



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

BARBARA MARIA CORRÊA GERALDO

**EFEITO ANTIMICROBIANO E IMUNOMODULADOR DE
Lactobacillus reuteri EM CULTURA DE OSTEOLASTOS E
Galleria mellonella DESAFIADOS POR *Porphyromonas gingivalis***

2017

BARBARA MARIA CORRÊA GERALDO

**EFEITO ANTIMICROBIANO E IMUNOMODULADOR DE *Lactobacillus reuteri* EM
CULTURA DE OSTEÓBLASTOS E *Galleria mellonella* DESAFIADOS POR
*Porphyromonas gingivalis***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2017]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Geraldo, Barbara Maria Corrêa

Efeito antimicrobiano e imunomodulador de *Lactobacillus reuteri* em cultura de osteoblastos e *Galleria mellonella* desafiados por *Porphyromonas gingivalis* / Barbara Maria Corrêa Geraldo. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.

47 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientadora: Ana Lia Anbinder.

1. Doença periodontal. 2. Probióticos. 3. *Porphyromonas gingivalis*. 4. *Galleria mellonella*. 5. Osteoblastos. I. Anbinder, Ana Lia, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa Adj Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Débora Pallos

Universidade de Santo Amaro - UNISA

Faculdade de Odontologia

São José dos Campos, 05 de Maio de 2017.

Dedico este trabalho

A minha mãe Silvana Regina Corrêa

Ao meu pai Dailson Geraldo

As minhas irmãs Bruna Regina Corrêa Geraldo e

Gabriela Corrêa Soares Dias

AGRADECIMENTOS

Tenho tantas pessoas a agradecer, tantas pessoas que me ajudaram e foram fundamentais nessa jornada... Eu não teria conseguido nada sem a ajuda de vocês! Cada um teve um papel muito importante na minha vida e agradeço poder ter pessoas maravilhosas ao meu lado.

À Deus por ter me dado forças para concluir essa etapa tão incrível e também a mais difícil da minha vida, agradeço por tudo o que sou, tudo o que me tornei. Essa experiência me fez crescer demais como pessoa e como profissional, sou grata por cada obstáculo e por cada conquista.

Ao **Rafael Ribeiro da Costa**, meu companheiro, meu melhor amigo, obrigado por estar sempre presente, por acreditar em mim, por estar ao meu lado me apoiando em cada situação difícil, rindo e chorando comigo. Obrigada por me ajudar a continuar em todas as vezes que pensei em desistir, você é peça fundamental neste trabalho.

À minha família, que foi fundamental nessa caminhada e é na minha vida, agradeço ao meu pai **Dailson Geraldo** e à minha mãe **Silvana Regina Corrêa** por todo o apoio, por serem a minha força, meu suporte e meu porto seguro nesta vida, por me guiarem e me ensinarem a ser sempre melhor. Sem vocês eu não teria chegado até aqui, eu amo vocês.

Às minhas irmãs, **Bruna Regina Corrêa Geraldo** e **Gabriela Corrêa Soares Dias**, obrigada por ouvir as apresentações de trabalho até tarde, por darem a opinião de vocês sempre que precisei. Obrigada por esse amor incondicional que existe entre nós, e principalmente obrigada por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus irmãos **Daniel Amaral da Costa Geraldo**, **Stefany Victória da Costa Geraldo**, **Raphael Corrêa Carvalho** por todos os momentos que compartilhamos, vocês são especiais demais na minha vida.

Ao meu padrasto **Anderson Carvalho** por ser esta pessoa tão incrível e disposta a ajudar, por estar presente e ser sempre tão atencioso, meu muito obrigado.

Ao meu querido amigo **Junior Machado**, pela amizade, dedicação, por sempre ajudar a resolver problemas e ajudar a revisar esta dissertação.

À amiga e companheira **Marianna Nanni Batalha** pela parceria e por toda a ajuda, obrigada por estar sempre presente, obrigada pelos fins de semana contando as Gallerias, você foi incrível;

Aos meus colegas da microbiologia: **Jéssica Diane dos Santos**, por toda a paciência em me ensinar sobre anaeróbios, você foi fundamental neste trabalho; **Rodnei Rossoni** agradeço a parceria e a disposição em contribuir com este trabalho com a parte de invertebrados, e **Livia Mara** pela amizade, muito obrigada, você é incrível.

Ao colega **Felipe Eduardo de Oliveira**, pela parceria, muito obrigada por me auxiliar e me ensinar sobre cultura, você foi fundamental para a realização deste trabalho.

À amiga **Noala Vicensoto Moreira Milhan** por toda a paciência em me ajudar com os detalhes, por estar sempre presente e sempre disposta, você foi peça chave para a finalização desta obra.

À **profa Dra Ana Lia Anbinder** pela oportunidade e suporte na realização deste trabalho, por toda a paciência e dedicação com que me ensinou, não somente a fazer pesquisa, mas lições que levarei para a vida toda. Obrigada de coração.

À **Unesp** - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Tit Estevão T. Kimpara e ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, pela oportunidade de realização do curso.

À **Fapesp** (processo 2016/06946-1) por ter financiado esta pesquisa.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal e aos demais professores que contribuíram para a realização deste trabalho.

À **Profa. Juliana Campos Junqueira** pela parceria com a parte de microbiologia, obrigada por ser sempre tão dedicada.

Ao técnico da microbiologia, **Sergio G. Alves**, pela ajuda, ao **Walter Cruz** por sempre ajudar com um sorriso no rosto.

À Profa. **Luciane Dias de Oliveira** pela parceria com a parte de cultura de células, obrigada por estar sempre por perto, auxiliando em cada dúvida, obrigada pela paciência e pelo carinho.

