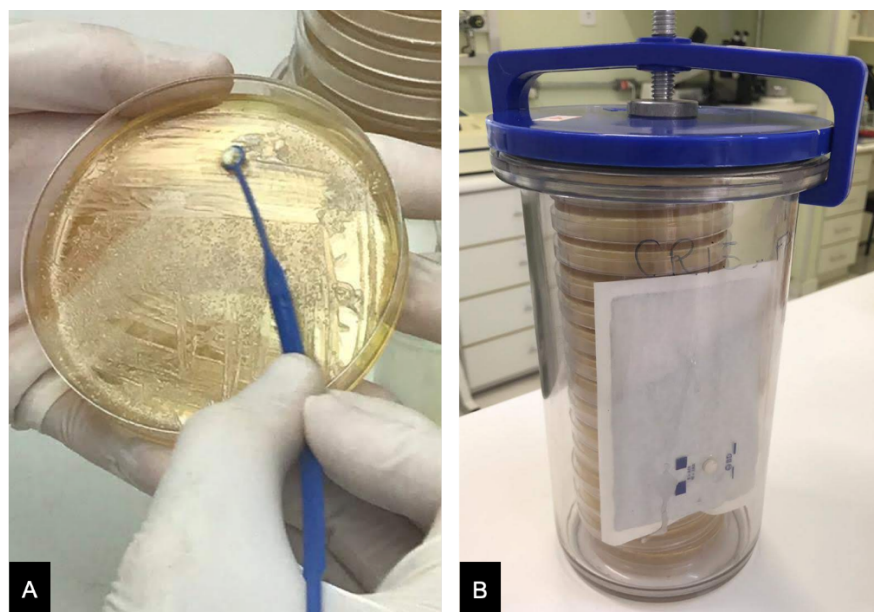
Tabela 1 – Distribuição dos grupos de acordo com os procedimentos realizados.

Grupo	Procedimentos realizados
C-OVX	Sem DP induzida por ligadura e sem administração tópica e sistêmica de probiótico
C-OVX-HN019	Sem DP induzida por ligadura e com administração tópica e sistêmica de <i>B. lactis</i> HN019
C-OVX-LC01	Sem DP induzida por ligadura e com administração tópica e sistêmica de <i>L.casei</i> 01
DP-OVX	Com DP induzida por ligadura e sem administração tópica e sistêmica de probiótico
DP-OVX-HN019	Com DP induzida por ligadura e com administração tópica e sistêmica de <i>B. lactis</i> HN019
DP-OVX-LC01	Com DP induzida por ligadura e com administração tópica e sistêmica de <i>L.casei</i> 01

3.6 Preparo das culturas probióticas e administração aos animais de forma tópica e sistêmica

O *B. lactis* HN019 (HOWARUTM Bifido, E. I. Dupont® de Nemoursand Company, Wilmington, DE, EUA) e o *L. casei* 01 (LC 01 Chr. Hansen Holding A/S, Dinamarca) foram cultivados em meio MRS Agar (Man, Rogosa and Sharpe - D™ *Lactobacilli* MRS Broth, Sparks, MD, EUA) por 48 horas a 37°C sob condições de anaerobiose (GASPAK™ EZ Anaerobe Container System with indicator, Sparks, MD, EUA) (Figura 3 A e B).

Figura 3 – (A) *B. lactis* HN019 cultivado em meio MRS Agar. (B) As placas foram mantidas por 48 horas a 37°C sob condições de anaerobiose.



(Fonte: Autoral).

A seguir, com auxílio de alça esterilizada, o inóculo bacteriano foi transferido para tubos de centrifugação tipo Falcon contendo pérolas de vidro e água destilada esterilizada. Após homogeneização em agitador de tubos (Phoenix AP 65, Araraquara, SP, Brasil), a suspensão foi submetida à diluição decimal seriada até 10^{-9} , em solução salina tamponada fosfatada (PBS), com pH 7,0 e acrescida de 2,0% de carboximetilcelulose. Aliquotas de 100 μ l foram depositadas em placas de Petri contendo MRS Agar e semeadas com auxílio de bastão de vidro esterilizado. Após a semeadura, as placas foram incubadas em anaerobiose, durante 48 horas a 37°C. A padronização quantitativa dos inóculos foi obtida pela determinação da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Micronal - AJX -1000, São Paulo, SP, Brasil), bem como por contagem, em duplicata, do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

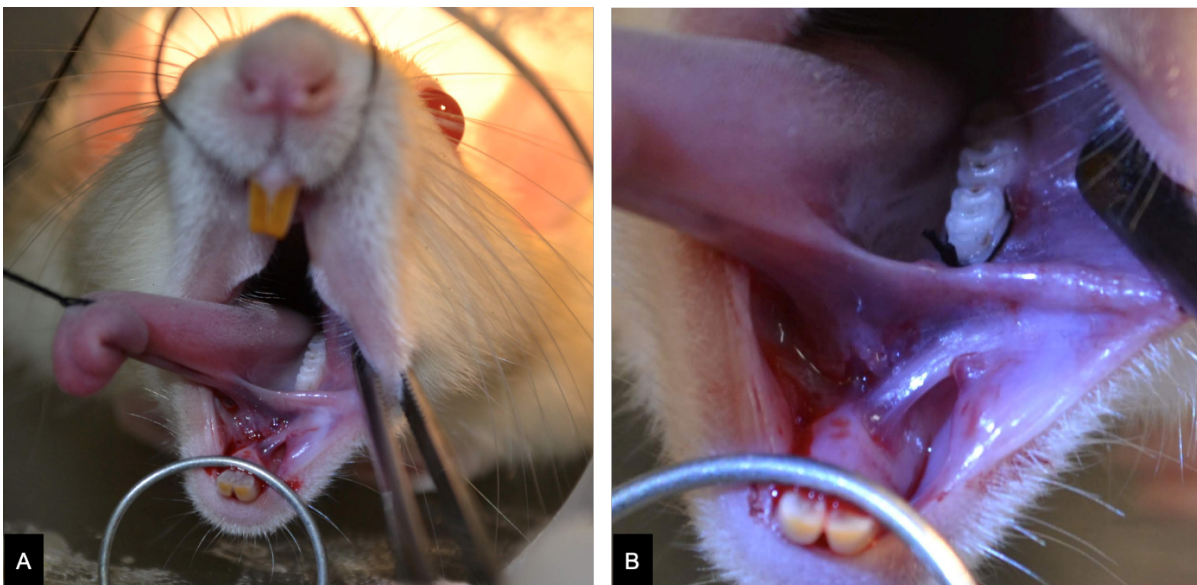
Nos grupos C-OVX-HN019 e DP-OVX-HN019, a água probiótica dos animais foi preparada pela adição das culturas previamente preparadas de *B. lactis* HN019 em garrafas com 60 mL de água, de forma a atingir as doses de 10^9 UFC/mL (INVERNICI *et al.*, 2020). Nos grupos C-OVX-LC01 e DP-OVX-LC01, a água probiótica dos animais foi preparada pela adição das culturas previamente preparadas de *L. casei* 01 em garrafas com 60 mL de água, de forma a atingir as doses de 10^9 UFC/mL. A água probiótica foi renovada a cada 24 horas. A administração da cepa probiótica foi iniciada 2 meses após a OVX e mantida por mais 2 meses. Os animais dos grupos C-OVX e DP-OVX receberam água sem probiótico.

Um volume de 100µl contendo ou não *B. lactis* HN019 ou *L. casei* 01, associado à carboximetilcelulose 2% foram utilizados para a irrigação subgingival das superfícies mesial, distal, vestibular e lingual dos primeiros molares inferiores dos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2017). A primeira irrigação foi realizada 14 semanas após a OVX nos grupos: C-OVX, C-OVX-HN019 e C-OVX-LC01 bem como no momento da colocação da ligadura para indução da doença periodontal nos grupos DP-OVX, DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01. A segunda e terceira irrigação ocorreram aos 3 e 7 dias após a primeira.

3.7 Indução da doença periodontal experimental com ligadura

Para a indução da doença periodontal, foi realizada a colocação de ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdo e direito de cada animal (MESSORA *et al.*, 2013). As ligaduras foram inseridas nos grupos DP após 14 semanas da ovariectomia. Os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal, com solução de Cloridrato de Xilazina a 2% (2mg/mL) e Cloridrato de Ketamina a 10% (10mg/mL) nas respectivas doses de 10mg/Kg (Xilazina) e 80mg/Kg (Ketamina). Com o auxílio de porta agulha tipo castroviejo e sonda exploradora odontopediátrica, foi inserido um fio de sutura seda 4-0 ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdo e direito de cada animal (Figura 4 A e B).

Figura 4 – (A) Os animais foram apoiados em um suporte para manutenção da abertura bucal durante o procedimento de inserção das ligaduras. (B) A indução da doença periodontal foi realizada por meio de colocação de fio de sutura seda 4-0 ao redor dos primeiros molares inferiores.



(Fonte: Autoral).

3.8 Eutanásia e coleta dos tecidos para as análises

Os animais foram submetidos à eutanásia 16 semanas após a ovariectomia. A eutanásia foi realizada pela administração de uma dose letal (150 mg/kg) de tiopentato de sódio (Thiopentax[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

As hemi-mandíbulas direita e esquerda foram coletadas e armazenadas por 24 horas em formol tamponado 10% e, posteriormente, seguiram o processamento laboratorial convencional; sendo a direita para análise microtomográfica da perda óssea alveolar e a esquerda para análises histomorfométrica, histopatológica e imunohistoquímica. Foram também coletadas amostras do intestino delgado (íleo, duodeno e jejuno) dos animais para avaliação histomorfométrica, histopatológica e imunohistoquímica.

3.9 Avaliação óssea alveolar com microtomografia computadorizada (micro-CT)

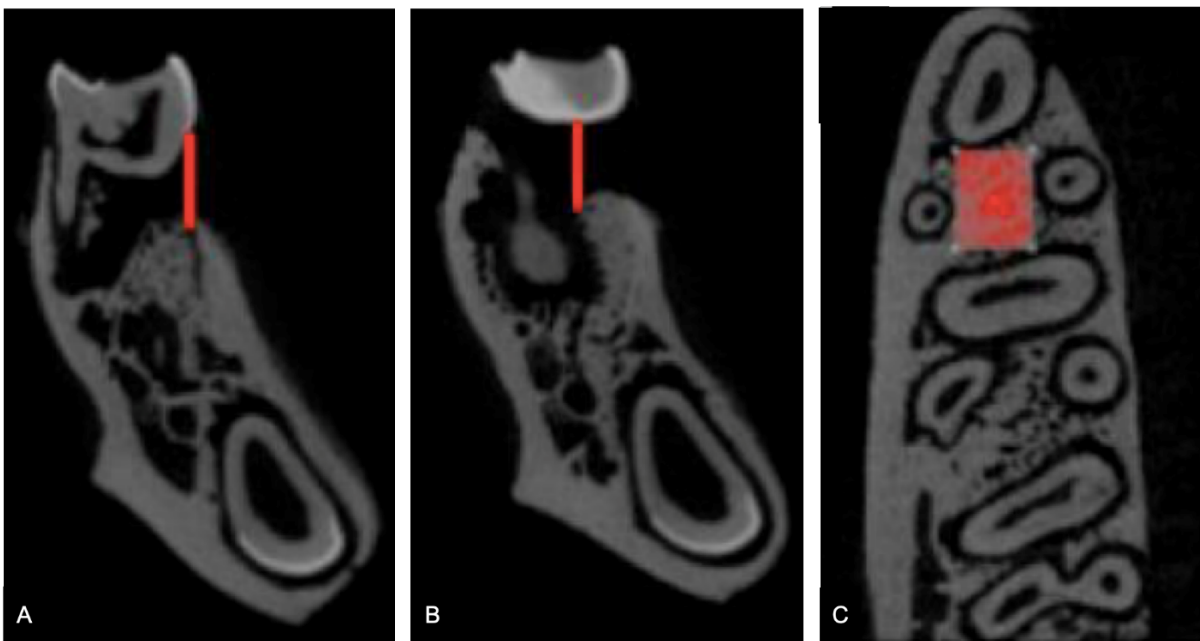
As hemi-mandíbulas direitas foram escaneadas utilizando microtomógrafo computadorizado (micro-CT) de feixe cônico (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raios X foi operado a um potencial de aceleração de 60 kV com uma corrente de feixe de 165 μ A e um tempo de exposição de 490 ms por projeção. As imagens foram produzidas com um tamanho de voxel de 6x6x6 μ m. Usando um *software* apropriado (Data Viewer, versão 1.5.0, Bruker, Kontich, Bélgica), os modelos tridimensionais gerados foram rotacionados para uma posição padrão de análise, de acordo com os seguintes critérios: (1) no plano transaxial, o primeiro molar inferior (M1) teve o seu eixo posicionado verticalmente, (2) no plano sagital, a superfície oclusal do M1 foi posicionada horizontalmente e (3) no plano coronal, o osso mandibular foi orientado verticalmente, com a raiz mesial do M1 na posição mais superior da imagem. Medidas lineares do nível ósseo alveolar (NOA) foram realizadas em três diferentes sítios: vestibular, lingual e interproximal (Figura 5 A à C), com o objetivo de avaliar a perda óssea alveolar (POA). Para as faces vestibular e lingual, nas imagens transaxiais passando pela raiz distal do 1º molar inferior, as distâncias lineares entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) vestibular/lingual, foram mensuradas. Para a região interproximal, o conjunto de dados coronais foram analisados utilizando o software CT-Analyser (CTAn, versão, v.1.18, Bruker, Kontich, Bélgica). A distância entre a última imagem, mostrando a crista óssea alveolar (COA) vestibular/lingual entre o 2º molar inferior e 1º molar inferior, e a primeira imagem, mostrando a JCE do 1º molar inferior, foi mensurada. A POA de cada animal foi

representada, em micrômetros (μm), pela soma das mensurações obtidas nas faces vestibular, lingual e interproximal.

As análises volumétricas foram realizadas por meio do software CT- Analyser (CTAn, versão, v.1.18, Bruker, Kontich, Bélgica) na região de furca do 1º molar inferior. Um volume de interesse foi delineado a partir dos ápices de todas as raízes do 1º molar inferior até o teto da furca do 1º molar inferior, tocando as superfícies das raízes, em todas as imagens do plano coronal. Um retângulo foi utilizado para delimitar a área a ser analisada como volume de interesse (VOI) (Figura 5 D). Os seguintes parâmetros foram avaliados na análise volumétrica:

- 1 – Porcentagem de volume ósseo (BV/TV);
- 2 – Porcentagem de porosidade total (Po.Tot);
- 3 – Número de trabéculas ósseas (Tb.N), em mm^{-1} ;
- 4 – Espaço entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), em mm^{-1} ;
- 5 – Espessura Trabecular (Tb.Th), em mm^{-1} ;
- 6 – Densidade de conectividade (Conn.Dn), em $1/\text{mm}^3$.

Figura 5 – Mensuração do nível ósseo alveolar (linhas vermelhas) nas regiões vestibular/lingual (A) e interproximal (B) e dos parâmetros volumétricos na região de bifurcação (C). Um retângulo tangenciando todas as raízes do 1º molar inferior (C) foi interpolado na região de bifurcação para a realização de mensurações volumétricas.



(Fonte: Autoral).

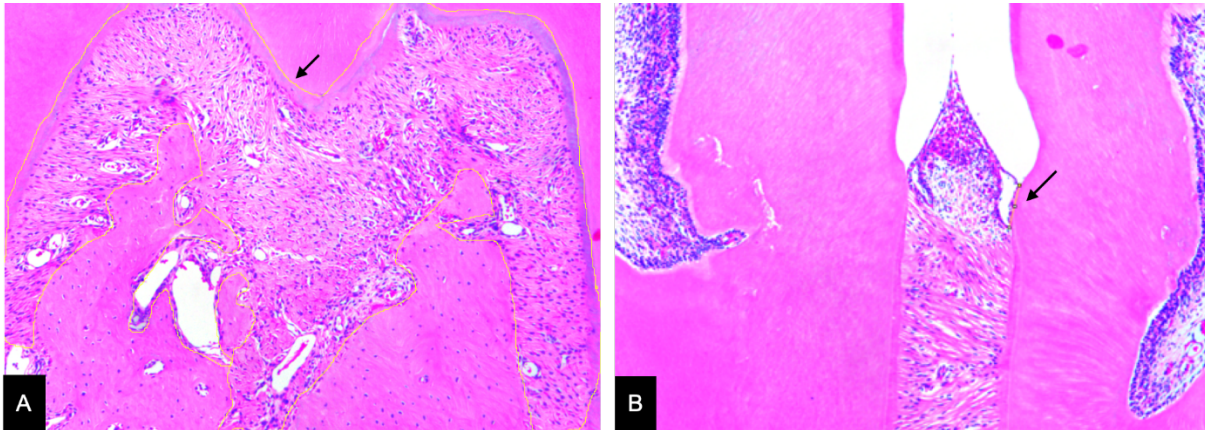
3.10 Análise histomorfométrica e histopatológica dos tecidos periodontais

As hemi-mandíbulas esquerdas foram dissecadas, fixadas em formol neutro a 10% por 48 horas e descalcificadas por meio de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético a 4% durante 90 dias. Após este período, todas as peças foram desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Sigma-Aldrich, Merck, San Luis, MO, EUA). Para a confecção das lâminas, foram realizadas secções seriadas de 4 μm de espessura na direção mesio-distal e coloração com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram analisados quantitativamente e qualitativamente por um investigador experiente, calibrado e que desconhecia os grupos experimentais. Foram selecionadas para a análise, duas secções representando a porção mais central no sentido vestibulo-lingual de cada hemi-mandíbula. Foram capturadas imagens dos cortes histológicos por meio de câmera digital acoplada a um microscópio óptico de luz (DFC295, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), com o aumento de 10x. Com o auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, EUA), foi realizada a calibração das imagens e mensurações padronizadas foram determinadas histometricamente (Figura 6). Foram obtidas medidas, em micrômetros (μm), dos seguintes parâmetros (OLIVEIRA *et al.*, 2022):

- 1 – Perda óssea: A perda óssea na região de bifurcação foi mensurada na região de furca do 1º molar inferior, calculando-se a área, em μm^2 , entre o teto da bifurcação até a crista óssea;
- 2 – Perda de inserção: A perda de inserção interproximal foi mensurada na região entre o 1º e 2º molares inferiores, calculando-se a distância, em μm , entre a JCE e a inserção conjuntiva.

Para cada animal, foi obtida uma média dos valores dos dois cortes analisados.

Figura 6 - (A) Mensuração da área de perda óssea na região de bifurcação do 1º molar inferior. Foi delimitada a área entre o teto da bifurcação até a crista óssea (linha amarela apontada com a seta na imagem à esquerda). (B) Mensuração da perda de inserção interproximal, mensurada na região entre o 1º e 2º molares inferiores. Foi traçada uma linha entre a junção cimento-esmalte e a inserção conjuntiva (linha amarela apontada com a seta na imagem à direita). Todas as mensurações foram realizadas com o software ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, EUA).

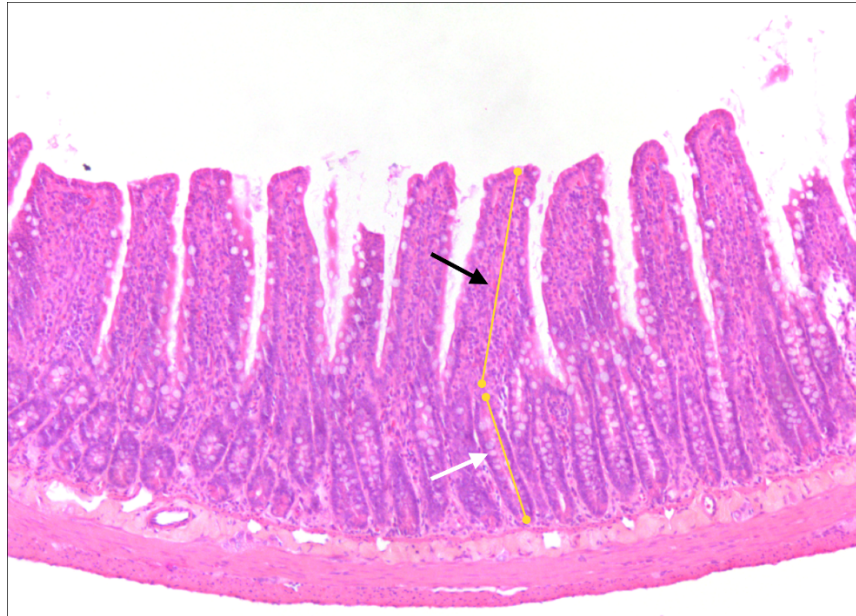


(Fonte: Autoral).

3.11 Análise histomorfométrica e histopatológica dos tecidos intestinais

Os tecidos intestinais foram fixados em formol neutro a 10% por 48 horas. Todas as peças foram desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Sigma-Aldrich, Merck, San Luis, MO, EUA). Foram realizados, então, cortes seriados com 4 µm de espessura. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol e corados com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram analisados quantitativamente e qualitativamente sob microscópio óptico de luz (DFC295, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), por um investigador experiente, calibrado e que desconhecia os grupos experimentais. Foram capturadas imagens dos cortes histológicos, com aumento de 20x, por meio de câmera digital acoplada ao microscópio óptico (Figura 7). Após a captura das imagens, foi feita a mensuração linear em milímetros, por meio do software ImageLab 2000 (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil), da altura de vilosidade e a profundidade das criptas de Lieberkühn. Foram mensuradas 10 vilosidades e 10 criptas por lâmina. Para cada animal, foi obtida uma média dos valores para cada parâmetro avaliado.

Figura 7 - Imagem representativa de uma amostra intestinal do grupo C-OVX-HN019. Foram mensurados, em milímetros, as medidas da altura de vilosidade (indicado na imagem com a seta preta) e a profundidade das criptas de Lieberkühn (indicado na imagem com a seta branca), sendo mensuradas 10 vilosidades e 10 criptas por lâmina. As imagens foram analisadas por meio do software ImageLab 2000 (Dracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil). Coloração Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento 20x.



(Fonte: Autoral).

3.12 Análise imunohistoquímica dos tecidos periodontais e intestinais

As hemi-mandíbulas esquerdas e os tecidos intestinais (íleo, duodeno e jejuno) foram fixados em formol neutro a 10% por 48 horas. As hemi-mandíbulas foram descalcificadas por meio de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético a 4% durante 90 dias. Todas as peças foram desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Sigma-Aldrich, Merck, San Luis, MO, EUA). Foram realizados, então, cortes seriados com 4 μ m de espessura. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker (Biocare Medical, Inc., Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking Chamber, Biocare Medical, Inc., Concord, CA, EUA), a 95°C, por 10 minutos. Entre cada uma das etapas da reação imunohistoquímica, foram feitas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M - pH 7,4. As secções histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e em 1% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio da peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). As lâminas histológicas contendo as amostras de tecido periodontal e de tecido intestinal de todos os grupos experimentais foram divididas em lotes e incubadas com anticorpos primários para

identificação de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP - Rabbit Polyclonal Antibody, PA5116970, Thermo Scientific, MA, EUA), osteoprotegerina (OPG - Rabbit anti-OPG - SC11383; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa B (RANKL - Goat anti-RANKL - SC7627; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), nos tecidos periodontais, além de E-caderina (E-cadherin Rabbit Polyclonal Antibody, Invitrogen - PA5-32178, Thermo Scientific, MA, EUA) e Claudina-1 (Claudin 1 Rabbit polyclonal antibody - Product 71-7800, Thermo Scientific, MA, EUA), nos tecidos intestinais.

As secções histológicas foram analisadas qualitativamente e quantitativamente sob microscópio óptico de campo claro (AxioLab, Carl Zeiss, Alemanha) por examinador experiente, calibrado e que desconhecia os grupos experimentais do estudo. A expressão tecidual dos anticorpos primários estudados foi classificada segundo a presença ou ausência de imunorreação. A imunomarcção positiva foi considerada como um precipitado de coloração acastanhada nas células e/ou matriz extracelular.

Para os tecidos periodontais, foram analisadas três regiões:

- 1 – Região mesial do 1º molar inferior;
- 2 – Região interproximal entre o 1º e 2º molares inferiores;
- 3 – Região de bifurcação do 1º molar inferior.

Na análise dos tecidos periodontais, foi realizada uma análise semi-quantitativa do padrão de imunomarcção nas três regiões, em um aumento de 400x, sendo considerados os seguintes escores (OLIVEIRA *et al.*, 2017):

- 0 – Padrão nulo de imunomarcção nas três regiões;
- 1 – Baixo padrão de imunomarcção (até um terço das áreas analisadas apresentando imunoreatividade);
- 2 – Moderado padrão de imunomarcção (aproximadamente dois terços das áreas analisadas apresentando imunoreatividade);
- 3 – Alto padrão de imunomarcção (quase toda a extensão das áreas analisadas apresentando imunoreatividade).

O grupo controle foi empregado como ponto de referência para se definir o padrão basal de imunoreatividade, a partir do qual os escores foram atribuídos aos demais grupos experimentais.

Na análise dos tecidos intestinais, foram consideradas duas regiões:

- 1 – Epitélio e tecido conjuntivo intestinal das vilosidades;
- 2 – Criptas de Lieberkühn (glândulas intestinais).

Foi realizada uma análise semi-quantitativa do padrão de imunomarcção nas duas regiões, em um aumento de 400x, sendo considerados os seguintes escores:

- 0 – Padrão nulo de imunomarcção nas duas regiões;
- 1 – Baixo padrão de imunomarcção (até um terço das áreas analisadas apresentando imunoreatividade);
- 2 – Moderado padrão de imunomarcção (aproximadamente dois terços das áreas analisadas apresentando imunoreatividade);
- 3 – Alto padrão de imunomarcção (quase toda a extensão das áreas analisadas apresentando imunoreatividade).

3.13 Análise imunoenzimática (ELISA) da concentração sanguínea de estradiol

Amostras de sangue foram coletadas por meio de punção cardíaca no momento da eutanásia e acondicionadas em tubos de centrifugação. As amostras foram centrifugadas e amostras séricas separadas para a realização dos imunoenaios para detecção e quantificação dos níveis de B-estradiol utilizando um kit comercialmente disponível (Rat estradiol, E2 Elisa Kit, MBS774596, MyBioSource, San Diego, CA, EUA). Para tanto, uma matriz foi utilizada para ajuste na curva padrão e controles, seguindo a metodologia descrita pelo kit. A leitura colorimétrica foi realizada através de um espectrofotômetro a 450 nm (TP-Reader, ThermoPlate®, São Paulo, SP, Brasil) e os valores foram expressos em pg/mL.

Foi determinado o valor de proteína total de cada amostra por meio de kits comercialmente disponíveis (DCTM Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A leitura colorimétrica foi realizada através de um espectrofotômetro a 450 nm (TP-Reader, ThermoPlate®, São Paulo, SP, Brasil) e os valores foram expressos em ng/dL. Esses valores foram utilizados para normalização dos dados.

3.14 Análise estatística dos dados obtidos

Todas as medidas foram realizadas por um examinador calibrado. Para calibração do examinador um terço da amostra foi avaliada sem identificação em dois períodos com um intervalo de 48 horas. O nível de concordância e índice Kappa foi calculado para determinar a reprodutibilidade do examinador nas duas avaliações realizadas. Para dados envolvendo escores, os valores de CCI (coeficiente de correlação intraclasse) maiores que 90% foram considerados para assegurar a calibração do examinador. Para dados contínuos, a confiabilidade foi assegurada por meio do desvio padrão das medidas duplicadas, com intervalo de confiança de 95% (HEFTI; PRESHAW, 2012; HILL *et al.*, 2006).

Foi verificada a normalidade e homocedasticidade dos dados obtidos. A normalidade dos dados foi verificada por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para todas as análises estatísticas foi utilizado um nível de significância de 5%. As comparações intergrupos foram realizadas por meio de Análise de variâncias (ANOVA) seguida de teste *post hoc* de Tukey ($p < 0,05$) para dados considerados normais, ou Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* de Dunn ($p < 0,05$) para dados que não atingiram uma distribuição normal. Valores de P entre 0,05 e 0,1 foram considerados como indicativos de tendência. Todos os cálculos foram realizados pelo software GraphPad Prism 8.1.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Exame do Ciclo Estral

As análises do líquido vaginal coletado na semana anterior ao procedimento de ovariectomia demonstraram variações entre as fases estro, metaestro, diestro e proestro em todos os animais, confirmando a periodicidade do ciclo estral. As análises do líquido vaginal coletado duas semanas após o procedimento da ovariectomia demonstraram que todos os animais se mantiveram permanentemente na fase diestro.

4.2 Avaliação óssea alveolar em microtomografia computadorizada (micro-CT)

A média e desvio-padrão da POA para os grupos avaliados estão representadas na Figura 8. O grupo DP-OVX apresentou maior POA em relação ao grupo controle (C-OVX) ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas na POA entre os grupos DP-OVX, DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01 ($p > 0,05$). Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais podem ser observadas na Figura 9.

Figura 8 – Médias e desvio-padrão da perda óssea alveolar (POA), em micrômetros (μm), para os grupos avaliados. * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0,05$).

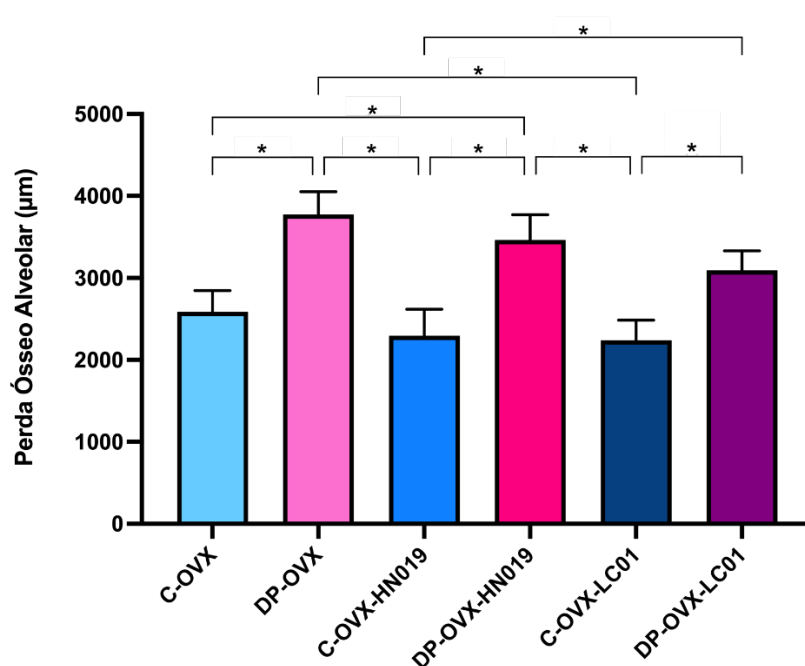
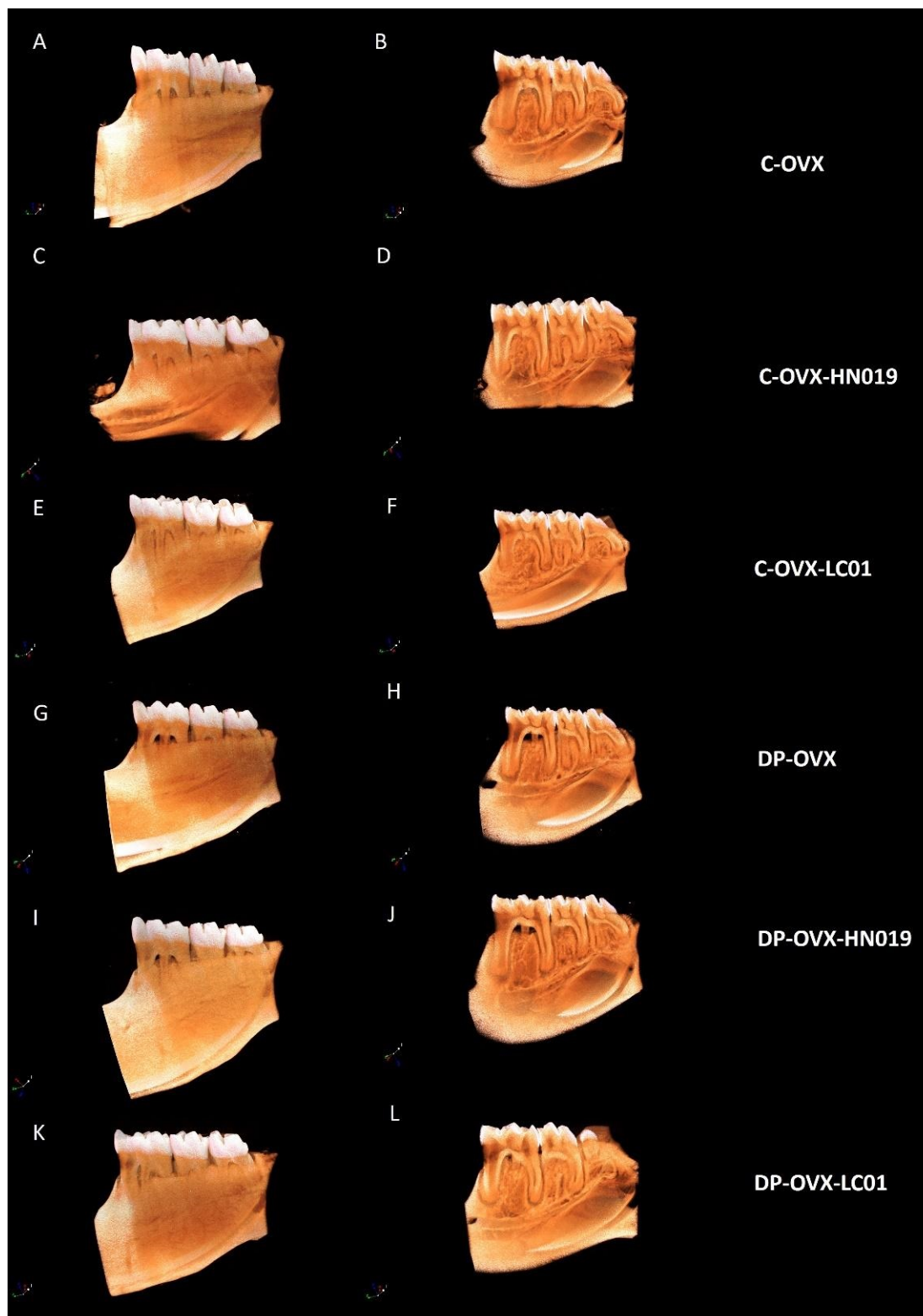


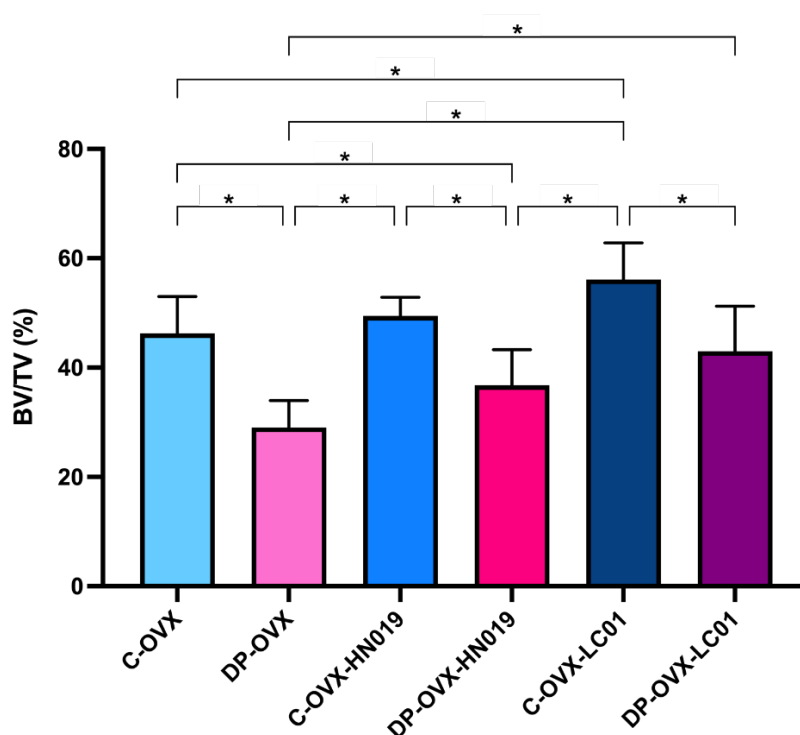
Figura 9 - Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais dos grupos C-OVX (**A, B**), C-OVX-HN019 (**C, D**), C-OVX-LC01 (**E, F**), DP-OVX (**G, H**), DP-OVX-HN019 (**I, J**) e DP-OVX-LC01 (**K, L**). Vista da superfície vestibular externa (**A, C, E, G, I e K**). Secção sagital da superfície interna (**B, D, F, H, J e L**). Imagens obtidas por meio do software CTVox (versão 3.1.0, Bruker, Kontich, Bélgica). Tamanho do pixel = 7,96 μm .



(Fonte: Autoral).

Os resultados das análises dos parâmetros volumétricos podem ser observados nas Figuras 10-15. Na Figura 10, estão representadas a média e desvio-padrão dos resultados da porcentagem de volume ósseo (BV/TV) para os grupos avaliados. O grupo DP-OVX apresentou menor BV/TV em relação ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Os grupos DP-OVX-LC01 e C-OVX-LC01 apresentaram maior BV/TV quando comparados aos grupos DP-OVX e C-OVX, respectivamente ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas no BV/TV entre os grupos DP-OVX e DP-OVX-HN019, bem como entre os grupos C-OVX e C-OVX-HN019 ($p > 0,05$).