A todos os meus colegas da Biopatologia, e todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

*"Ter um sonho grande dá o mesmo trabalho de ter um sonho
pequeno".*

Jorge Paulo Lemann

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivos Gerais	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 <i>Lactobacillus reuteri</i>	17
3.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	17
3.3 Atividade antimicrobiana- Teste de diluição em caldo	18
3.4 <i>Galleria mellonella</i>	19
3.4.1 Grupos experimentais.....	19
3.4.2 Estudo da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>L. reuteri</i> e <i>P. gingivalis</i>	20
3.4.3 Densidade hemocitária	22
3.5 Culturas de osteoblastos.....	22
3.5.1 Avaliação da viabilidade celular.....	24
3.5.2 Produção de óxido nítrico	24
3.5.3 Ensaio imunoenzimático - ELISA	25
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Atividade antimicrobiana	26
4.2 Estudo da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>L. reuteri</i> e <i>P. gingivalis</i>	26
4.3 Estudo da interação entre micro-organismos	28
4.4 Densidade hemocitária	29
4.5 Viabilidade celular e óxido nítrico.....	30
4.6 Citocinas	31
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	42

Geraldo BMC. Efeito antimicrobiano e imunomodulador de *Lactobacillus reuteri* em cultura de osteoblastos e *Galleria mellonella* desafiados por *Porphyromonas gingivalis* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

Os tratamentos mais usados para periodontite são a raspagem e aplainamento radicular, tratamento não cirúrgico, associado ou não ao uso de antimicrobianos. No entanto, novas terapias têm sido testadas com foco na modulação da resposta do hospedeiro. Alguns micro-organismos têm efeitos benéficos na saúde dos seres humanos, pois produzem efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios, os chamados probióticos. O presente trabalho avaliou o efeito antimicrobiano de *Lactobacillus reuteri* sobre *Porphyromonas gingivalis* e a influência deste probiótico em sua forma viva, morta (paraprobótico) e sobrenadante em modelo de invertebrado *Galleria mellonella*, infectado por *P. gingivalis*. Posteriormente, foi determinada a viabilidade celular, níveis de óxido nítrico e de interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-17 e fator de necrose tumoral (TNF)- α , através do ensaio de ELISA em osteoblastos infectados por LPS de *P. gingivalis* *in vitro*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA, Kruskal-Wallis ou Log-rank (Mantel-Cox), com nível de significância de 5%. *L. reuteri* e seu sobrenadante possuem a mesma atividade antimicrobiana. O probiótico viável e o morto apresentaram efeitos iguais na sobrevivência de *G. mellonella* e *L. reuteri* vivo foi o único que aumentou densidade hemocitária das lagartas. O probiótico e o paraprobótico reduziram igualmente os níveis IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-17, sendo que o paraprobótico, diferentemente do lactobacilo vivo, reduziu significativamente as quantidades de IL-6 e TNF- α , com relação ao grupo controle de LPS. As maiores reduções das citocinas estudadas foram obtidas com o uso do sobrenadante. Conclui-se que os efeitos antimicrobianos e imunomoduladores de *L. reuteri* não dependem da viabilidade celular, o que possibilita o desenvolvimento de produtos sem a bactéria viva com efeitos semelhantes. Estudos em vertebrados e clínicos são necessários para confirmar esta hipótese.

Palavras-chave: Periodontite. *Lactobacillus reuteri*. *Porphyromonas gingivalis*. *Galleria mellonella*. Osteoblastos.

Geraldo BMC. Antimicrobial and immunomodulatory effects of Lactobacillus reuteri on osteoblasts culture and Galleria mellonella challenged by P. gingivalis [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, São Paulo State University (Unesp); 2017.

ABSTRACT

The most used treatments for periodontitis are scaling and non-surgical root planing, associated or not to the use of antimicrobials. However, new therapies have been tested with a focus on host response modulation. Some microorganisms have beneficial effects on human health because they produce antimicrobial and anti-inflammatory effects, called probiotics. The present study evaluated the antimicrobial effect of Lactobacillus reuteri on Porphyromonas gingivalis and the influence of this probiotic in its live, inactivated (paraprobiotic) form and supernatant on Galleria mellonella invertebrate model, after infection by P. gingivalis. Later, the cell viability, nitric oxide levels and interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-17 and tumor necrosis factor (TNF)- α , by the Elisa assay, were evaluated in osteoblasts infected with P. gingivalis LPS in vitro. Data were submitted to ANOVA, Kruskal-Wallis or Log-rank (Mantel-Cox) statistical test, with a significance level of 5%. L. reuteri and its supernatant have the same antimicrobial activity. The viable and inactivated probiotic had equal effects in G. mellonella survival and L. reuteri alive was the only one that increased the hemocyte density in the invertebrate model. Probiotics and paraprobiotics also reduced levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-17 cytokines, whereas paraprobiotic, unlike living lactobacillus, significantly reduced the amounts of IL-6 and TNF- α , compare to the LPS control group. The highest reductions of the studied cytokines were obtained with the use of the supernatant. It is concluded that the antimicrobial and immunomodulatory effects of L. reuteri do not depend on cell viability, which allows the development of products without live bacterium with similar effects. Vertebrate and clinical studies are needed to confirm this hypothesis.

Keywords: Periodontitis. Lactobacillus reuteri. Porphyromonas gingivalis. Galleria mellonella. Osteoblasts

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença multifatorial que acomete o tecido periodontal, devido à ação microbiana e resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (Ebersole, Taubman, 1994). Em termos de saúde pública, o tratamento da doença é bastante dispendioso e está em quarto lugar entre os gastos mais onerosos relacionados à saúde nos países industrializados (Geier et al., 2007; Moyses, 2012). Várias bactérias estão envolvidas no processo, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, entre outras. Elas interagem com o hospedeiro, causando liberação de mediadores químicos que determinam a destruição das estruturas periodontais, não só por meio da reabsorção óssea, mas também da inibição da formação óssea, que com o tempo pode acarretar na perda dentária (Loomer et al., 1994; Zhao et al., 2012).

P. gingivalis é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia, e está muito envolvida no processo de inflamação e destruição de tecidos periodontais. Apesar da etiologia da doença periodontal ser principalmente atribuída ao biofilme, a degradação tecidual é resultado, em parte, da ativação da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (Salvi et al., 2005).