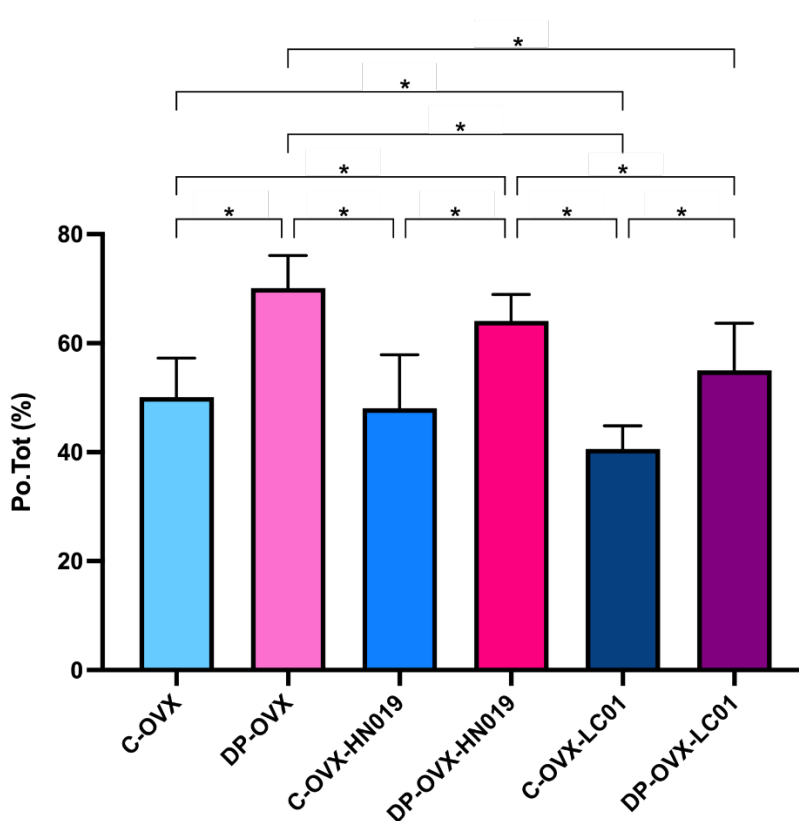
Figura 10 – Médias e desvio-padrão da porcentagem de volume ósseo (BV/TV) para os grupos avaliados. * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).



Na Figura 11, podem ser observados os dados da porcentagem de porosidade óssea total (Po.Tot) para os grupos avaliados. Foi observado um aumento significativo na Po.Tot para o grupo com doença periodontal induzida (DP-OVX), em comparação com o grupo sem a doença (C-OVX) ($p < 0,05$). O grupo DP-OVX-LC01 apresentou menor Po.Tot em comparação com o grupo DP-OVX ($p < 0,05$). Foi observada uma redução significativa na porcentagem de Po.Tot no grupo C-OVX-LC01 quando comparado com o grupo controle (C-OVX) ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas em Po.Tot entre os grupos DP-OVX e DP-

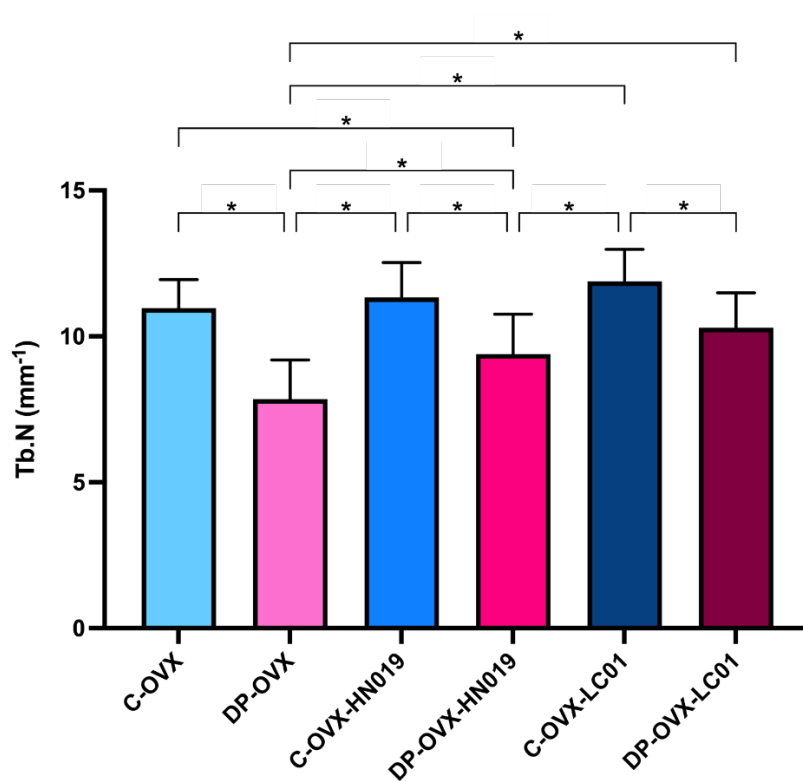
OVX-HN019, bem como entre os grupos C-OVX e C-OVX-HN019. O grupo DP-OVX-LC01 apresentou menor Po.Tot quando comparado ao grupo DP-OVX-HN019 ($p < 0,05$).

Figura 11 – Médias e desvio-padrão dos dados de porosidade óssea total (Po.Tot) dos grupos avaliados. * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).



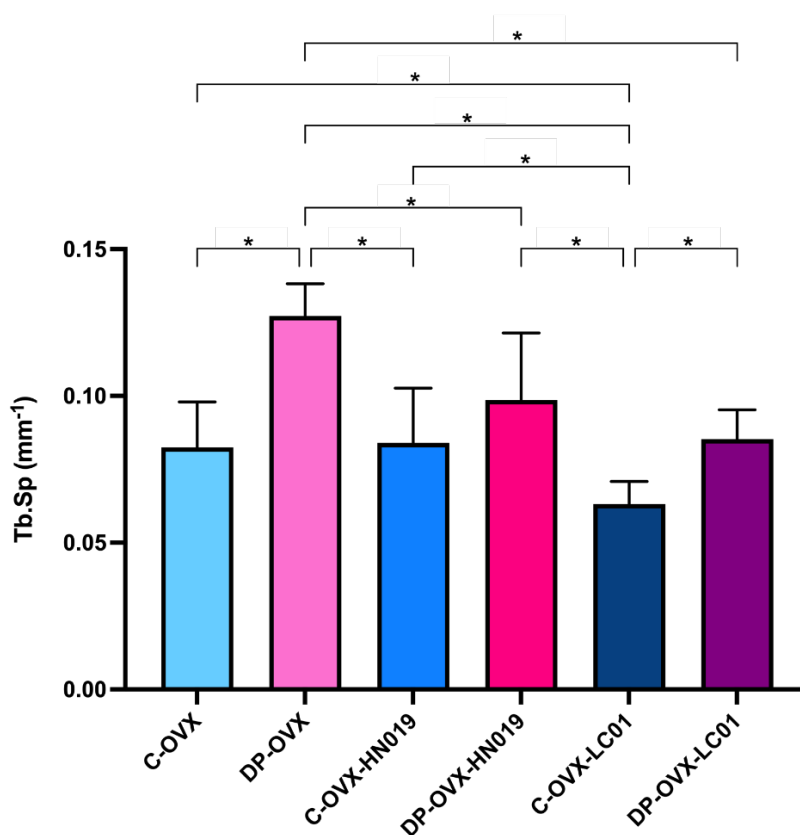
Na Figura 12, podem ser observados os dados de número de trabéculas ósseas (Tb.N). O Tb.N foi significativamente reduzido para o grupo no qual a doença periodontal foi induzida (DP-OVX), em relação ao grupo sem a doença (C-OVX) ($p < 0,05$). Os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01 apresentaram aumento significativo no Tb.N quando comparados ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). Os grupos C-OVX-HN019 e C-OVX-LC01 apresentarem valores de Tb.N semelhantes àqueles do grupo C-OVX ($p > 0,05$). Não foi observada diferença estatística no Tb.N entre os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01 ($p > 0,05$).

Figura 12 – Médias e desvio-padrão do número de trabéculas ósseas (Tb.N), em mm^{-1} , entre os grupos experimentais. * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).



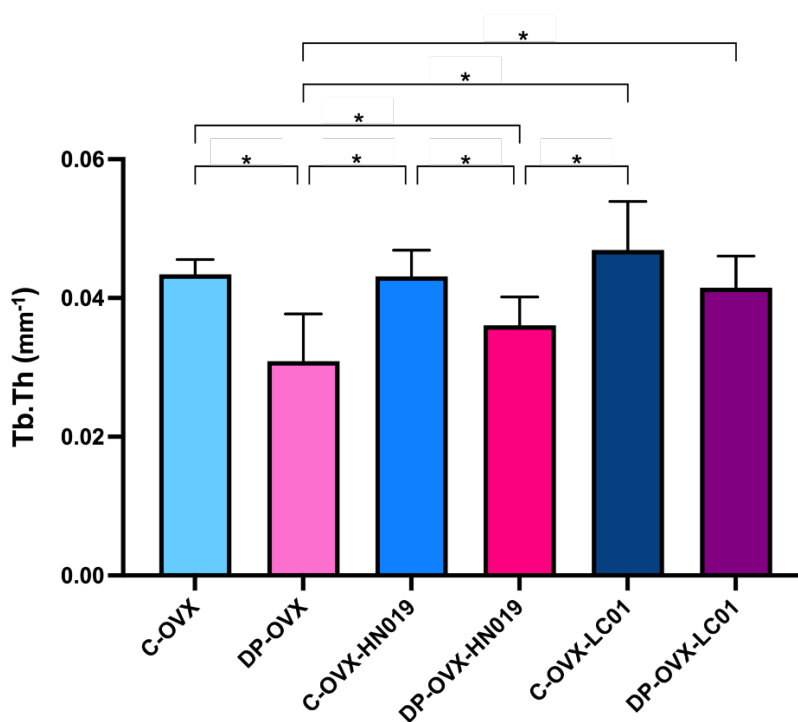
Os dados de espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp) podem ser observados na Figura 13. O grupo DP-OVX apresentou maior Tb.Sp em relação ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01 apresentaram diminuição significativa no Tb.Sp quando comparados ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). O grupo C-OVX-LC01 apresentou menor Tb.Sp quando comparado ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatística no Tb.Sp entre os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01) ($p > 0,05$).

Figura 13 – Médias e desvio padrão do espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), em mm^{-1} , para os grupos avaliados. * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).



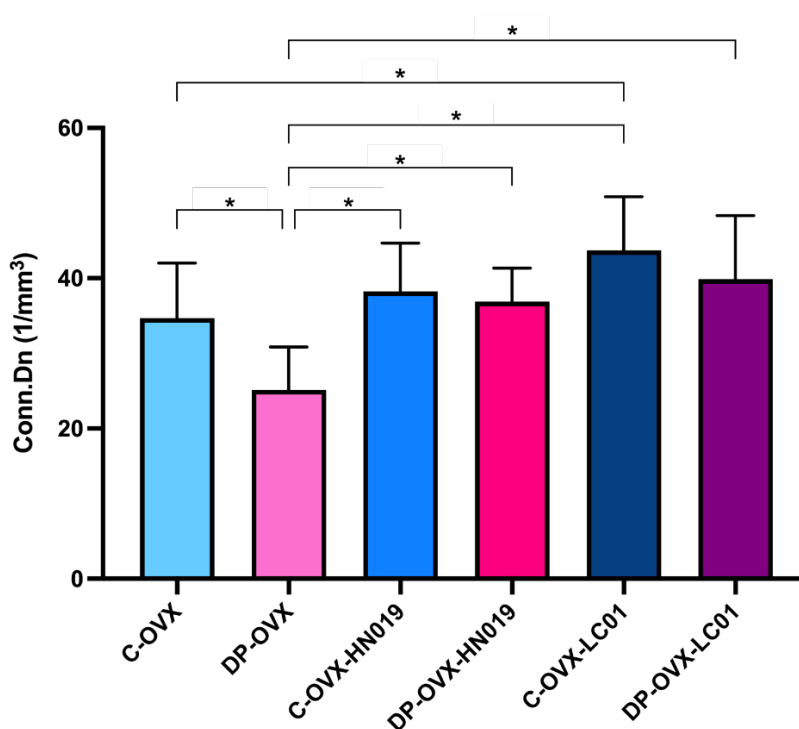
Na Figura 14 são apresentados os dados de espessura trabecular (Tb.Th) para os grupos avaliados. O grupo DP-OVX apresentou menor Tb.Th em relação ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). O grupo DP-OVX-LC01 apresentou aumento significativo nos valores de Tb.Th quando comparado ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$).

Figura 14 – Médias e desvio padrão dos dados de espessura trabecular (Tb.Sp), em mm^{-1} , para os grupos experimentais. * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).



Na Figura 15, podem ser observados os dados de densidade de conectividade (Conn.Dn). O grupo DP-OVX apresentou menores valores de Conn.Dn em relação ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Os grupos DP-HN019 e DP-OVX-LC01 apresentaram maior Conn.Dn do que o grupo DP-OVX ($p < 0,05$). Um maior valor de Conn.Dn também foi observado no grupo C-OVX-LC01 quando comparado ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística na Conn.Dn entre os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01 ($p > 0,05$).

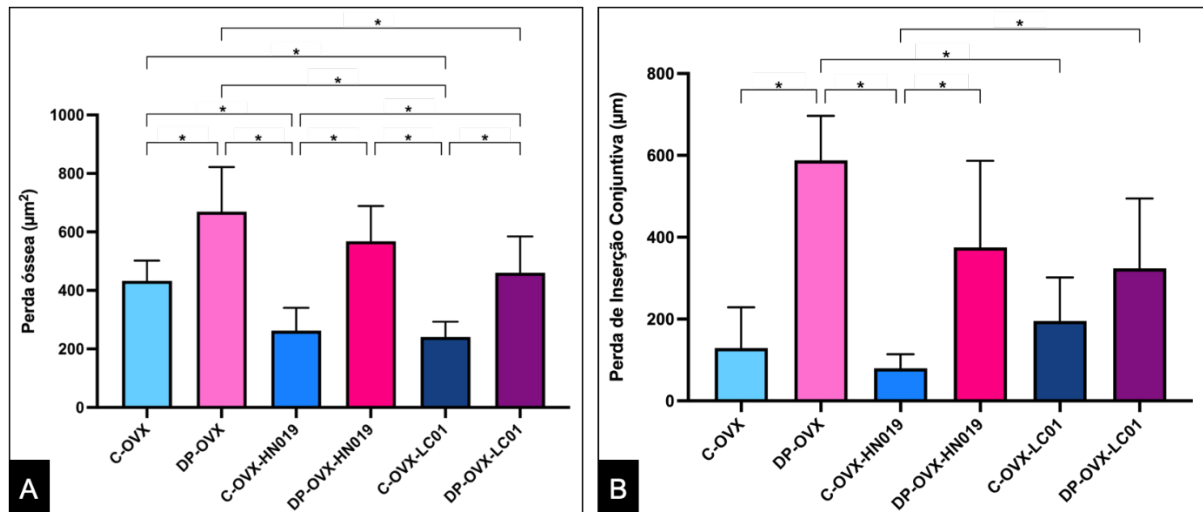
Figura 15 – Médias e desvio padrão dos dados de densidade de conectividade (Conn.Dn), em $1/\text{mm}^3$, para os grupos avaliados. * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).



4.3 Análise histomorfométrica e histopatológica dos tecidos periodontais

Na Figura 16, são apresentados os dados da perda óssea e a perda de inserção conjuntiva para os grupos avaliados. O grupo que teve a doença periodontal induzida (DP-OVX) apresentou aumento da perda óssea e de inserção conjuntiva em comparação com o controle (C-OVX) ($p < 0,05$). O grupo DP-OVX-LC01 apresentou menor perda óssea quando comparado ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). Os grupos C-OVX-HN019 e C-OVX-LC01 apresentaram menor perda óssea quando comparados ao grupo C-OVX ($p < 0,05$).

Figura 16 – (A) Médias e desvio-padrão da área de perda óssea, em micrômetros (μm^2), na região de bifurcação dos primeiros molares; (B) Médias e desvio-padrão da perda de inserção conjuntiva, em micrômetros (μm), na região interproximal entre o primeiro e segundo molares. (A) * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). (B) * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0,05$).



Nas Figuras 17 e 18, são apresentados cortes histológicos representativos dos grupos avaliados. O grupo controle C-OVX apresentou ligamento periodontal dentro dos padrões de normalidade, com grande quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e um leve infiltrado inflamatório, decorrente da osteoporose. As fibras colágenas encontravam-se interpostas e estavam inseridas no cimento e osso alveolar. O tecido ósseo na região de bifurcação apresentou crista levemente irregular com discreta aposição de osteoblastos. Na região interproximal, entre o 1^o e 2^o molar, foram observados epitélios juncional e sulcular íntegros.

Os grupos controles tratados com os probióticos, C-OVX-HN019 e C-OVX-LC01, apresentaram ligamento periodontal dentro dos padrões de normalidade, com grande quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e discreto infiltrado inflamatório. As fibras colágenas encontravam-se interpostas e estavam inseridas no cimento e osso alveolar. O tecido ósseo na região de bifurcação, rico em osteócitos, apresentou crista regular com aposição de osteoblastos (Figura 17). Na região interproximal, entre o 1^o e 2^o molar, foram observados epitélios juncional e sulcular íntegros (Figura 18).

O grupo DP-OVX, com doença periodontal induzida e não tratado com nenhuma cepa probiótica, apresentou tecido conjuntivo com poucos fibroblastos, fibras colágenas desorganizadas e desconexas com a alta presença de edema intersticial e extenso infiltrado inflamatório crônico. Em algumas regiões, o tecido conjuntivo apresentou intenso infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos. O tecido ósseo e cimento radicular na região

de bifurcação apresentaram contorno irregular e áreas de reabsorção ativa (Figura 17). Na região interproximal, entre o 1º e 2º molares, foi observados danos estruturais no epitélio sulcular e migração apical do epitélio juncional (Figura 18).

Os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01, com doença periodontal induzida e tratados com os probióticos avaliados no estudo, quando comparados ao grupo com doença periodontal não tratado (DP-OVX), apresentaram tecido conjuntivo com maior quantidade de fibroblastos, menor presença de edema intersticial, menor infiltrado inflamatório e fibras colágenas mais organizadas e interpostas entre o osso alveolar e o cimento, sendo essas características mais evidentes no grupo DP-OVX-LC01. O tecido ósseo na região de bifurcação apresentou contorno regular e arquitetura em platô decorrente do processo de reabsorção óssea. Uma menor atividade de reabsorção foi observada no grupo DP-OVX-LC01 quando comparado ao grupo DP-OVX-HN019. O cimento radicular apresentou contorno regular e ausência de áreas de reabsorção (Figura 17). Na região interproximal, entre o 1º e 2º molares, foram observados menores danos estruturais no epitélio sulcular e menor deslocamento apical do epitélio juncional.

Imagens histológicas representativas dos tecidos periodontais de todos os grupos experimentais podem ser visualizadas nas Figuras 17 e 18.

Figura 17 - Tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º molar inferior dos grupos C-OVX (A, B, C), C-OVX-HN019 (D, E, F), C-OVX-LC01 (G, H, I), DP-OVX (J, K, L), DP-OVX-HN019 (M, N, O) e DP-OVX-LC01 (P, Q, R). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 1,6x (A, D, G, J, M, P); 10x (B, E, H, K, N, Q); 20x (C, F, I, L, O, R). OA = osso alveolar; LP = ligamento periodontal; TC = tecido conjuntivo.

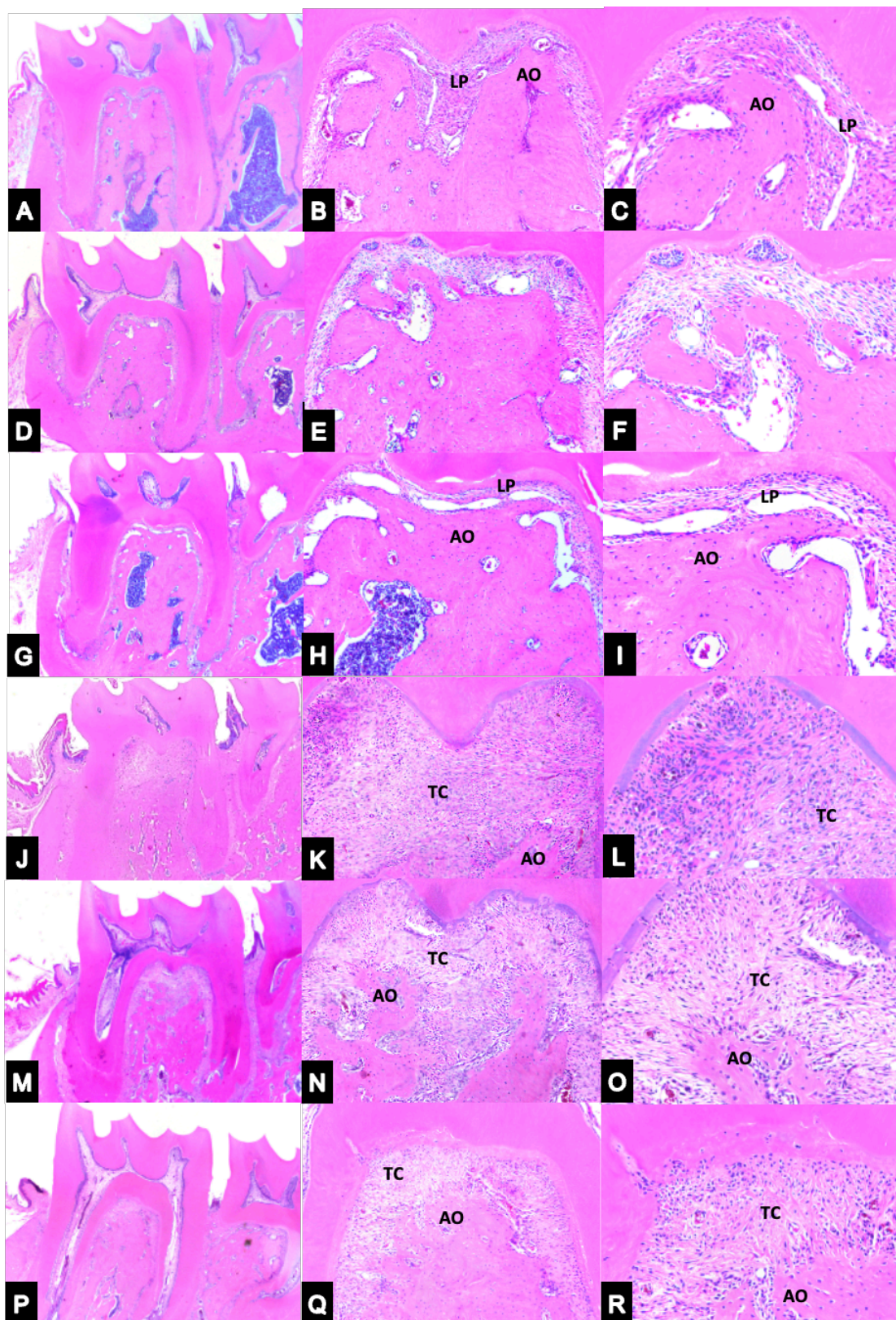
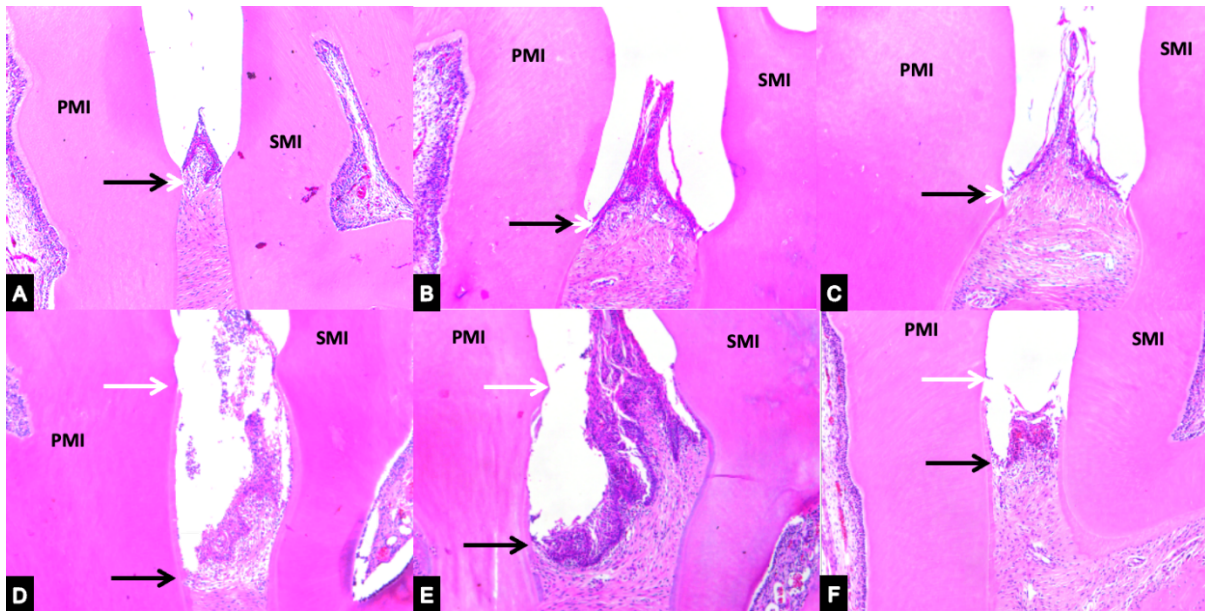


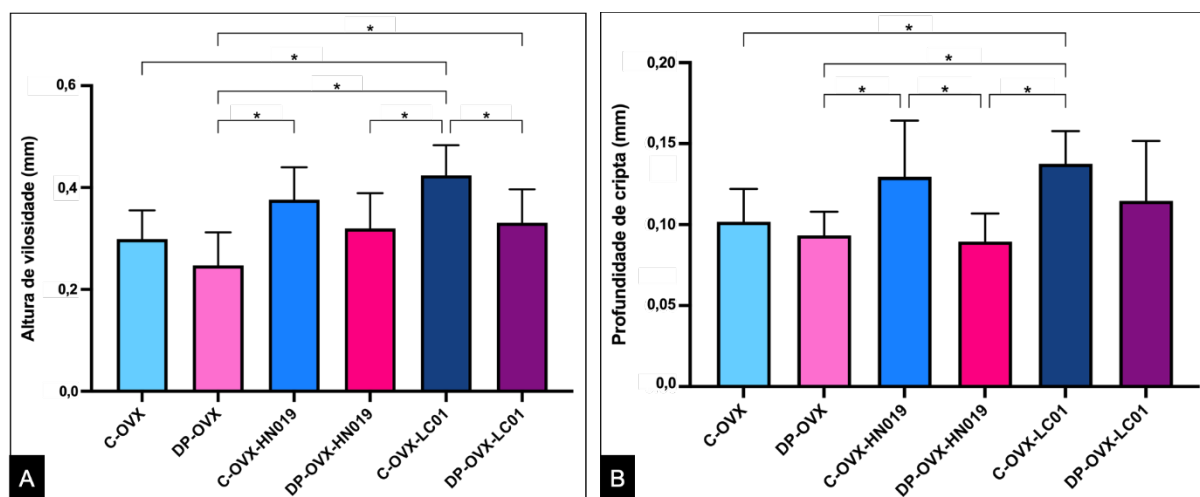
Figura 18 - Tecidos periodontais da região interproximal entre o 1° e 2° molar inferior dos animais dos grupos C-OVX (A), C-OVX-HN019 (B), C-OVX-LC01 (C), DP-OVX (D), DP-OVX-HN019 (E) e DP-OVX-LC01 (F). Ampliação original = 10x. PMI = primeiro molar inferior; SMI = segundo molar inferior; Seta branca = junção cimento-esmalte; Seta preta = inserção conjuntiva.



4.4 Análise histomorfométrica e histopatológica dos tecidos intestinais

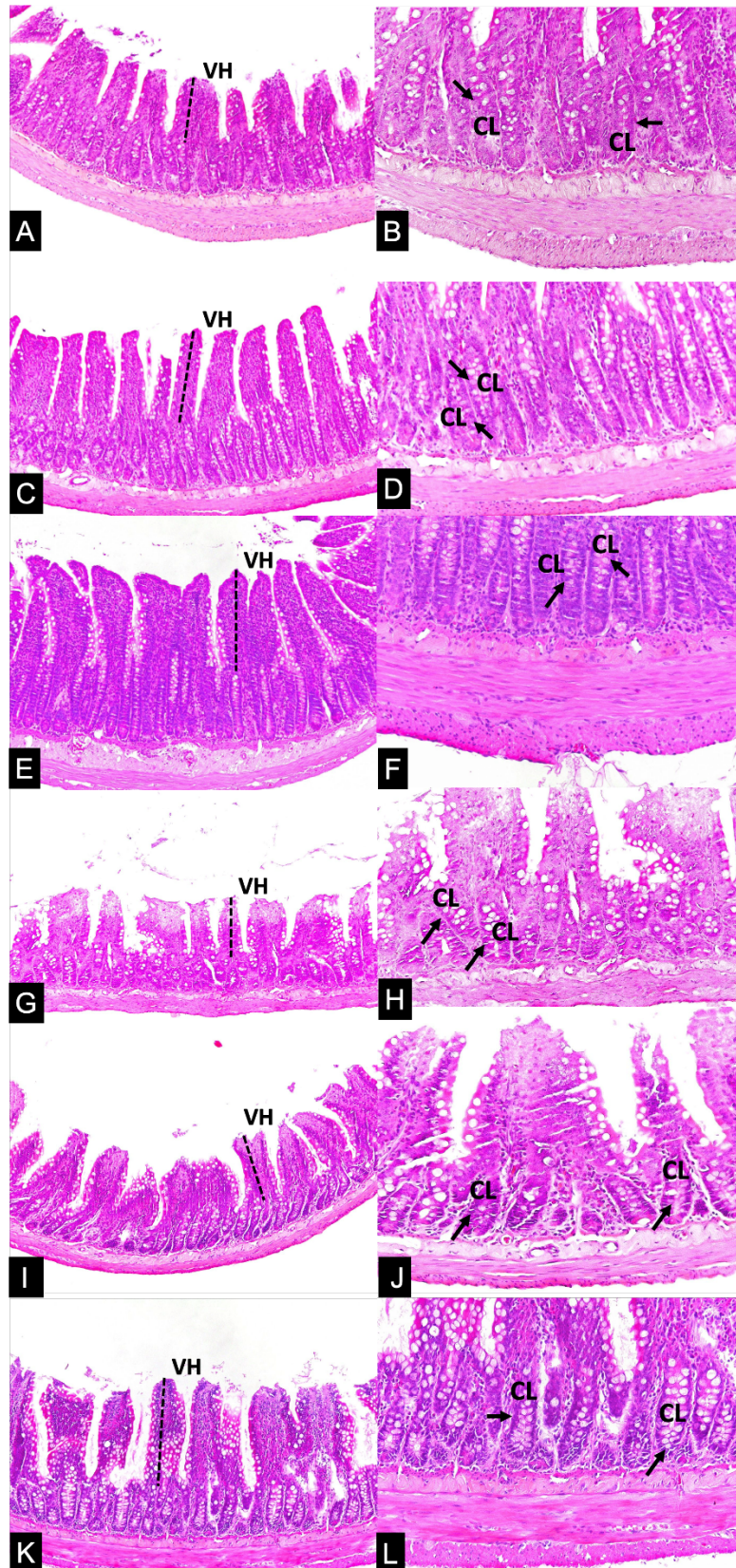
Na Figura 19 A e B, são apresentados os dados da média e desvio-padrão da altura de vilosidade e profundidade de cripta intestinais para os grupos avaliados. O grupo que teve a doença periodontal induzida (DP-OVX) não apresentou uma alteração na altura de vilosidades e profundidade de criptas em comparação com o controle (C-OVX) ($p > 0,05$). O grupo DP-OVX-LC01 apresentou maior altura das vilosidades intestinais quando comparado ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). O grupo C-OVX-LC01 apresentou maior altura de vilosidades e profundidade de criptas quando comparado ao grupo C-OVX ($p < 0,05$).

Figura 19 - Médias e desvio-padrão da (A) altura de vilosidade no intestino delgado, em milímetros; (B) profundidade de cripta, em milímetros no intestino delgado. * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).



Na Figura 20 (A-L) são apresentados cortes histológicos representativos do tecido intestinal dos grupos avaliados. Na análise histopatológica, observou-se estrutura intestinal normal nos grupos C-OVX-HN019 e C-OVX-LC01, caracterizada por camada mucosa apresentando vilosidades recobertas por epitélio cilíndrico simples, células calciformes e cripta de Lieberkühn. Nos grupos C-OVX-HN019 e C-OVX-LC01, a cripta de Lieberkühn e as vilosidades desenvolveram-se e apresentaram maior número de células calciformes quando comparadas aos demais grupos (Figura 20 C-F). Os animais do grupo DP-OVX apresentaram defeitos de vilosidades, estratificação epitelial, degeneração da lâmina basal e infiltração de neutrófilos no intestino delgado (Figura 20 G-H). Os animais C-OVX apresentaram defeitos de vilosidades, estratificação epitelial e leve infiltrado de neutrófilos (Figura 20 A-B). O grupo DP-OVX-LC01 apresentou um aumento na altura das vilosidades em comparação com o grupo DP-OVX (Figura 20 G, H e K, L). Já o grupo DP-OVX-HN019 não apresentou alteração significativa em relação ao grupo DP-OVX (Figura 20 G, H e I, J).

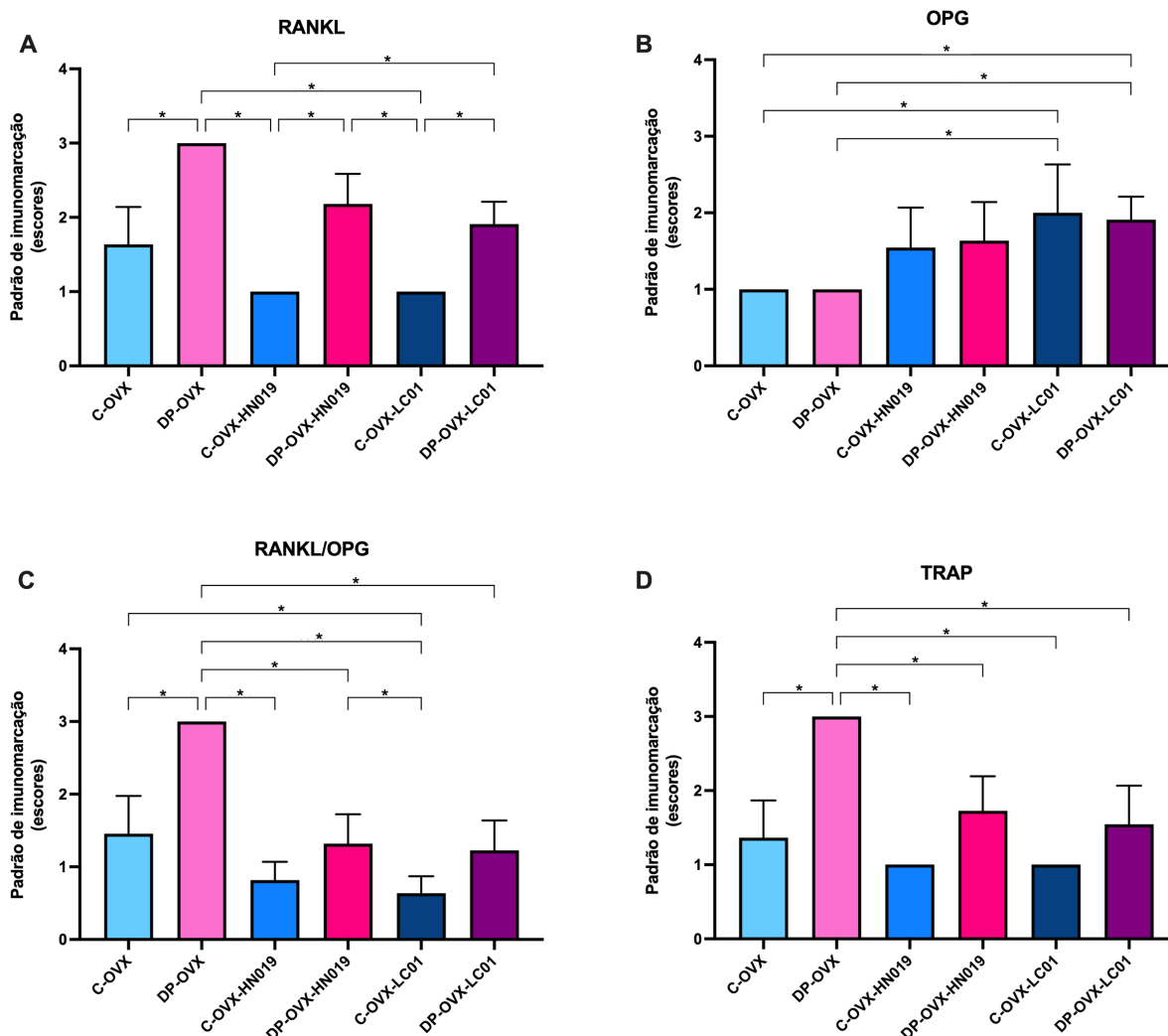
Figura 20 - Tecidos intestinais da região do jejuno dos animais. Grupos: C-OVX (A, B), C-OVX-HN019 (C, D), C-OVX-LC01 (E, F), DP-OVX (G, H), DP-OVX-HN019 (I, J) e DP-OVX-LC01 (K, L). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10 x (A, C, E, G, I, K); 20x (B, D, F, H, J, L). VH= Altura da Vilosidade; CL= Cripta de Lieberkühn. As setas demonstram as criptas e glândulas.



4.5 Análise imunohistoquímica dos tecidos periodontais

As médias e desvios-padrão da expressão dos marcadores RANKL, OPG, TRAP e da razão RANKL/OPG estão representadas na Figura 21 A-D. Os resultados imunohistoquímicos mostraram que a doença periodontal (DP-OVX) aumentou significativamente a expressão de RANKL, TRAP e da razão RANKL/OPG, em comparação com o grupo controle (C-OVX) ($p < 0,05$). Os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01 apresentaram menor expressão de TRAP e menor razão RANKL/OPG quando comparados ao grupo DP-OVX) ($p < 0,05$). O grupo DP-OVX-LC01 também apresentou maior expressão de OPG quando comparado ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). O grupo C-OVX-LC01 apresentou maior expressão de OPG e menor razão RANKL/OPG quando comparado ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01 para todos os parâmetros investigados ($p > 0,05$).

Figura 21 – Médias e desvio-padrão dos escores para imunomarcagem de (A) RANKL, (B) OPG, (C) RANKL/OPG e (D) TRAP. * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0,05$).



Nas Figuras 22 a 24 são apresentadas fotomicrografias representativas da imunomarcagem nos tecidos periodontais avaliados na região de bifurcação do primeiro molar. A imunomarcagem de RANKL e OPG foi predominantemente expressa em fibroblastos do tecido conjuntivo e do ligamento periodontal adjacente ao osso alveolar. A imunomarcagem de TRAP foi observada em células precursoras de osteoclastos, assim como em osteoclastos maduros aderidos e não aderidos. A imunomarcagem para RANKL foi maior no tecido conjuntivo nos grupos nos quais a doença periodontal foi induzida, em comparação com o grupo controle. Para o marcador OPG, houve uma maior imunomarcagem no grupo C-OVX-LC01. O padrão de imunomarcagem para TRAP mostrou uma maior expressão de osteoclastos multinucleados com expressão positiva para TRAP para o grupo com indução da doença periodontal.