A alta virulência de *P. gingivalis* se deve à sua capacidade de invadir o tecido periodontal e aos múltiplos lipídeos presentes em seu lipopolissacarídeo (LPS), que conferem a essa bactéria capacidade de se ligar a diferentes receptores (como *toll-like receptors* -TLR1, TLR2 e TLR4) e estimular a atividade inata (Salvi et al., 2005; Bainbrigde et al., 2002). Ela migra para o sulco gengival, e possui propriedades proteolíticas adesivas, que a tornam capaz de invadir tecidos epiteliais gengivais, células de ligamento periodontal e osteoblastos (Okahashi et al., 2004; Belibasakis et al., 2007; Zhang W et al., 2010; Zhang D et al., 2011; Zhang JY et al., 2013; Zhang Y et al., 2014; Lin FY et al., 2014). Além disso, *P. gingivalis* também apresenta a capacidade de estimular o rearranjo do citoesqueleto de actina do hospedeiro (Lin FY et al., 2014), induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e provocando um atraso no recrutamento dos neutrófilos, o que permite sua proliferação (Yilmaz et al., 2002, 2004; Mao et al., 2007). Ao mesmo tempo, *P. gingivalis* pode levar à ativação de neutrófilos, monócitos e macrófagos e, mais

tarde, de linfócitos que induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6, IL-8 e IL-1 β , metaloproteinase de matriz (MMP)-9 e MMP-8. Tais substâncias, por sua vez, induzem fibroblastos e células epiteliais à liberação de prostaglandinas na região do sulco gengival, levando a mais dano tecidual com estímulo da atividade osteoclástica (Okahashi et al., 2004; Le et al., 2009). *P. gingivalis* também interfere na adesão e diferenciação, diminui proliferação e promove a apoptose de osteoblastos (Le et al., 2009; Wang et al., 2010; Xing et al., 2010; Ditmann et al., 2015). Por meio da inibição de fatores de transcrição, diminui a expressão de genes associados à matriz óssea, como colágeno tipo 1, osteocalcina e fosfatase alcalina, causando ainda a inibição da mineralização (Loomer et al., 1995; Yilmaz et al., 2002, 2004; Mao et al., 2007; Le et al., 2009; Wang et al., 2010; Xing et al., 2010; Zhang Y et al., 2014; Ditmann et al., 2015).

Vários tratamentos têm sido utilizados para periodontite, indo desde a tradicional raspagem e aplainamento radicular (RAR), não cirúrgica, associada ou não ao uso de antimicrobianos e anti-inflamatórios, a terapias cirúrgicas, como retalhos, regeneração óssea guiada e uso de fatores de crescimento. O tratamento é principalmente focado na redução da carga microbiana, seja através da RAR ou pelo uso de antimicrobianos. Após o tratamento, existe uma mudança na microbiota subgengival, em que os micro-organismos são menos patogênicos e há uma predominância de bactérias Gram-positivas e aeróbias (Ximénez-Fyvie et al., 2000). No entanto, tal alteração é temporária e há o reestabelecimento da microbiota mais agressiva após semanas ou meses e o uso de antimicrobianos não é suficiente para manter os efeitos da terapia periodontal (Quirynen et al., 2002).

Atualmente, existe um grande interesse por novas terapias entendidas como naturais, como o controle da microbiota pela ingestão de alguns micro-organismos, designados probióticos (Devine, Marsh, 2009). Estes são definidos internacionalmente como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Sanders, 2008). Estes benefícios são múltiplos, como estímulo do sistema imunológico, mantendo a microflora intestinal balanceada, redução de alergias infantis, auxílio no controle doença hepática (Brown, Valiere, 2004), melhora do efeito de algumas

drogas antineoplásicas (Baldwin et al., 2010) e em doenças bucais como cárie e periodontite (Koduganti et al., 2011; Salehi et al., 2014).

Os principais grupos de probióticos são os pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* (Koduganti et al., 2011; Chatterjee et al., 2011; Gupta, 2011; Britton et al., 2014). Os lactobacilos são uma classe funcional de bactérias fermentadoras não patogênicas, não toxigênicas, Gram-positivas, caracterizadas por produzir ácido láctico a partir de carboidratos, tornando-as úteis para a fermentação de alimentos. Dentre as várias espécies de lactobacilos, podemos destacar o *Lactobacillus reuteri* que tem sido amplamente utilizado em ensaios clínicos. Embora os mecanismos exatos de ação de *L. reuteri* continuem sendo elucidados, pelo menos três possibilidades plausíveis são sugeridas: 1) secreção de bacteriocinas, reuterina e reuter ciclina, que inibem o crescimento de uma ampla variedade de agentes patogênicos (Krasse et al., 2006); 2) capacidade de aderir em tecidos, competindo assim com bactérias patogênicas (Talarico et al., 1988); 3) inibição de secreção de citocinas pró-inflamatórias (Vivekananda et al., 2010). Além de produzir reuterina, *L. reuteri* forma seu próprio biofilme, competindo assim com microrganismos patogênicos, e ainda auxiliam na modulação da produção de TNF- α na presença e ausência de LPS, modulando resposta inflamatória (Jones, Versalovic, 2009).

Teoricamente, restaurar e manter o número de bactérias benéficas utilizando-se probióticos seria interessante para o tratamento e prevenção das doenças periodontais (Teughels et al., 2013). Soma-se a isso o uso indiscriminado de antibióticos e o surgimento de micro-organismos resistentes. Além da atividade antimicrobiana e da competição com outras bactérias, os probióticos ainda poderiam modular a resposta do hospedeiro, sendo utilizados como adjuntos à terapia convencional. Por isso, na última década numerosos trabalhos foram publicados no intuito de esclarecer a ação dos probióticos nas doenças periodontais. Nestes estudos, o *L. reuteri*, com as cepas ATCC 55730 (e sua substituta DSM 17938, que não apresenta os plasmídeos que carregam a resistência à tetraciclina e lincomicina) e a ATCC PTA 5289, também denominada *L. reuteri* Prodentis (Biogaia, 2015), foi o probiótico mais utilizado.

Os estudos avaliaram parâmetros clínicos e encontraram diminuição da profundidade de sondagem, índice de sangramento à sondagem, índice gengival e

índice de placa após o uso de *L. reuteri* em pacientes portadores de periodontite (Flichy-Fernandes et al., 2015; Tekce et al., 2015; Ince et al., 2015; Szkaradkiewicz et al., 2014; Vicario et al., 2013; Vivekananda et al., 2010; Krasse et al., 2006). Alguns também demonstraram aumento do nível de inserção clínica (Flichy-Fernandes et al., 2015; Szkaradkiewicz et al., 2014; Teughts et al., 2013; Vicario et al., 2013; Vivekananda et al., 2010).