Figura 22 - Padrão de imunomarcção para RANKL na região de bifurcação do primeiro molar. (a – f) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção para RANKL nos grupos C-OVX (a), C-OVX-HN019 (b), C-OVX-LC01 (c), DP-OVX (d), DP-OVX-HN019 (e), DP-OVX-LC01 (f). Abreviações: lp, ligamento periodontal; ao, osso alveolar; tc, tecido conjuntivo. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30µm. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*.

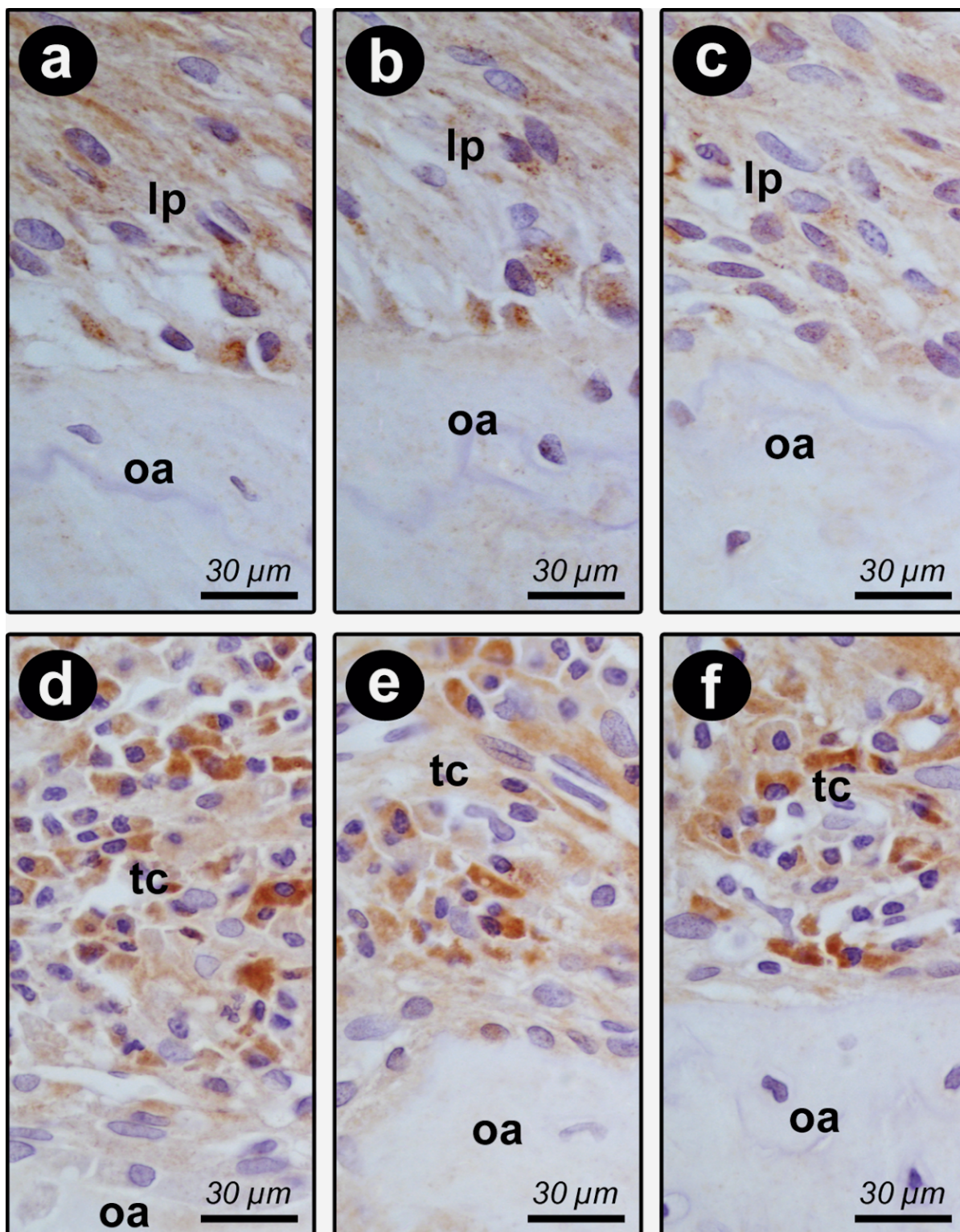


Figura 23 - Padrão de imunomarcção para OPG na região de bifurcação do primeiro molar. (a – f) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção para OPG nos grupos C-OVX (a), C-OVX-HN019 (b), C-OVX-LC01 (c), DP-OVX (d), DP-OVX-HN019 (e), DP-OVX-LC01 (f). Abreviações: **lp**, ligamento periodontal; **ao**, osso alveolar; **tc**, tecido conjuntivo. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30µm. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*.

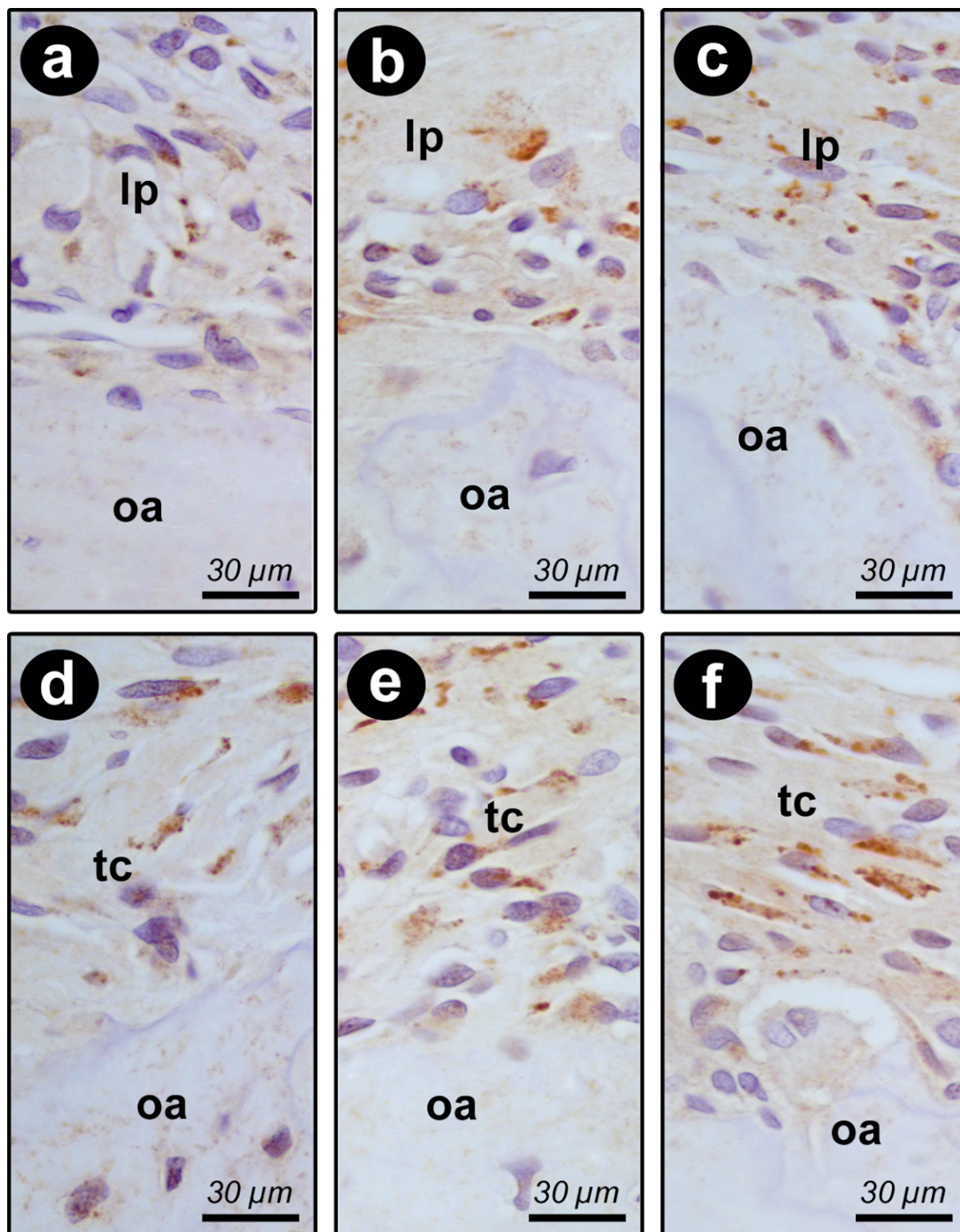
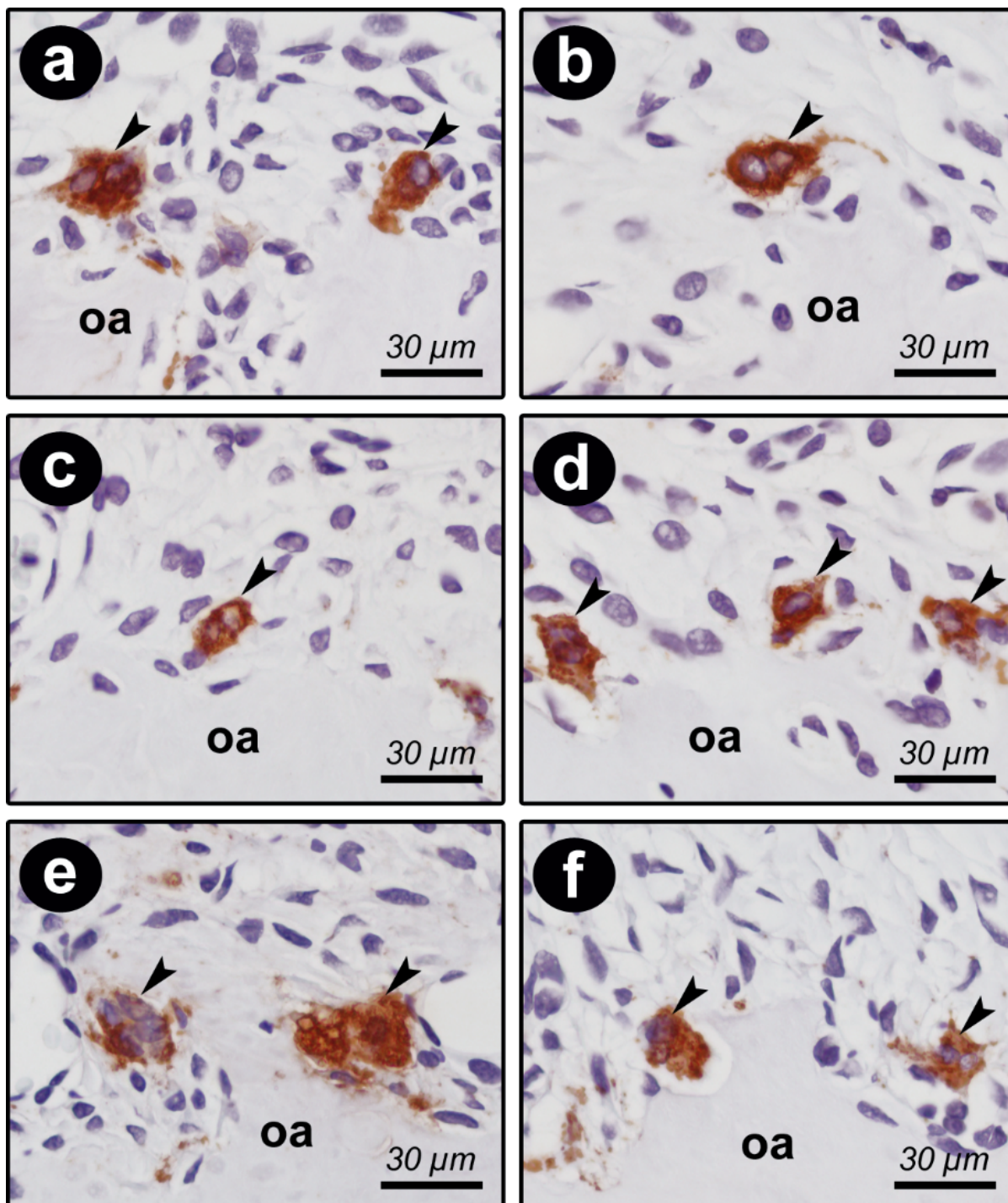


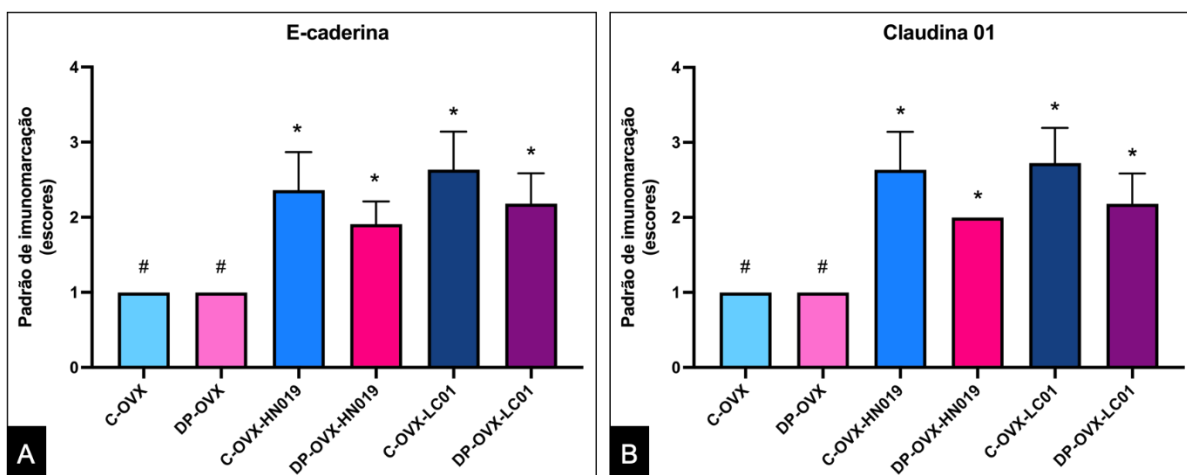
Figura 24 - Padrão de imunomarcção para TRAP na região de bifurcação do primeiro molar. (a – f) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção para TRAP nos grupos C-OVX (a), C-OVX-HN019 (b), C-OVX-LC01 (c), DP-OVX (d), DP-OVX-HN019 (e), DP-OVX-LC01 (f). Abreviações: oa, osso alveolar; setas pretas, osteoclastos. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.



4.6 Análise imunohistoquímica para E-caderina e Claudina-1 no intestino

A média e desvio-padrão da expressão de proteínas de junção epitelial (E-caderina e Claudina-1) nos tecidos intestinais está representada na Figura 25 A e B. A imunomarcagem no tecido intestinal demonstrou uma significativa menor quantidade de proteínas de junção (E-caderina e Claudina-1) nos grupos sem administração de probióticos (C-OVX e DP-OVX) ($p < 0,05$). Uma maior expressão de E-caderina e Claudina-1 foi encontrada nos grupos que tiveram administração de probióticos (C-OVX-HN019, C-OVX-LC01, DP-OVX-LC01 e DP-OVX-LC01), quando comparados aos grupos sem probióticos (C-OVX e DP-OVX) ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre as cepas probióticas, tanto para o grupo controle (C-OVX-HN019 e C-OVX-LC01) quanto para o grupo com doença periodontal induzida (DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01) ($p > 0,05$).

Figura 25 – Médias e desvio-padrão dos escores para imunomarcagem de (A) E-caderina e (B) Claudina-1. Símbolos diferentes representam diferenças significativas entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0,05$).



Nas Figuras 26 e 27 são apresentadas fotomicrografias representativas da imunomarcagem para E-caderina e Claudina-1 nas vilosidades e nas criptas intestinais. A imunomarcagem para E-caderina e Claudina-1 foi predominantemente expressa no epitélio juncional intestinal e nas glândulas intestinais, com intensidade mais evidente para os grupos nos quais houve a suplementação com probióticos.

Figura 26 - Padrão de imunomarcção para E-caderina no intestino. (a – l) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção para E-caderina no epitélio intestinal (a – c e g – i) e nas glândulas intestinais (d – f e j – l) nos grupos C-OVX (a, d), C-OVX-HN019 (b, e), C-OVX-LC01 (c, f), DP-OVX (g, j), DP-OVX-HN019 (h, k), DP-OVX-LC01 (i, l). Abreviações: *, luz intestinal; ep, epitélio intestinal; gl, glândulas intestinais; tc, tecido conjuntivo. Aumento original: a – c e g – h, 2000x; d – f e j – l, 1000x. Barras de escala: a – c e g – h, 30µm; d – f e j – l, 50µm. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*.