Embora sejam numerosos os benefícios dos probióticos à saúde, eles são bactérias vivas, e a administração de organismos vivos não é isenta de riscos, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Kataria et al., 2009). Entre as preocupações associadas à administração de organismos vivos, revisadas por Kataria et al. (2009) estão: o alto risco de problemas em pacientes doentes (imunodeprimidos) ou muito jovens, fatores de virulência em cepas probióticas, disseminação de genes de resistência indesejados para populações de bactérias intestinais, início da resposta inflamatória, possíveis efeitos adversos em pacientes com dermatite atópica, aumento do risco de sepse, especialmente em recém-nascidos prematuros e possível formação de uma cepa persistente que prejudique a colonização normal de outros micro-organismos.

Por isso, a capacidade de lactobacilos em estimular a resposta imune em sua forma morta tem sido estudada, e atualmente existem preparações contendo micro-organismos não viáveis no mercado (Taverniti, Guglielmetti, 2011). São os chamados paraprobióticos ou probióticos fantasmas, formados por componentes da parede celular como os peptidoglicanos, lipopolissacarídeos (LPS) e partes citoplasmáticas, que, quando administrados oral ou topicamente, em quantidades adequadas, conferem benefícios ao consumidor, seja ele animal ou humano. Produtos contendo paraprobióticos são relativamente mais fáceis de padronizar, armazenar, teriam tempo de prateleira mais longo, sem a alteração da sua atividade após passagem pelo pH ácido do estômago. Além disso, a utilização de bactérias não viáveis poderia aumentar a gama de micro-organismos considerados para atividade probiótica. Uma quantidade desconhecida de células mortas pode estar presentes nas preparações probióticas convencionais, exercendo também um papel biológico (Adams, 2010). Os paraprobióticos, ao invés de pronunciados efeitos antimicrobianos, apresentam importantes efeitos imunomoduladores que agem interferindo na produção de IgE, IgG, e regulando a ação de T helper (Th) 1 e 2. A

interação direta do micro-organismo com o hospedeiro baseada na capacidade das células humanas reconhecerem componentes ou produtos bacterianos específicos independe da viabilidade microbiana (Taverniti, Guglielmetti, 2011).

Receptores para vários componentes microbianos são expressos na superfície epitelial e parecem ter papel importante na transdução do sinal intracelular que leva à produção de mediadores inflamatórios. Paraprobióticos também afetam tais vias de sinalização ligando-se a receptores toll-like de maneira agonista, reduzindo a resposta inflamatória, que estaria exacerbada em sua ausência (Kataria et al., 2009).

Frente à necessidade de novas alternativas terapêuticas e adjuvantes para periodontite, a possibilidade de tratar doenças bucais com um método natural, não invasivo e não estressante tem apelo importante, e pode prevenir problemas relacionados com tratamentos farmacológicos, como a resistência antibiótica. Frente à necessidade de novas alternativas terapêuticas ou adjuntas ao tratamento para doença periodontal, e ao sucesso do uso de *L. reuteri* em alguns estudos clínicos, levantamos a hipótese de que paraprobióticos derivados de *L. reuteri* podem também ser efetivos em casos de infecção por *P. gingivalis*. O estudo dos efeitos do lactobacilo vivo, morto e de seus produtos pode esclarecer mecanismos de ação do probiótico, e possibilitar o uso comercial de outras preparações, dado que os paraprobióticos teriam produção facilitada e maior tempo de prateleira.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos antimicrobianos e imunomodulatórios de *Lactobacillus reuteri* em osteoblastos e *Galleria mellonella* desafiados por *P. gingivalis*

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a atividade antimicrobiana de *L. reuteri* (ATCC 5289 associado à ATCC 17938) em sua forma viva, morta e sobrenadante sobre *P. gingivalis*;
- b) Analisar os efeitos de *Lactobacillus reuteri* em sua forma viva, morta e sobrenadante na curva de sobrevivência e densidade hemocitária de *Galleria mellonella*, após infecção por *Porphyromonas gingivalis*;
- c) Analisar os efeitos das preparações de *Lactobacillus reuteri* sobre viabilidade celular, níveis de óxido nítrico, IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α em células osteoblásticas infectadas por LPS de *Porphyromonas gingivalis* *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Lactobacillus reuteri*

Neste estudo foi utilizado *L. reuteri* Prodentis® (ATCC 5289 associado à ATCC 17938). Para ativação desse micro-organismo, um comprimido da preparação comercial Periobalance (Sunstar, Central Road, Schaumburge, Illinois, EUA) foi diluído em 10 mL de PBS estéril, por aproximadamente 10 min em Vórtex. A solução foi semeada pela técnica de esgotamento em Ágar de Man Rogosa-Sharpe (MRS) e cultivada em jarra de anaerobiose a 37°C por 3 dias, quando colônias isoladas foram confirmadas pela coloração de Gram.

Para o preparo do sobrenadante, a cepa foi incubada em caldo MRS a 37°C por 24h, em anaerobiose. Após este período foi realizada a suspensão padronizada em PBS de 10^8 células/mL em espectrofotômetro (DO= 1, em absorbância e comprimento de onda de 570nm). Posteriormente, 1 mL da suspensão padronizada foi transferida para um tubo falcon contendo 6 mL de caldo MRS, que foi incubado por 24h, quando foi acrescentado 300mM de glicerol, procedendo-se incubação por mais 3h. Para o preparo do sobrenadante, as células foram então centrifugadas em 4000 rpm por 10 min (McCabe et al., 2013), e o sobrenadante foi recolhido e esterilizado com filtro de membrana com poros de diâmetro de 0,22µm (Kang et al., 2011). Parte do sobrenadante recolhido teve o pH ajustado em 6,5 com NaOH, para eliminar os possíveis efeitos do ácido láctico sobre *P. gingivalis*.

3.2 *Porphyromonas gingivalis*

Foi utilizada cepa de *P. gingivalis* (ATCC 33277) para os testes de atividade antimicrobiana e todos os ensaios em *G. mellonella*.

Para ativação, a cepa de *P. gingivalis* foi cultivada em meio de *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA) como base para o ágar sangue (com sangue de carneiro

desfibrinado) suplementado com 0,1% de hemina e menadiona, em estufa bacteriológica à 37°C em jarra de anaerobiose, com gerador e indicador de anaerobiose durante sete dias. O micro-organismo foi padronizado em PBS a uma concentração de 10^8 células/mL em espectrofotômetro (DO= 1, em absorvância e comprimento de onda de 660nm), e esta foi utilizada no experimento de atividade antimicrobiana.

3.3 Atividade antimicrobiana- Teste de diluição em caldo

A atividade antibacteriana foi avaliada baseando-se na metodologia proposta por Lin X et al. (2015) com algumas alterações.

Foram preparadas suspensões padronizadas de 10^8 células/ml de *P. gingivalis*, *L. reuteri* e também de sobrenadante de *L. reuteri* conforme descrito nos itens 3.1 e 3.2. Os seguintes grupos foram avaliados:

- a) Grupo LV + PG (*L. reuteri* vivo + *P. gingivalis*): 250 µL da suspensão padronizada de *P. gingivalis* e 250 µL da suspensão padronizada de *L. reuteri* foram adicionados juntamente em tubos falcon contendo 1,5 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI);
- b) Grupo LS + PG (Sobrenadante de *L. reuteri* + *P. gingivalis*): Para determinar a atividade antibacteriana do sobrenadante da cultura de *L. reuteri*, 250 µL da suspensão padronizada de *P. gingivalis* e 250 µL do sobrenadante da cultura de *L. reuteri* foram adicionados juntamente em tubos falcon contendo 1,5 mL de caldo BHI;
- c) Grupo LSA + PG (Sobrenadante ajustado + *P. gingivalis*): 250 µL da suspensão padronizada de *P. gingivalis* e 250 µL do sobrenadante da cultura de *L. reuteri* (com pH ajustado a 6,5 com NaOH, para eliminar os possíveis efeitos do ácido láctico sobre *P. gingivalis*) foram adicionados juntamente em tubos falcon contendo 1,5 mL de caldo BHI;

- d) Grupo CPG (controle de *P. gingivalis*) 250 µL da suspensão padronizada de *P. gingivalis* e 250 µL de PBS foram adicionados em 1,5 mL de caldo BHI;
- e) Grupo CLV (controle de *L. reuteri* vivo): 250 µL da suspensão padronizada de *L. reuteri* e 250 µL de PBS foram adicionados em 1,5 mL de caldo BHI.

Todos os tubos foram incubados em anaerobiose a 37°C por 72h, após o quê foram realizadas diluições seriadas decimais das culturas, e alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri contendo meios de cultura apropriados (ágar sangue – AS suplementado com hemina e menadiona para *P. gingivalis* e MRS para *L. reuteri*). As placas foram incubadas em anaerobiose por 48 h, para *L. reuteri* e por 7 dias para *P. gingivalis*. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Para todos os grupos foi utilizado n=10.

3.4 *Galleria mellonella*

3.4.1 Grupos experimentais

Grupos experimentais e número de lagartas utilizadas por experimento em modelo de *G. mellonella* (Quadro 1).

Quadro 1 – Divisão de grupos e quantidade de *G. mellonella* utilizada

Grupo Experimental	Curva de sobrevivência	Densidade hemocitária
Infecção por <i>P. gingivalis</i> (15 lagartas para cada concentração – 10^4 a 10^8) - estudo de susceptibilidade	75	-
Infecção por <i>L. reuteri</i> (15 lagartas para cada concentração – 10^4 a 10^8) - estudo de susceptibilidade	75	-
Interação <i>L. reuteri</i> e <i>P. gingivalis</i> (LV + PG)	30	18
Interação sobrenadante de <i>L. reuteri</i> e <i>P. gingivalis</i> (LS + PG)	30	18
Interação <i>L. reuteri</i> morto e <i>P. gingivalis</i> (LM + PG)	30	18
Caldo MRS + glicerol e <i>P. gingivalis</i> (MRS+PG)	30	18
PBS e <i>L. reuteri</i> (CLV)	30	18
PBS e <i>P. gingivalis</i> (CPG)	30	18
Controle PBS (PBS)	30	18
TOTAL para cada experimento	285	126

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.2 Estudo de susceptibilidade e curva de sobrevivência de *G. mellonella* à infecção por *L. reuteri* e *P. gingivalis*

Antes do estudo da interação de *P. gingivalis* e *L. reuteri*, foi realizada uma análise da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por esses micro-organismos para determinação da concentração subletal a ser utilizada nos experimentos. Para isso, foram inoculadas em *G. mellonella* suspensões padronizadas de *P. gingivalis* ou *L. reuteri* nas concentrações de 10^4 a 10^8 células/mL, na última prolegue

esquerda. Para cada concentração, um inóculo de 10 μ L foi injetado em um grupo de 15 lagartas.

Antes da inoculação, as seringas (Hamilton Inc., EUA) utilizadas para as injeções foram esterilizadas com ácido peracético de acordo com as instruções do fabricante. Os animais foram acondicionados em placas de Petri e incubados a 37°C no escuro. Diariamente, durante 7 dias, o número de larvas mortas foi anotado. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentarem nenhum movimento ao toque por uma pinça metálica. Os animais mortos, assim que identificados, foram removidos do grupo (Figura 1).

Após a determinação das concentrações ideais de *P. gingivalis* e *L. reuteri*, passou-se ao estudo das interações.

Figura 1 – Lagartas escurecidas devido à infecção com *P. gingivalis*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Um inóculo de 10 μ L da suspensão padronizada de células, sobrenadante ou *L. reuteri* morto foram inoculados na última prolegue direita, 2h antes da inoculação da suspensão padronizada de *P. gingivalis*, na última prolegue esquerda. Para os grupos com infecção por um único micro-organismo, 10 μ L da suspensão do micro-organismo foram inoculados na última prolegue esquerda e o mesmo volume de PBS ou caldo MRS na última prolegue direita. Para cada micro-organismo foi utilizada uma seringa Hamilton. A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foi

realizada a cada 5 injeções e o número de animais mortos durante 7 dias foi avaliado.