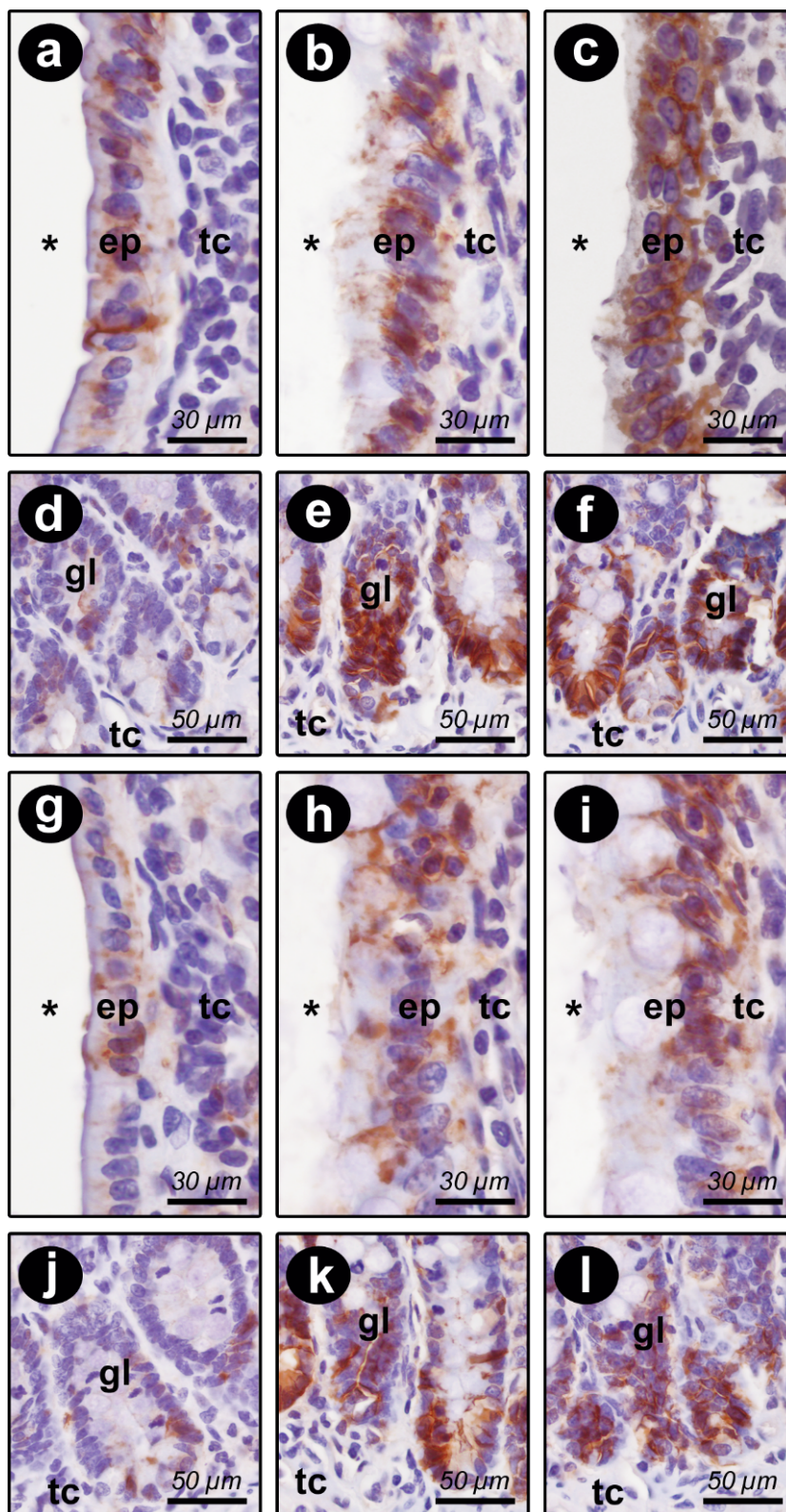
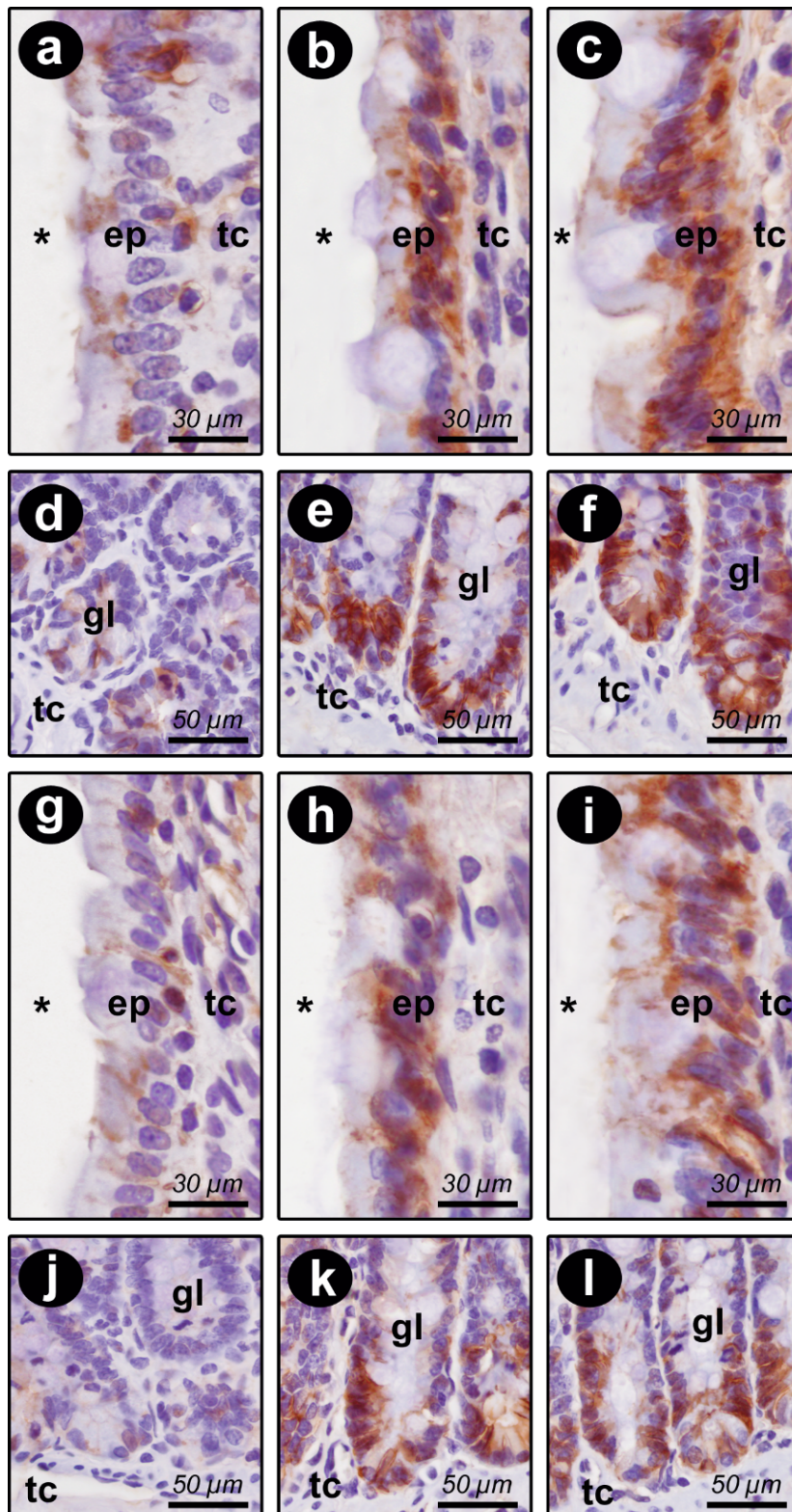


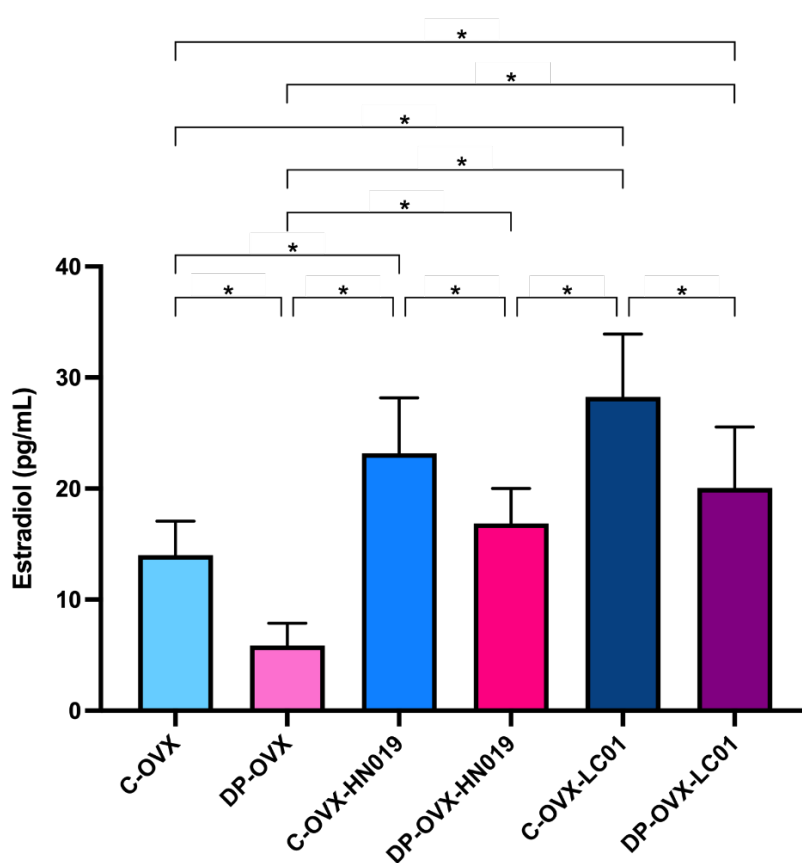
Figura 27 - Padrão de imunomarcção para Claudina-1 no intestino. (a – l) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção para Claudina-1 no epitélio intestinal (a – c e g – i) e nas glândulas intestinais (d – f e j – l) nos grupos C-OVX (a, d), C-OVX-HN019 (b, e), C-OVX-LC01 (c, f), DP-OVX (g, j), DP-OVX-HN019 (h, k), DP-OVX-LC01 (i, l). Abreviações: *, luz intestinal; ep, epitélio intestinal; gl, glândulas intestinais; tc, tecido conjuntivo. Aumento original: a – c e g – h, 2000x; d – f e j – l, 1000x. Barras de escala: a – c e g – h, 30µm; d – f e j – l, 50µm. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*.



4.7 Análise imunoenzimática (ELISA) da concentração sanguínea de estradiol

Na Figura 28, são apresentados os dados da média e desvio-padrão dos níveis sanguíneos de estradiol para os grupos avaliados. Os resultados demonstraram que a doença periodontal (DP-OVX) reduziu significativamente os níveis de estradiol em comparação com o grupo controle (C-OVX) ($p < 0,05$). Os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01 apresentaram maiores níveis de estradiol quando comparados ao grupo DP-OVX ($p < 0,05$). Os grupos C-OVX-LC01 e C-OVX-HN019 também apresentaram maiores níveis de estradiol quando comparados ao grupo C-OVX ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos DP-OVX-HN019 e DP-OVX-LC01 para os níveis de estradiol ($p > 0,05$).

Figura 28 - Médias e desvio-padrão dos níveis sanguíneos de estradiol (pg/mL). * = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).



5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito de dois agentes probióticos, *Bifidobacterium animalis subs. lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) e *Lactobacillus casei* 01 (*L. casei* 01), na periodontite experimental em ratas com osteoporose induzida por meio de OVX. Os resultados, de forma geral, demonstraram que a terapia probiótica melhorou a arquitetura do osso alveolar e reduziu a destruição tecidual decorrente da periodontite experimental, além de melhorar a permeabilidade intestinal e níveis de estradiol. O modelo de OVX em ratas é aprovado como modelo pré-clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o estudo da osteoporose (como consequência da diminuição da produção endógena do estrogênio pelos ovários) e de potenciais intervenções capazes de preservar o metabolismo ósseo na pós-menopausa. A ovariectomia promove efeito deletérios sistêmicos (redução da permeabilidade intestinal e baixo níveis de estradiol) e locais (perda de osso alveolar) (ANBINDER *et al.*, 2016; COLLINS *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015; TANAKA *et al.*, 2002). As alterações induzidas pela OVX neste modelo pré-clínico são detectadas por histomorfometria tradicional, tomografia computadorizada quantitativa periférica (pQCT) e microtomografia computadorizada (micro-CT) (JOHNSTON; WARD, 2015). Neste estudo, a terapia probiótica foi iniciada dois meses (8 semanas) após a OVX, ou seja, já em situações adversas de metabolismo ósseo e deficiência de estrogênio. Considerando a expectativa de vida dos ratos, as 5 semanas que se passaram desde a OVX correspondem a mudanças que ocorrem em mulheres por cerca de 3 anos em condições de deficiência de estrogênio (QUINN, 2005; SENGUPTA, 2013).

A depleção de estrógeno resulta em aumento da perda óssea em várias partes do corpo, incluindo o osso alveolar. Os estudos evidenciam que a osteoporose aumenta significativamente a perda óssea alveolar, mesmo em condições de saúde periodontal (JEFFCOAT *et al.*, 2000). Alguns estudos relataram mudanças na estrutura óssea alveolar (AMMANN, 2007; TANAKA *et al.*, 2002; MAVROPOULOS; RIZZOLI; YANG *et al.*, 2007), e outros relataram reduções significativas na densidade mineral óssea do osso alveolar (JIANG; MATSUMOTO; FUJII, 2003; KURODA *et al.*, 2003). No presente estudo, pode-se inferir que a osteoporose, de fato, reduziu o volume do osso alveolar nos animais do grupo sem periodontite experimental. Os animais dos grupos C-OVX e C-OVX-HN019 apresentaram volume ósseo médio na região de bifurcação do 1º molar inferior bastante reduzido quando comparado àquele reportado por Oliveira *et al.* (2017) em animais sistemicamente saudáveis. Enquanto no presente estudo o volume ósseo médio desses grupos foi aproximadamente 50%, no estudo de Oliveira *et al.* (2017) o volume médio dos grupos sem doença periodontal foi próximo de 70%.

A periodontite é uma doença multifatorial e certas condições sistêmicas, como a osteoporose, são considerados fatores adicionais que aumentam o risco dessa doença. Embora a osteoporose não seja a causa primária, ela tem um impacto significativo na periodontite, afetando o tecido ósseo alveolar e trabecular. É importante levar em consideração a vulnerabilidade individual à periodontite. Quando combinada com a presença da osteoporose, essa condição pode deixar um hospedeiro ainda mais suscetível a uma inflamação periodontal não controlada e a um estado de fragilidade (GARCIA; HENSHAW; KRALL, 2001). Estudos na literatura também indicam fortemente que a osteoporose pode acentuar a perda óssea resultante da periodontite (AMADEI *et al.*, 2011; DUARTE *et al.*, 2006; GOMES-FILHO *et al.*, 2007; REINHARDT *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2015). O presente estudo mostrou que a osteoporose, em combinação com a periodontite, resulta em efeitos adicionais negativos nos parâmetros ósseos alveolares, conforme evidenciado pela comparação volumétrica entre o grupo DP-OVX e o C-OVX. Embora este estudo não tenha avaliado especificamente a indução da periodontite em condições normosistêmicas, a comparação dos resultados com um estudo prévio conduzido pelo nosso grupo de pesquisa revelou uma redução de cerca de 50% no volume ósseo e um aumento na porosidade óssea (Po.Tot) (OLIVEIRA *et al.*, 2023). Esses achados, portanto, confirmam as evidências da literatura que sugerem que a osteoporose exerce um efeito complementar a periodontite.

Por outro lado, a periodontite tem sido demonstrada como agravante dos efeitos sistêmicos da osteoporose (ANBINDER *et al.*, 2016). Maior perda óssea femoral e mandibular foram observadas em animais submetidos à periodontite experimental e OVX quando comparados àqueles submetidos a ambas as condições isoladamente (ANBINDER *et al.*, 2016). No presente estudo, observou-se uma redução significativa nos níveis de estradiol no grupo DP-OVX em comparação com o grupo controle C-OVX. Então, pode-se constatar que a indução de periodontite intensificou ainda mais a depleção de estrogênio em ratas submetidas à OVX, promovendo efeitos adversos na microarquitetura óssea. Esses efeitos foram claramente demonstrados nas avaliações imunohistoquímicas de marcadores da remodelação óssea. O grupo DP-OVX, com níveis mais baixos de estradiol do que o grupo C-OVX, também apresentou maior expressão de TRAP e RANKL, bem como uma maior razão RANKL/OPG quando comparado ao grupo C-OVX.

A periodontite isoladamente também tem se mostrado capaz de alterar a morfologia intestinal (MESSORA *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2023). No presente estudo, embora tenha sido observado, na análise histopatológica do intestino, menores alturas de vilosidades e profundidade de criptas no grupo DP-OVX quando comparado ao grupo C-OVX, essa diferença

não foi estatisticamente significativa. É possível que a osteoporose tenha impactado nos resultados observados. A osteoporose por si só pode afetar diversos parâmetros intestinais, como já demonstrado na literatura (LYU *et al.*, 2023). Assim, é possível que as alterações intestinais promovidas pela OVX no grupo C-OVX tenham reduzido a possibilidade de detecção significativa de diferenças nos parâmetros intestinais desse grupo quando comparado ao grupo DP-OVX.

No presente estudo, foi possível avaliar o efeito da terapia probiótica em animais com osteoporose isoladamente, sobretudo no osso alveolar. A suplementação nutricional com probióticos tem sido estudada para modular a microbiota intestinal e o sistema imunológico (HSU; PACIFICI, 2018; LI *et al.*, 2016; TEUGHELIS *et al.*, 2013). Probióticos têm sido avaliados com sucesso em diversas condições, incluindo distúrbios gastrointestinais (RITCHIE; ROMANUK, 2012), condições relacionadas ao sistema imunológico (BAKHSHANDEH, 2023; CARDOSO *et al.*, 2020), doenças metabólicas (MOREIRA *et al.*, 2023) e patologias orais, como a doença periodontal (MESSORA *et al.* 2013). A literatura indica que probióticos podem prevenir a perda de massa óssea associada à depleção de estrogênio (BRITTON *et al.*, 2014; OHLSSON *et al.*, 2014; PARVANEH *et al.*, 2014). Além disso, eles estão envolvidos na regulação de proteínas de junção na camada epitelial intestinal, reduzindo a permeabilidade intestinal e a inflamação (LI *et al.*, 2016). Este estudo foi o primeiro a comparar os efeitos decorrente da administração de duas cepas probióticas diferentes, *B. lactis* HN019 e *L. casei* 01, no osso alveolar em animais com osteoporose experimental. A cepa *L. casei* 01 proporcionou maior efetividade para redução dos danos locais e sistêmicos da osteoporose. Considerando os grupos sem periodontite experimental, apenas o grupo C-OVX-LC01 apresentou maiores valores de BV/TV e Conn.Dn, bem como menores valores de Po.Tot e Tb.Sp na análises microtomográficas do osso alveolar quando comparado ao grupo C-OVX, o que sugere um efeito protetor da terapia probiótica na perda de osso alveolar e na preservação da microarquitetura óssea. Esse efeito protetor da terapia probiótica foi também atestado nas análises imunohistoquímicas dos tecidos periodontais que investigaram a expressão de marcadores da remodelação óssea. Observou-se uma expressão significativamente maior de OPG e uma redução na razão RANKL/OPG no grupo C-OVX-LC01 quando comparado ao grupo C-OVX. Sistemicamente, a suplementação com *L. casei* 01 alterou positivamente a morfologia intestinal, aumentando a altura das vilosidades e a profundidade das criptas de Lieberkühn. Por outro lado, resultados semelhantes não foram observados para o grupo C-OVX-HN019, o que demonstra um efeito cepa-específico da terapia probiótica para mitigar os danos decorrentes da osteoporose experimental, sobretudo no osso alveolar. Esses achados

estão de acordo com estudos anteriores que investigaram os efeitos de várias cepas probióticas em ratas ovariectomizadas (CHEN *et al.*, 2021; MONTAZERI-NAJAFABADY *et al.*, 2018). Montazeri-Najafabady *et al.* (2018) investigaram os efeitos de cinco cepas probióticas diferentes em parâmetros ósseos do fêmur, da coluna e da tíbia de ratas ovariectomizadas. Os autores verificaram, dentre as cepas avaliadas, maior capacidade de *L. acidophilus* e *L. casei* na prevenção da perda óssea em ratas ovariectomizadas. Esses resultados são consistentes com as descobertas relatadas por Chen *et al.* (2021), nas quais uma cepa específica (*Lactobacillus plantarum* 30M5) apresentou um aumento mais pronunciado nos níveis de estradiol em comparação com a outra cepa testada (*Bifidobacterium longum* 15M1).

O presente estudo demonstrou que, mesmo após a indução da periodontite, a terapia probiótica foi capaz de reduzir os efeitos prejudiciais sistêmicos da depleção nos níveis de estrogênio, corroborando com os resultados de JIA *et al.* (2022). Os probióticos administrados proporcionaram um aumento na expressão de proteínas de junção (E-caderina e Claudina-1), promovendo, possivelmente, uma redução da permeabilidade intestinal. Adicionalmente, os probióticos aumentaram significativamente os níveis de estradiol, os quais foram marcadamente reduzidos na presença da periodontite experimental. Esses achados revelam alguns mecanismos pelos quais se justificam os efeitos protetores da terapia probiótica na perda óssea alveolar. Os efeitos dos probióticos na camada epitelial do intestino delgado e na regulação das proteínas de junção que formam a camada epitelial intestinal são de grande relevância para o contexto terapêutico e preventivo da terapia probiótica na associação osteoporose-periodontite. Os resultados do presente estudo estão de acordo com aqueles relatados por Li *et al.* (2016). Os autores demonstraram que o tratamento de camundongos ovariectomizados com *L. rhamnosus* GG ou com um produto comercialmente disponível contendo oito cepas probióticas diferentes reduziu a perda óssea femoral induzida por OVX e proporcionou aumento da massa óssea. Esses efeitos correlacionaram-se com uma diminuição na permeabilidade e inflamação intestinais, bem como com uma redução dos níveis inflamatórios sistêmicos.