Para o teste de sobrevivência de *G. mellonella*, suspensões de *P. gingivalis* e/ou de *L. reuteri* foram injetadas em 15 lagartas por grupo. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

3.4.3 Densidade hemocitária

Três lagartas de cada grupo foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 3h após a última injeção. A seguir, foi realizada uma incisão no sentido longitudinal da lagarta, entre os pares de prolegues, estendendo-se da primeira a última prolegue. A hemolinfa extravasada foi coletada em eppendorfs de 2 mL e diluída em soro fisiológico de inseto (4,38 g de NaCl, 186,4 mg de KCl, 7,87 g de Tris-HCl, 18,61 g de EDTA e 4,11 g citrato de sódio em dH₂O, pH 6.9) na proporção de 1:10. As células hemocitárias foram contadas utilizando um hemocitômetro. Cada amostra contou com um pool de 3 lagartas, e foram realizadas três réplicas, totalizando 9 lagartas por grupo.

3.5 Cultura de osteoblastos

Foi utilizada linhagem celular MG-63 (Osteossarcoma humano). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), mantido em frascos de cultivo celular, incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, com 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e quando foi observado estado de confluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as células foram utilizadas nos testes. Para tanto, a monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultura com auxílio de solução de tripsina a

37°C por 5 min. As células suspensas foram centrifugadas por 5 min a 3000rpm. Foi realizado o teste de exclusão pelo azul de Trypan, e o número de células viáveis foi quantificado pelo contador celular.

Para os testes, em microplacas de 24 poços foi adicionado meio DMEM + 10% de SFB contendo 2×10^4 células/mL de MG-63 viáveis por poço. As placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) por 24 h para que ocorresse aderência celular. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS, e tratadas com *L. reuteri* vivo, morto (na proporção de 1:25 e 1:100 células de *L. reuteri*/osteoblasto) ou o sobrenadante (não ajustado, no mesmo volume utilizado nos grupos com *L. reuteri* vivo ou morto) de acordo com a condição experimental.

Duas horas e meia após o tratamento, o meio foi removido, os poços foram lavados com D-PBS e foi acrescentado o LPS de *Porphyromonas gingivalis* (InvivoGen, San Diego, EUA) na concentração de 10µg/mL em cada poço, juntamente com 2% de gentamicina (Schering-Plough S/A, São Paulo, Brasil). As placas foram incubadas por 24h (37°C e 5% de CO₂), quando o sobrenadante foi coletado e armazenado sob refrigeração (-20°C) para posterior quantificação de IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-17, pelo teste imunoenzimático (ELISA), e dos níveis de óxido nítrico avaliados, indiretamente pela reação de Griess.

Foram avaliadas oito condições experimentais:

- a) Controle positivo - cultura somente de osteoblastos (C);
- b) Controle negativo - cultura de osteoblastos + LPS de *P. gingivalis* (CLPS);
- c) Osteoblastos + *L. reuteri* vivo (25:1)+ LPS de *P. gingivalis* (LV 25);
- d) Osteoblastos + *L. reuteri* vivo (100:1) + LPS de *P. gingivalis* (LV 100);
- e) Osteoblastos + *L. reuteri* morto (25:1)+ LPS de *P. gingivalis* (LM 25);
- f) Osteoblastos + *L. reuteri* morto (100:1)+ LPS de *P. gingivalis* (LM 100);
- g) Osteoblastos + *L. reuteri* sobrenadante (5ul)+ LPS de *P. gingivalis* (LS 5ul);
- h) Osteoblastos + *L. reuteri* sobrenadante (20ul)+ LPS de *P. gingivalis* (LS 20 ul).

O *n* foi igual a 5 para todos os grupos, com duplicata em todos os testes.

3.5.1 Avaliação de viabilidade celular

Para o estudo da viabilidade celular, as células foram cultivadas em placas de 24 poços e avaliadas 24 h e 5 dias após o tratamento com LPS de *P. gingivalis*.

Foi realizada análise da atividade mitocondrial das células viáveis pelo método de redução do brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazinha. A solução de MTT foi preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT em 1 mL de *Phosphate Buffer Saline* (PBS) estéril. Foram adicionados 100 µL/poço da solução de MTT e as placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) por 1 h, abrigadas da luz. Posteriormente, esta solução foi descartada e foram adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) para expor os cristais de formazina produzidos, após absorção do sal de MTT, por células viáveis. Após incubação de 10 min e agitação, por igual período, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

3.5.2 Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico nos sobrenadantes da cultura de osteoblastos, 24 h e 5 dias após o desafio com LPS, foi determinada indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess. Em uma placa de 96 poços, foram acrescentados 50 µL do reagente e 50µL das amostras dos sobrenadantes. Após 10 min a leitura foi realizada no leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. Para o cálculo da concentração, foram utilizadas amostras padrão de nitrito de 23 pg/mL a 0,72 pg/mL, constituindo uma curva-padrão.

3.5.3 Ensaio Imunoenzimático ELISA

Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti- IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17, e mantidas overnight em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e foram bloqueadas com soro de albumina bovina (BSA, 0,1%) por 1h. Após, as placas foram lavadas com PBS-T e receberam os sobrenadantes da cultura de células (100 μ L por poço) e os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata. Após duas horas, as placas foram lavadas (PBS-T) e foram acrescentados anticorpos de detecção marcados com biotina. Após 2 h, a reação foi revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. A reação foi bloqueada após 20 min com ácido sulfúrico 2 N. As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas com comprimento de onda de 480 nm.

3.6 Análise estatística

De acordo com a normalidade da amostra foram utilizados o teste paramétrico (ANOVA) ou não paramétrico (Kruskal-Wallis) para detectar diferenças nas amostras. Para os experimentos de sobrevivência em *G. mellonella* foi realizada a curva de sobrevivência e estimativa das diferenças pelo método de Log-rank (Mantel-Cox). Em todos os testes, foi considerado nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antimicrobiana-Teste de diluição em caldo

Após a interação das suspensões foi realizada a contagem de UFC/mL em ágar. Todos os dados foram submetidos à análise estatística (teste t, ANOVA) conforme as figuras:

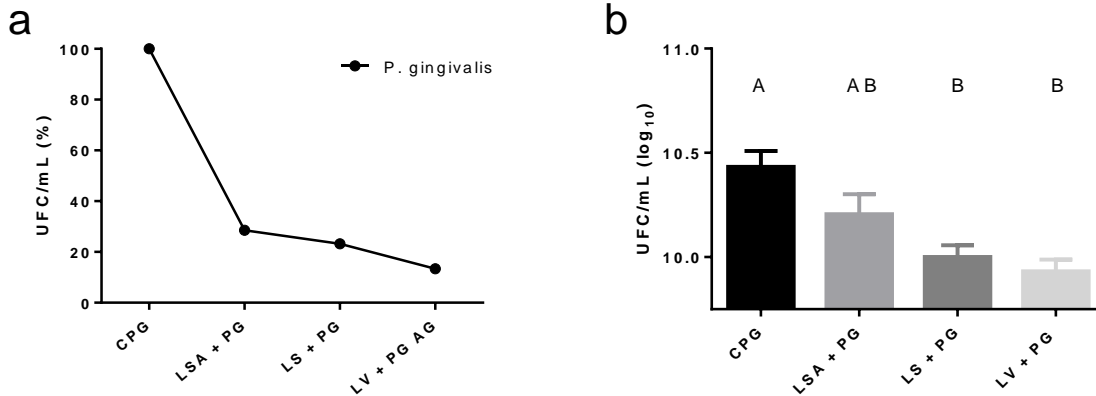
Na Figura 2a podemos observar o percentual de redução de colônias de *P. gingivalis* em contato com *L. reuteri*. Houve uma redução de 71,49% no grupo LSA + PG, 76,81% no grupo LS + PG e 86,6% no grupo LV+ PG em comparação ao grupo controle CPG.

Já na Figura 2b verificamos o resultado da ANOVA (F= 9,288; grau de liberdade (gl)= 3; p= 0,0001) e teste de Tukey. A contagem de UFC/ml no grupo CPG [10,43 UFC/ml (log)] foi significativamente maior em relação ao grupo LV+PG (9,93 log₁₀) (teste de Tukey – p<0,05) e grupo LS+PG [10 UFC/ml (log)] (teste de Tukey – p<0,05). Já o grupo LSA+PG [10,20 UFC/ml (log)] demonstrou uma diminuição não significativa em relação ao controle (teste de Tukey – p>0,05).

4.2 Estudo da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *L. reuteri* e *P. gingivalis*

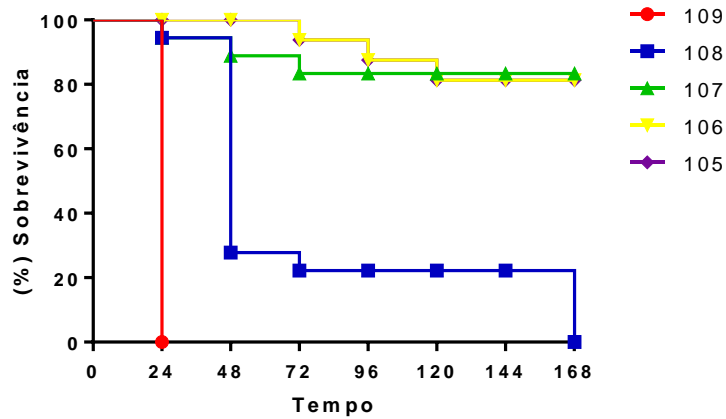
Após sete dias de infecção por *L. reuteri*, em todas as concentrações testadas (10⁴ a 10⁸), as lagartas demonstraram 100% de sobrevivência, comprovando que este micro-organismo não causa toxicidade alguma às lagartas. A concentração escolhida para avaliação da curva de sobrevivência foi a de 10⁸ células/ml de *L. reuteri* e 10⁸ células/ml de *P. gingivalis* (Figura 3).

Figura 2- a) Percentual de redução de *P. gingivalis* nos diversos grupos, em relação ao controle; b) Média e erro padrão e dos dados de UFC/mL (Log) de *P. gingivalis* após em interação em caldo BHI.



Legenda: CPG- Controle de *P. gingivalis*, LV- *L. reuteri* vivo, LS- Sobrenadante de *L. reuteri*, LSA- Sobrenadante ajustado *L. reuteri*, PG – *P. gingivalis*
 Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3- Curva de sobrevivência *G. mellonella* após infecção com diferentes concentrações de *P.gingivalis*

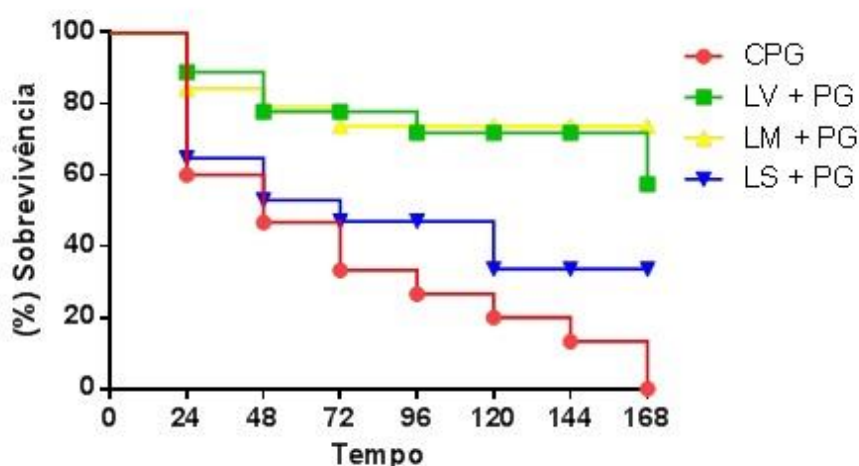


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Estudo da interação entre *P. gingivalis* e *L. reuteri* em *G. mellonella*

A sobrevivência foi observada durante 7 dias e a Figura 4 ilustra os resultados. Após o período de infecção observou-se no grupo CPG uma taxa de mortalidade de 100% durante o período, comparado com a taxa de 42,57% de mortalidade do grupo LV+PG e 26,32% LM+PG. *L. reuteri* vivo aumentou 57,43% e morto aumentou 73,68% a taxa de sobrevivência de *G. mellonella*, com uma diferença estatística significativa entre estes grupos e o grupo CPG (Log-rank/Mantel-cox, $p < 0,001$, $gl=1$). No entanto, não houve diferença entre o grupo LS+PG e CPG (Log-rank/Mantel-cox, $p=0,086$, $gl=1$), ou entre os grupos LM+PG e LV+PG entre si (Log-rank/Mantel-cox, $p=0,49$, $gl=1$). Não houve diferença estatística entre os grupos LS + PG e MRS + PG (Log-rank/Mantel-cox, $p=0,4904$, $gl=1$).