A redução da permeabilidade intestinal proporcionada pelos probióticos resulta no fortalecimento da barreira intestinal. Uma barreira intestinal mais forte leva a uma menor apresentação de antígenos e a uma menor ativação de células imunes intestinais (HSU; PACIFICI, 2018). Dessa forma, estratégias terapêuticas tendo como alvo o ambiente intestinal, modulando aspectos imunoinflamatórios e microbiológicos desse ambiente, podem ser abordagens promissoras para o tratamento da periodontite e da osteoporose. A interação entre a microbiota intestinal e o sistema esquelético, incluindo a modulação das reações inflamatórias

induzidas pela deficiência de estrogênio, parece bem estabelecida (CASTANEDA *et al.*, 2020; HSU; PACIFICI, 2018; IBAÑEZ *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2020; TU *et al.*, 2021). Há um crescente corpo de dados demonstrando que a deficiência de estrogênio leva a alterações na microbiota intestinal, o que pode contribuir para o desenvolvimento de osteoporose (BEHERA *et al.*, 2020; IBAÑEZ *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2020; TU *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2017), e que a administração de probióticos pode exercer efeitos favoráveis, retardando o processo (BEHERA *et al.*, 2020; BRITTON *et al.*, 2014; DAR *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2016; SAPRA *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2017). Da mesma forma, diversos estudos tem demonstrado que a periodontite está relacionada com alterações inflamatórias intestinais (BAO *et al.*, 2022; KITAMOTO; KAMADA, 2022). A administração de probióticos pode reduzir as alterações intestinais (morfológicas, imunológicas e microbiológicas) e, conseqüentemente, as sequelas decorrentes da periodontite no osso alveolar (MESSORA *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2023; RICOLDI *et al.*, 2017).

Os resultados deste estudo sugerem que o uso da terapia probiótica na osteoporose pode modificar a microarquitetura do osso alveolar e preservando-o dos danos decorrentes da osteoporose associada a periodontite e tornando-o mais resistente a desafios inflamatórios e microbiológicos. Estudos prévios já demonstraram que o uso de probióticos para o tratamento de ambas as condições, quando presentes isoladamente, proporcionou resultados promissores (OLIVEIRA *et al.*, 2017; PARVANEH *et al.*, 2015; RICOLDI *et al.*, 2017). Apenas um estudo prévio, avaliou os efeitos de probióticos na associação periodontite-osteoporose. Em 2022, JIA *et al.* mostraram que a administração de uma combinação de cepas probióticas preveniu significativamente a reabsorção óssea periodontal em ratas submetidas à OVX, promovendo mudanças microbiológicas e imunológicas no ambiente intestinal. Contudo, não foi possível observar neste estudo a contribuição individual de cada cepa para os resultados observados. No presente estudo, uma comparação direta foi estabelecida na avaliação dos efeitos de duas cepas probióticas diferentes, utilizadas isoladamente, na associação osteoporose-periodontite. Resultados mais expressivos na prevenção de perda de osso alveolar foram encontrados para a cepa probiótica *L. casei* 01 quando comparada com *B. lactis* HN019. Considerando os grupos com periodontite e tratados com probióticos, apenas o grupo DP-OVX-LC01 apresentou significativamente maiores valores para BV/TV e Tb.Th, bem como menor Po.Tot quando comparado com o grupo DP-OVX. Os valores de Po.Tot no grupo DP-OVX-LC01 foram significativamente menores que aqueles do grupo DP-OVX-HN019. Esse efeito cepa-específico da terapia probiótica na prevenção de perda óssea também foi relatado por Montazeri-Najafabady *et al.* (2018). Embora não tenham investigado os efeitos de probióticos no osso

alveolar, os autores verificaram diferenças importantes na densidade mineral óssea, na concentração da medula óssea e na área global do fêmur, da coluna e da tíbia em ratas submetidas à OVX e tratadas com cinco cepas probióticas diferentes.

De fato, os efeitos dos probióticos na saúde óssea parecem ser cepa dependentes. Embora, ambas as cepas avaliadas no presente estudo proporcionaram de forma semelhante melhoras nos níveis de estradiol e na expressão de proteínas de junção no epitélio intestinal, outros mecanismos podem ter contribuído para os resultados diferentes observados na avaliação da perda óssea alveolar. Influências diferentes podem, por exemplo, ter ocorrido na microbiota intestinal, permitindo a expressão de padrões distintos de citocinas com efeitos diferenciais na atividade dos osteoblastos. Pode-se especular também a ocorrência de ações locais na cavidade bucal, proporcionando padrões imunológicos da mucosa e microbiológicos diretamente relacionados com maior ou menor perda de osso alveolar. Esses padrões distintos podem ainda estar relacionados com a condição sistêmica presente. No presente estudo, a cepa *B. lactis* HN019 proporcionou efeitos menos expressivos na manutenção de volume óssea na região de bifurcação do 1º molar inferior de animais submetidos à OVX com periodontite experimental quando comparados àqueles observados em animais sem osteoporose experimental, com periodontite e tratados com esta mesma cepa probiótica (OLIVEIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2023; RICOLDI *et al.*, 2017). É possível que a osteoporose tenha influenciado de alguma forma os efeitos imunomoduladores desta cepa. Futuros estudos poderão esclarecer o mecanismo pelo qual a osteoporose exerce influência em cepas probióticas.

Há uma escassez de estudos na literatura que abordam os efeitos de probióticos na combinação osteoporose-periodontite. O presente estudo mostra, de forma inédita, comparações diretas dos efeitos das cepas probióticas *B. lactis* HN019 e *L. casei* 01 no osso alveolar, níveis estradiol e ambiente intestinal de animais submetidos à OVX. Novos estudos são importantes para avaliar o impacto sistêmico dessas cepas na densidade mineral óssea de fêmur, tíbia e coluna, bem como nos níveis sorológicos de marcadores do turnover ósseo e na microbiota oral e intestinal de animais osteoporóticos. Em relação a esta última, Collins *et al.* (2017) afirmaram que os efeitos da microbiota intestinal na saúde óssea são complexos e dependem do tempo de colonização. Diversos fatores relacionados à terapia probiótica, como frequência, tempo e quantidade de ingestão, são decisivos para a modulação da microbiota intestinal e o conseqüente impacto na massa óssea. As análises imunológicas e microbiológicas futuras podem ajudar elucidar os mecanismos pelos quais as cepas probióticas avaliadas no presente estudo atuam em nível local (nos tecidos periodontais) e em nível sistêmico (nos tecidos intestinais).

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que:

- i) a terapia probiótica aumentou os níveis de estradiol e reduziu a permeabilidade intestinal em ratas ovariectomizadas e seus efeitos no osso alveolar e na morfologia intestinal foram cepa dependentes;
- ii) a cepa probiótica *Lacticaseibacillus casei* 01 foi mais efetiva que a cepa probiótica *Bifidobacterium animalis subs. Lactis* HN019 para a redução da destruição de osso alveolar decorrente da doença periodontal experimental em ratas ovariectomizadas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AMADEI, S. U., SOUZA, D. M. D., BRANDÃO, A. A. H., & ROCHA, R. F. D.. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. *Brazilian Oral Research*, 2011;25:538-543.
- AMATO, M., DI SPIRITO, F., D'AMBROSIO, F., BOCCIA, G., MOCCIA, G., & DE CARO, F.. Probiotics in Periodontal and Peri-Implant Health Management: Biofilm Control, Dysbiosis Reversal, and Host Modulation. *Microorganisms*. 2022;10(11):2289.
- AMDEKAR, S., SINGH, V., SINGH, R., SHARMA, P., KESHAV, P., & KUMAR, A.. Lactobacillus casei reduces the inflammatory joint damage associated with collagen-induced arthritis (CIA) by reducing the pro-inflammatory cytokines: Lactobacillus casei: COX-2 inhibitor. *Journal of clinical immunology*. 2011;31:147-154.
- ANBINDER, A. L., MORAES, R. M., LIMA, G. M., OLIVEIRA, F. E., CAMPOS, D. R., ROSSONI, R. D., & ELEFTERIOU, F.. Periodontal disease exacerbates systemic ovariectomy-induced bone loss in mice. *Bone*. 2016;83:241-247.
- BAKHSHANDEH, S. Engineered probiotics to treat rheumatoid arthritis. *Nat Rev Bioeng*. 2023;1:87.
- BAO, J., LI, L., ZHANG, Y., WANG, M., CHEN, F., GE, S., & YAN, F.. Periodontitis may induce gut microbiota dysbiosis via salivary microbiota. *International Journal of Oral Science*. 2022;14(1):32.
- BECK, J. D., PAPAPANOU, P. N., PHILIPS, K. H., & OFFENBACHER, S.. Periodontal medicine: 100 years of progress. *Journal of dental research*. 2019;98(10):1053-1062.
- BEHERA, J.; ISON, J.; TYAGI, S.C.; TYAGI, N. The Role of Gut Microbiota in Bone Homeostasis. *Bone*. 2020;135:115317.
- BERNINI LJ, SIMAO AN, ALFIERI DF, et al. Beneficial effects of Bifidobacterium lactis on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: a randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.). 2016;32:716- 719.
- BRITTON, R. A., IRWIN, R., QUACH, D., SCHAEFER, L., ZHANG, J., LEE, T., & McCABE, L. R.. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(11):1822-1830.
- BUCAI, N., SAROSI, I., DUNSTAN, C. R., MORONY, S., TARPLEY, J., CAPPARELLI, C., & SIMONET, W. S.. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & development*. 1998;12(9):1260-1268.
- ÇAGLAR, E., KUSCU, O. O., CILDIR, S. K., KUVVETLI, S. S., & SANDALLI, N.. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2008;18(1):35-39.
- CARDOSO, R. S., MESSORA, M. R., SILVA, P. H. F., OLIVEIRA, L. F., LEITE-PANISSI, C., SALVADOR, S., & FURLANETO, F. A. C.. Effects of Bifidobacterium animalis subsp.

lactis HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis. *Beneficial microbes*. 2020;11(1):33-46.

CARRIZALES-SEPÚLVEDA, E. F., ORDAZ-FARÍAS, A., VERA-PINEDA, R., & FLORES-RAMÍREZ, R.. Periodontal disease, systemic inflammation and the risk of cardiovascular disease. *Heart, Lung and Circulation*. 2018;27(11):1327-1334.

CASTANEDA, M.; STRONG, J.M.; ALABI, D.A.; HERNANDEZ, C.J. The Gut Microbiome and Bone Strength. *Curr. Osteoporos. Rep*. 2020;18:677–683.

CHEN Q, WANG B, WANG S, QIAN X, LI X, ZHAO J, ZHANG H, CHEN W, WANG G. Modulation of the Gut Microbiota Structure with Probiotics and Isoflavone Alleviates Metabolic Disorder in Ovariectomized Mice. *Nutrients*. 2021 May 25;13(6):1793.

CHOPRA, A., BHAT, S. G., & SIVARAMAN, K.. Porphyromonas gingivalis adopts intricate and unique molecular mechanisms to survive and persist within the host: a critical update. *Journal of Oral Microbiology*. 2020;12(1):1801090.

COCHRAN, D. L.. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2008;79:1569-1576.

COLLINS, F. L., RIOS-ARCE, N. D., ATKINSON, S., BIERHALTER, H., SCHOENHERR, D., BAZIL, J. N., & PARAMESWARAN, N.. Temporal and regional intestinal changes in permeability, tight junction, and cytokine gene expression following ovariectomy-induced estrogen deficiency. *Physiological reports*. 2017;5(9):e13263.

COMELEKOGLU, U., BAGIS, S., YALIN, S., OGENLER, O., YILDIZ, A., SAHIN, N. O., & HATUNGIL, R.. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clinical rheumatology*. 2007;26:380-384.

COX, L. M., YAMANISHI, S., SOHN, J., ALEKSEYENKO, A. V., LEUNG, J. M., CHO, I., & BLASER, M. J.. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*. 2014;158(4):705-721.

CURTIS, M. A., DIAZ, P. I., & VAN DYKE, T. E.. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2020;83(1):14-25.

DAL ACQUA, Y., HERNÁNDEZ, C., FOGACCI, M., BARBIRATO, D., & PALIOTO, D.. Local and systemic effects produced in different models of experimental periodontitis in mice: a systematic review. *Archives of Oral Biology*. 2022;105528.

DAR, H.Y.; SHUKLA, P.; MISHRA, P.K.; ANUPAM, R.; MONDAL, R.K.; TOMAR, G.B.; SHARMA, V.; SRIVASTAVA, R.K. *Lactobacillus acidophilus* Inhibits Bone Loss and Increases Bone Heterogeneity in Osteoporotic Mice via Modulating Treg-Th17 Cell Balance. *Bone Rep*. 2018;8:46–56.

de MOLON, R. S., PARK, C. H., JIN, Q., SUGAI, J., & CIRELLI, J. A.. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microscopy research and technique*. 2018;81(12):1412-1421.

- de OLIVEIRA AM, LOURENÇO TGB, COLOMBO APV. Impact of systemic probiotics as adjuncts to subgingival instrumentation on the oral-gut microbiota associated with periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2022 Jan;93(1):31-44.
- de OLIVEIRA PG, SILVEIRA E SOUZA AM, NOVAES AB JR, TABA M JR, MESSORA MR, PALIOTO DB, GRISI MF, TEDESCO AC, de SOUZA SL. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy in induced periodontal disease. Animal study with histomorphometrical, immunohistochemical, and cytokine evaluation. *Lasers Med Sci*. 2016 Sep;31(7):1275-83.
- DEVINE, D. A., & MARSH, P. D. (2009). Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *Journal of Oral Microbiology*. 1949;1(1).
- DUARTE, P. M., GONÇALVES, P., CASATI, M. Z., De TOLEDO, S., SALLUM, E. A., & NOCITI Jr, F. H.. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: A histometric study in rats. *Journal of periodontal research*. 2006;41(6):541-546.
- FERRO, M., CHARNECA, S., DOURADO, E., GUERREIRO, C. S., & FONSECA, J. E.. Probiotic supplementation for rheumatoid arthritis: a promising adjuvant therapy in the gut microbiome era. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:711788.
- GAO, L., KURAJI, R., ZHANG, M. J., MARTINEZ, A., RADAIC, A., KAMARAJAN, P., & KAPILA, Y. L.. Nisin probiotic prevents inflammatory bone loss while promoting reparative proliferation and a healthy microbiome. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2022;8(1):45.
- GARCIA RI, HENSHAW MM, KRALL EA. Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol 2000*. 2001;25:21-36.
- GATEJ, S. M., MARINO, V., BRIGHT, R., FITZSIMMONS, T. R., GULLY, N., ZILM, P., & BARTOLD, P. M.. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2018;45(2):204-212.
- GENCO, R. J., & SANZ, M.. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontology 2000*. 2020;83(1):7-13.
- GOMES-FILHO, I. S., PASSOS, J. D. S., CRUZ, S. S., VIANNA, M. I. P., CERQUEIRA, E. D. M., OLIVEIRA, D. C., & De OLIVEIRA, N. F.. The association between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2007;78(9):1731-1740.
- GUERIN-DANAN, C., CHABANET, C., PEDONE, C., POPOT, F., VAISSADE, P., BOULEY, C., & ANDRIEUX, C.. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *The American journal of clinical nutrition*. 1998;67(1):111-117.
- HAJISHENGALLIS, G.. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Molecular oral microbiology*. 2014;29(6):248-257.
- HAJISHENGALLIS, G.. Interconnection of periodontal disease and comorbidities: Evidence, mechanisms, and implications. *Periodontology 2000*. 2022;89(1):9-18.

HAIJSHENGALLIS, G., & CHAVAKIS, T.. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nature Reviews Immunology*. 2021;21(7):426-440.

HAIJSHENGALLIS, G., & LAMONT, R. J.. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*. 2012;27(6):409-419.

HAIJSHENGALLIS, G., & LAMONT, R. J.. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *European journal of immunology*. 2014;44(2):328-338.

HEFTI AF, PRESHAW PM. Examiner alignment and assessment in clinical periodontal research. *Periodontol 2000*. 2012 Jun;59(1):41-60.

HILDEBOLT, C. F., PILGRAM, T. K., YOKOYAMA-CROTHERS, N., VANNIER, M. W., DOTSON, M., MUCKERMAN, J., & CIVITELLI, R.. The pattern of alveolar crest height change in healthy postmenopausal women after 3 years of hormone/estrogen replacement therapy. *Journal of periodontology*. 2002;73(11):1279-1284.

HILL C, GUARNER F, REID G, GIBSON GR, MERENSTEIN DJ, POT B, MORELLI L, CANANI RB, FLINT HJ, SALMINEN S, CALDER PC, SANDERS ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):506-14.

HILL EG, SLATE EH, WIEGAND RE, GROSSI SG, SALINAS CF. Study design for calibration of clinical examiners measuring periodontal parameters. *J Periodontol*. 2006 Jul;77(7):1129-41.

HOAR, W., & HICKMAN, C. P.. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. *General and comparative physiology*. 1975;2:260-265.

HORTA-BAAS, G., ROMERO-FIGUEROA, M. D. S., MONTIEL-JARQUÍN, A. J., PIZANO-ZÁRATE, M. L., GARCÍA-MENA, J., & RAMÍREZ-DURÁN, N.. Intestinal dysbiosis and rheumatoid arthritis: a link between gut microbiota and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of immunology research*, 2017.

HSU, E., & PACIFICI, R.. From osteoimmunology to osteomicrobiology: how the microbiota and the immune system regulate bone. *Calcified tissue international*. 2018;102:512-521.

HSU, H., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., SOLOVYEV, I., COLOMBERO, A., TIMMS, E., & BOYLE, W. J.. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(7):3540-3545.

IBÁÑEZ L, ROULEAU M, WAKKACH A, BLIN-WAKKACH C. Gut microbiome and bone. *Joint Bone Spine*. 2019 Jan;86(1):43-47.

IMRAN, F., DAS, S., PADMANABHAN, S., RAO, R., SURESH, A., & BHARATH, D.. Evaluation of the efficacy of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* on the levels of periodontopathic bacteria in periodontitis: A clinico-microbiologic study. *Indian Journal of Dental Research*. 2015;26(5):462.

- INVERNICI, M. M., FURLANETO, F. A., SALVADOR, S. L., OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S., MANTZIARI, A., & MESSORA, M. R.. Bifidobacterium animalis subsp lactis HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. *PLoS One*. 2020;15(9):e0238425.
- INVERNICI, M. M., SALVADOR, S. L., SILVA, P. H., SOARES, M. S., CASARIN, R., PALIOTO, D. B., & MESSORA, M. R.. Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. 2018; 45(10):1198-1210.
- JEFFCOAT, M. K., LEWIS, C. E., REDDY, M. S., WANG, C. Y., & REDFORD, M.. Post-menopausal bone loss and its relationship to oral bone loss. *Periodontology 2000*. 2000;23(1):94-102.
- JIA L, TU Y, JIA X, DU Q, ZHENG X, YUAN Q, ZHENG L, ZHOU X, XU X. Probiotics ameliorate alveolar bone loss by regulating gut microbiota. *Cell Prolif*. 2021 Jul;54(7):e13075. doi: 10.1111/cpr.13075. Epub 2021 Jun 7. Erratum in: Cell Prolif. 2022 Jan;55(1):e13159.
- JIANG, G., MATSUMOTO, H., & FUJII, A.. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2003;21(6):388.
- JOHNSON, I. H. (1975). Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research*, 10(6), 332-345.
- JOHNSTON, B. D., & WARD, W. E.. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *BioMed research international*. 2015.
- KALU DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991 Dec;15(3):175-91.
- KINANE, D. F., PETERSON, M., & STATHOPOULOU, P. G.. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2006;40(1):107-119.
- KINANE, D. F., STATHOPOULOU, P. G., & PAPAPANOU, P. N.. Periodontal diseases. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3(1):1-14.
- KITAMOTO, S., & KAMADA, N.. Periodontal connection with intestinal inflammation: microbiological and immunological mechanisms. *Periodontology 2000*. 2022;89(1):142-153.
- KONG YY, FEIGE U, SAROSI I, BOLON B, TAFURI A, MORONY S, et al.. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999;402:304-309.
- KUBONIWA, M., HOUSER, J. R., HENDRICKSON, E. L., WANG, Q., ALGHAMDI, S. A., SAKANAKA, A., LAMONT, R. J.. Metabolic crosstalk regulates Porphyromonas gingivalis colonization and virulence during oral polymicrobial infection. *Nature microbiology*. 2017;2(11):1493-1499.
- KUMAR, P. S.. From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. *The Journal of physiology*. 2017;595(2):465-476.

KURODA, S., MUKOHYAMA, H., KONDO, H., AOKI, K., OHYA, K., OHYAMA, T., & KASUGAI, S.. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral diseases*. 2003;9(1):24-28.

LACEY DL, TIMMS E, TAN HL, KELLEY MJ, DUNSTAN CR, BURGESS T, et al.. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165-176.

LAMONT, R. J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G.. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature reviews microbiology*. 2018;16(12):745-759.

LaMONTE, M. J., HOVEY, K. M., GENCO, R. J., MILLEN, A. E., TREVISAN, M., & WACTAWSKI-WENDE, J.. Five-year changes in periodontal disease measures among postmenopausal females: The Buffalo OsteoPerio study. *Journal of periodontology*. 2013; 84(5):572-584.

LEE, Y.. Association between osteoporosis and periodontal disease among menopausal women: the 2013–2015 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *PloS one*. 2022;17(3):e0265631.

LI, J. Y., CHASSAING, B., TYAGI, A. M., VACCARO, C., LUO, T., ADAMS, J., & PACIFICI, R.. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(6):2049-2063.

LI, J., SAROSI, I., YAN, X. Q., MORONY, S., CAPPARELLI, C., TAN, H. L., & BOYLE, W. J.. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(4):1566-1571.

LI, S.; MAO, Y.; ZHOU, F.; YANG, H.; SHI, Q.; MENG, B. Gut Microbiome and Osteoporosis: A Review. *Bone Jt. Res*. 2020;9:524–530.

LIN TH, LUNG CC, SU HP, HUANG JY, KO PC, JAN SR, SUN YH, NFOR ON, TU HP, CHANG CS, JIAN ZH, CHIANG YC, LIAW YP. Association between periodontal disease and osteoporosis by gender: a nationwide population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Feb;94(7):e553.

LIN, B. Y., JEE, W. S., CHEN, M. M., MA, Y. F., KE, H. Z., & LI, X. J.. Mechanical loading modifies ovariectomy-induced cancellous bone loss. *Bone and mineral*. 1994;25(3):199-210.

LIN, P., NIIMI, H., OHSUGI, Y., TSUCHIYA, Y., SHIMOHIRA, T., KOMATSU, K., & KATAGIRI, S.. Application of ligature-induced periodontitis in mice to explore the molecular mechanism of periodontal disease. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(16):8900.

LIU, Z., LIU, L., KANG, C., XIE, Q., ZHANG, B., LI, Y.. Effects of estrogen deficiency on microstructural changes in rat alveolar bone proper and periodontal ligament. *Molecular medicine reports*. 2015;12(3):3508-3514.

LOOIJER-van LANGEN, M., HOTTE, N., DIELEMAN, L. A., ALBERT, E., MULDER, C., & MADSEN, K. L.. Estrogen receptor- β signaling modulates epithelial barrier

- function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2011; 300(4):G621-G626.
- LYU Z, HU Y, GUO Y, LIU D. Modulation of bone remodeling by the gut microbiota: a new therapy for osteoporosis. *Bone Res*. 2023 Jun 9;11(1):31.
- MAEDA, Y., KURAKAWA, T., UMEMOTO, E., MOTOOKA, D., ITO, Y., GOTOH, K., & TAKEDA, K.. Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis & rheumatology*. 2016;68(11):2646-2661.
- MAEKAWA, T., & HAJISHENGALLIS, G.. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD 2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *Journal of periodontal research*. 2014;49(6):785-791.
- MAEKAWA, T., KRAUSS, J. L., ABE, T., JOTWANI, R., TRIANTAFILOU, M., TRIANTAFILOU, K., & HAJISHENGALLIS, G.. Porphyromonas gingivalis manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell host & microbe*. 2014;15(6):768-778.
- MAKKAWI, H., HOCH, S., BURNS, E., HOSUR, K., HAJISHENGALLIS, G., KIRSCHNING, C. J., & NUSSBAUM, G.. Porphyromonas gingivalis stimulates TLR2-PI3K signaling to escape immune clearance and induce bone resorption independently of MyD88. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:359.
- MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002 Nov;62(4A):609-14.
- MARSH, P. D.. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in dental research*. 1994;8(2):263-271.
- MARSH, P. D., & ZAURA, E.. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44:S12-S22.
- MASHALKAR VN, SURAGIMATH G, ZOPE SA, VARMA SA. A cross-sectional study to assess and correlate osteoporosis and periodontitis among postmenopausal women: a dual energy X-ray absorptiometry study. *J Mid-Life Health*. 2018;9:2-7.
- MAU, L. P., KUAN, Y. C., TSAI, Y. W., LIN, J. J., HUYNH-BA, G., WENG, P. W., & HUANG, R. Y.. Patients with chronic periodontitis present increased risk for osteoporosis: A population-based cohort study in Taiwan. *Journal of periodontal research*. 2017;52(5):922-929.
- MAVROPOULOS A, RIZZOLI R, AMMANN P. Different responsiveness of alveolar and tibial bone to bone loss stimuli. *J Bone Miner Res*. 2007, Mar;22(3):403-10.
- MESSORA, M. R., OLIVEIRA, L. F., FOUREAUX, R. C., TABA JR, M., ZANGERÔNIMO, M. G., FURLANETO, F. A., & PEREIRA, L. J.. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *Journal of periodontology*. 2013;84(12):1818-1826.

MESSORA, M. R., PEREIRA, L. J., FOUREAUX, R., OLIVEIRA, L. F., SORDI, C. G., ALVES, A. J., & FURLANETO, F. A.. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Archives of oral biology*. 2016;66:108-119.

MONTAZERI-NAJAFABADY, N., GHASEMI, Y., DABBAGHMANESH, M. H., TALEZADEH, P., KOOHPEYMA, F., & GHOLAMI, A.. Supportive role of probiotic strains in protecting rats from ovariectomy-induced cortical bone loss. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019;11:1145-1154.

Moraes, R. M., Lescura, C. M., Milhan, N. V., Ribeiro, J. L., Silva, F. A., & Anbinder, A. L.. Live and heat-killed *Lactobacillus reuteri* reduce alveolar bone loss on induced periodontitis in rats. *Archives of oral biology*. 2020;119:104894.

MOREIRA ALG, SILVA PHF, SALVADOR SL, ISHIKAWA KH, FERREIRA GC, TANUS-SANTOS JE, MAYER MPA, DE SOUZA SLS, FURLANETO FAC, MESSORA MR. Effects of probiotics in rats with experimental metabolic syndrome and periodontitis: An investigation of the intestine-adipose tissue axis. *J Periodontol*. 2023 Apr 14.

MYSAK, J., PODZIMEK, S., SOMMEROVA, P., LYUYA-MI, Y., BARTOVA, J., JANATOVA, T., DUSKOVA, J. (2014). *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *Journal of immunology research*, 2014.

NGUYEN, T., BRODY, H., RADAIC, A., & KAPILA, Y.. Probiotics for periodontal health - Current molecular findings. *Periodontology 2000*. 2021;87(1):254-267.

NOBEL, Y. R., COX, L. M., KIRIGIN, F. F., BOKULICH, N. A., YAMANISHI, S., TEITLER, I., & BLASER, M. J.. Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nature communications*. 2015;6(1):7486.

NOTO LLANA, M., SARNACKI, S. H., AYA CASTAÑEDA, M. D. R., BERNAL, M. I., GIACOMODONATO, M. N., & CERQUETTI, M. C.. Consumption of *Lactobacillus casei* fermented milk prevents *Salmonella* reactive arthritis by modulating IL-23/IL-17 expression. *PLoS One*. 2013;8(12):e82588.

OELSCHLAEGER TA. Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int J Med Microbiol*. 2010;300:57– 62.

OHLSSON C, ENGDahl C, FÅK F, ANDERSSON A, WINDAHL SH, FARMAN HH, MOVÉRARE-SKRTIC S, ISLANDER U, SJÖGREN K. Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. *PLoS One*. 2014, Mar 17;9(3):e92368.

OHLSSON, C., & SJÖGREN, K.. Effects of the gut microbiota on bone mass. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015;26(2):69-74.

OLIVEIRA, L. F. F., SILVA, P. H. F., SALVADOR, S. L., ERVOLINO, E., CASARIN, R., FIGUEIREDO, L., & MESSORA, M. R.. Probiotic consumption can modify the resilience of periodontal tissues in rats under experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2023;94(2):217-229.

OLIVEIRA, L. F., SALVADOR, S. L., SILVA, P. H., FURLANETO, F. A., FIGUEIREDO, L., CASARIN, R., & MESSORA, M. R.. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* probiotic in experimental periodontitis. *Journal of periodontology*. 2017;88(2):197-208.

- OLIVEIRA, L.F.F., DA SILVA, G.A., SILVA, P.H.F. *et al.* Comparison Between Different Delivery Vehicles for the Probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 on Experimental Periodontitis in Rats. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2022;14:313-325.
- OMI, N., & EZAWA, I.. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone*, 1995; 17(4):S163-S168.
- OOZEER, R., GOUPIL-FEULLERAT, N., ALPERT, C. A., VAN DE GUCHTE, M., ANBA, J., MENGAUD, J., & CORTHER, G.. Lactobacillus casei is able to survive and initiate protein synthesis during its transit in the digestive tract of human flora-associated mice. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(7):3570-3574.
- PAGE, R. C.. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 1991;26(3):230-242.
- PARVANEH K, EBRAHIMI M, SABRAN MR, et al. Probiotics (Bifidobacterium longum) Increase Bone Mass Density and Upregulate Sparc and Bmp-2 Genes in Rats with Bone Loss Resulting from Ovariectomy. *BioMed Research International*. 2015; 897639.
- PARVANEH, K., JAMALUDDIN, R., KARIMI, G., & ERFANI, R.. Effect of probiotics supplementation on bone mineral content and bone mass density. *The Scientific World Journal*. 2014.
- PASSOS, J. S., VIANNA, M. I. P., GOMES-FILHO, I. S., CRUZ, S. S. D., BARRETO, M. L., ADAN, L., & COELHO, J. M. F.. Osteoporosis/osteopenia as an independent factor associated with periodontitis in postmenopausal women: a case-control study. *Osteoporosis international*. 2013;24:1275-1283.
- PAUL, A. K., PAUL, A., JAHAN, R., JANNAT, K., BONDHON, T. A., HASAN, A., & RAHMATULLAH, M.. Probiotics and amelioration of rheumatoid arthritis: Significant roles of Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus. *Microorganisms*. 2021;9(5):1070.
- PERDIGON, G., de MACIAS, M. E. N., ALVAREZ, S., OLIVER, G., & de RUIZ HOLGADO, A. A. P.. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus. *Journal of Dairy research*. 1990;57(2):255-264.
- PERSSON, G. R.. Periodontal complications with age. *Periodontology 2000*. 2018;78(1):185-194.
- QUINN, R. Comparing Rat's to Human's Age: How Old Is My Rat in People Years? *Nutrition*. 2005;21:775-777.
- RAISZ, L. G.. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(12):3318-3325.
- REINHARDT RA, PAYNE JB, MAZE CA, PATIL KD, GALLAGHER SJ, MATTSON JS. Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol*. 1999, Aug;70(8):823-8.
- RICOLDI, M. S., FURLANETO, F. A., OLIVEIRA, L. F., TEIXEIRA, G. C., PISCHIOTINI, J. P., MOREIRA, A. L., & MESSORA, M. R.. Effects of the probiotic Bifidobacterium animalis

subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS one*. 2017;12(6):e0179946.

RITCHIE ML, ROMANUK TN. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One*. 2012;7(4):e34938.

RUSSELL, D. A., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., & STANTON, C.. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology*. 2011; 149(1):88-105.

SALVI, G. E., & LANG, N. P.. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32:108-129.

SAPRA, L.; DAR, H.Y.; BHARDWAJ, A.; PANDEY, A.; KUMARI, S.; AZAM, Z.; UPMANYU, V.; ANWAR, A.; SHUKLA, P.; MISHRA, P.K.; et al. *Lactobacillus Rhamnosus* Attenuates Bone Loss and Maintains Bone Health by Skewing Treg-Th17 Cell Balance in Ovx Mice. *Sci. Rep.* 2021;11:1807.

SCOTT, D. L.. The diagnosis and prognosis of early arthritis: rationale for new prognostic criteria. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(2):286-290.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *Int. J. Prev. Med.* 2013;4:624–630.

SILVA GA, MOREIRA ALG, SILVA PHF, SALVADOR SL, CASARIN RCV, VICENTE RM, FERREIRA GC, TANUS-SANTOS JE, FURLANETO FAC, MESSORA MR. The use of probiotics can reduce the severity of experimental periodontitis in rats with metabolic syndrome: An immunoenzymatic and microtomographic study. *J Periodontol*. 2022 Feb;93(2):e1-e12.

SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M. C. M. S., CHANG, M. S., LÜTHY, R., & BOYLE, W. J.. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-319.

SJÖGREN, K., ENGDAHL, C., HENNING, P., LERNER, U. H., TREMAROLI, V., LAGERQUIST, M. K., & OHLSSON, C.. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *Journal of bone and mineral research*. 2012;27(6):1357-1367.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005, 38:135-87.

SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., SMITH, C. K. J. R., & KENT Jr, R. L.. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998; 25(2):134-144.

STAMATOVA I, MEURMAN JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2009;51:141-151.

STAMATOVA, I., & MEURMAN, J. H.. Probiotics and periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2009;51(1):141-151.

- STRECKFUS, C. F., JOHNSON, R. B., NICK, T., TSAO, A., & TUCCI, M.. Comparison of alveolar bone loss, alveolar bone density and second metacarpal bone density, salivary and gingival crevicular fluid interleukin-6 concentrations in healthy premenopausal and postmenopausal women on estrogen therapy. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 1997;52(6):M343-M351.
- STREICHER, C., HEYNY, A., ANDRUKHOVA, O., HAIGL, B., SLAVIC, S., SCHÜLER, C., & ERBEN, R. G.. Estrogen regulates bone turnover by targeting RANKL expression in bone lining cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-14.
- TANAKA, M., EJIRI, S., TOYOOKA, E., KOHNO, S., & OZAWA, H.. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *Journal of periodontal research*. 2002;37(2):161-165.
- TEUGHEL, W., KINDER HAAKE S, SLIEPEN I, PAUWELS M, VAN ELDERE J, CASSIMAN JJ, QUIRYNEN M. Bacteria interfere with *A. actinomycetemcomitans* colonization. *J Dent Res*. 2007 Jul;86(7):611-7.
- TEUGHEL, W., NEWMAN, M. G., COUCKE, W., HAFFAJEE, A. D., VAN DER MEI, H. C., HAAKE, S. K., & QUIRYNEN, M.. Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. *Journal of dental research*. 2007;86(11):1078-1082.
- TEUGHEL, W., VAN ESSCHE, M., SLIEPEN, I., & QUIRYNEN, M.. Probiotics and oral healthcare. *Periodontology 2000*. 2008;48(1):111-147.
- TEUGHEL, W., DURUKAN, A., OZCELIK, O., PAUWELS, M., QUIRYNEN, M. & HAYTAC, M. C.. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*. 2013;40:1025-1035.
- TOIVIAINEN, A., JALASVUORI, H., LAHTI, E., GURSOY, U., SALMINEN, S., FONTANA, M., & SÖDERLING, E.. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clinical oral investigations*. 2015;19:77-83.
- TSUBURA S, MIZUNUMA H, ISHIKAWA S, OYAKE I, OKABAYASHI M, KATOH K, SHIBATA M, IIZUKA T, TODA T, IIZUKA T. The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Nov;28(11):1353-6.
- TU, Y.; YANG, R.; XU, X.; ZHOU, X. The Microbiota-Gut-Bone Axis and Bone Health. *J. Leukoc. Biol*. 2021;110:525–537.
- ULLUWISHEWA, D., ANDERSON, R. C., MCNABB, W. C., MOUGHAN, P. J., WELLS, J. M., & ROY, N. C.. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *The Journal of nutrition*. 2011;141(5):769-776.
- VIEIRA, A.T.; CASTELO, P.M.; RIBEIRO, D.A.; FERREIRA, C.M. Influence of Oral and Gut Microbiota in the Health of Menopausal Women. *Front. Microbiol*. 2017;8:1884.

VIVEKANANDA, M. R., VANDANA, K. L. & BHAT, K. G.. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *Journal of Oral Microbiology*. 2010;2:5344.

VON WOWERN, N., KLAUSEN, B., & KOLLERUP, G.. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *Journal of periodontology*. 1994;65(12):1134-1138.

WACTAWSKI-WENDE, J.. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. *Annals of periodontology*. 2001;6(1):197-208.

WILLIAMS, R. C., & OFFENBACHER, S.. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontology 2000*. 2000;23(1):9-12.

XU, X. C., CHEN, H., ZHANG, X., ZHAI, Z. J., LIU, X. Q., ZHENG, X. Y., & LU, E. Y.. Effects of oestrogen deficiency on the alveolar bone of rats with experimental periodontitis. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12(3):3494-3502.

XU, X.; JIA, X.; MO, L.; LIU, C.; ZHENG, L.; YUAN, Q.; ZHOU, X. Intestinal Microbiota: A Potential Target for the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *Bone Res*. 2017;5:17046.

YU, B., & WANG, C. Y.. Osteoporosis and periodontal diseases—an update on their association and mechanistic links. *Periodontology 2000*. 2022;89(1):99-113.

ZEISSIG, S., BÜRGEL, N., GÜNZEL, D., RICHTER, J., MANKERTZ, J., WAHNSCHAFFE, U., & SCHULZKE, J. D.. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56(1):61-72.

ANEXO

Anexo 1 – Certificado de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Processo número 2018.1.448.58.2.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 087/2018

Ribeirão Preto, 15 de agosto de 2018.

Ref. processo nº 2018.1.448.58.2

Senhor(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em sua 59ª Sessão, realizada em 15/08/2018, **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Influência da terapia probiótica na periodontite experimental em ratas ovariectomizadas. Estudo microbiológico, microtomográfico, histomorfométrico e imunohistoquímico em rato" emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 15/09/2021**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Fabricio Kitazono de Carvalho

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr.(a)

Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia
desta Faculdade

/aafn