Figura 4- Curva de sobrevivência de *G. mellonella* no grupo em que houve interação entre *L. reuteri* vivo (LV+PG), *L. reuteri* morto (LM+PG) e sobrenadante com *P. gingivalis* (LS+PG) e no grupo controle negativo (CPG), apenas com injeção de *P. gingivalis*



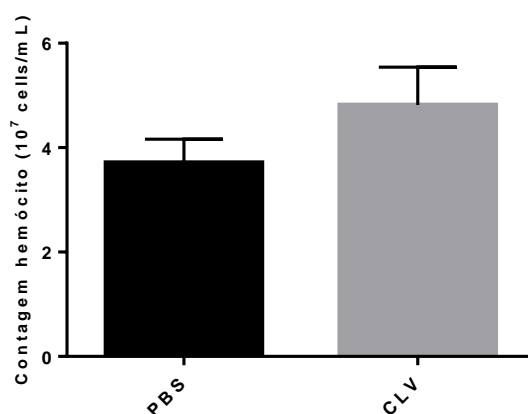
Legenda: CPG- Controle de *P. gingivalis*, LV- *L. reuteri* vivo, LS- Sobrenadante de *L. reuteri*, LM - *L. reuteri* morto, PG – *P. gingivalis*

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Densidade Hemocitária

A concentração escolhida para avaliação da densidade hemocitária foi a de 10^7 células/ml de *L. reuteri* e de *P. gingivalis*. O grupo CLV estimulou em 29,64% a produção de hemócitos de *G. mellonella* ($4,81 \times 10^5$ cel/ml), quando comparado ao grupo controle PBS ($3,71 \times 10^5$ cel/ml), apesar de não haver diferença estatística significativa (Figura 5).

Figura 5- Médias e erro-padrão da contagem de hemócitos de *G. mellonella*, comparação entre os grupos controle CLR e PBS

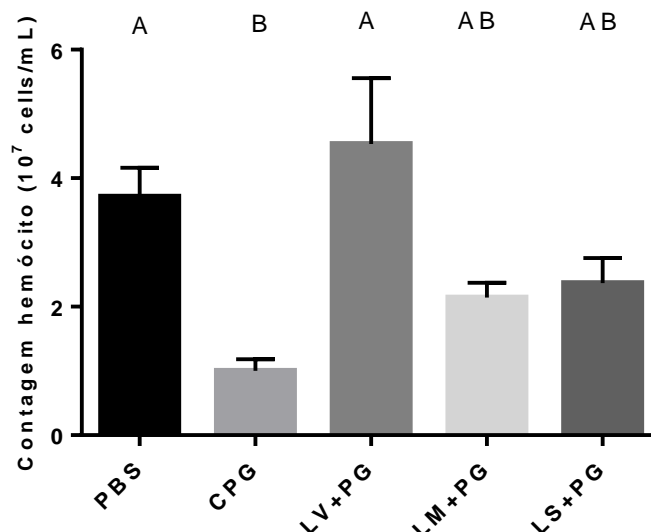


Legenda: CLV- Controle de *L. reuteri* vivo, PBS- Controle de lagartas somente com solução tampão
 Fonte: Elaborado pelo autor.

A média e erro padrão da quantidade de hemócitos presentes na hemolinfa das lagartas, nos grupos CPG (1×10^5 cel/ml), LV+PG ($4,53 \times 10^5$ cel/ml, aumento de 353% na produção de hemócitos, em comparação ao grupo CPG), LM+PG ($2,14 \times 10^5$ cel/ml, aumento de 114%, em comparação ao grupo CPG) e LS+PG ($2,36 \times 10^5$ cel/ml, aumento de 136%, em comparação ao grupo CPG) podem ser observados na Figura 6. A forma viva de *L. reuteri* é capaz de causar imunomodulação em *G. mellonella*, aumentando a quantidade de hemócitos quando

comparados ao grupo CPG, já as células mortas e o sobrenadante não obtiveram diferença estatística (Figura 6).

Figura 6- Média e erro padrão da contagem de hemócitos de *G. mellonella*, comparação entre os grupos.



Legenda: CPG- Controle de *P. gingivalis*, LV- *L. reuteri* vivo, LS- Sobrenadante de *L. reuteri*, LM - *L. reuteri* morto, PG – *P. gingivalis*.

Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.

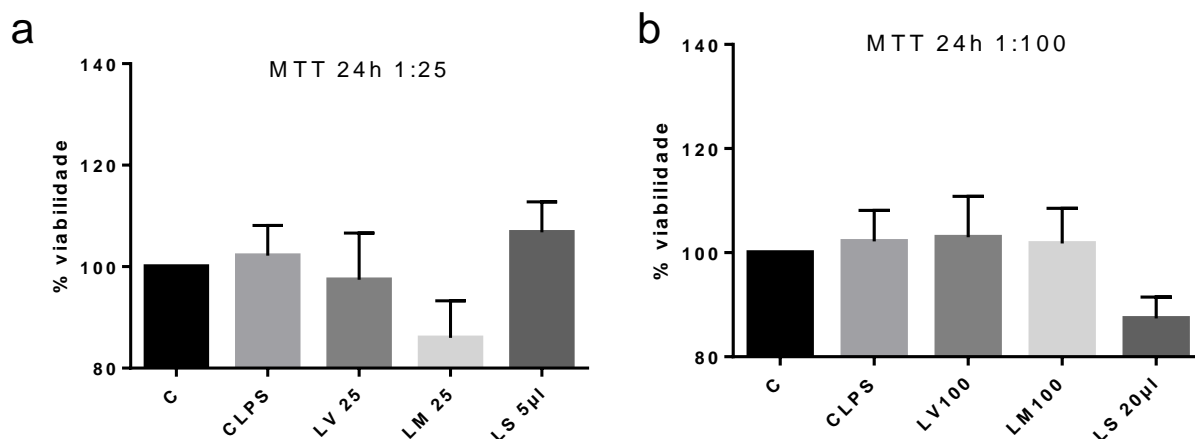
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Viabilidade celular e Óxido Nítrico

Tanto a estimulação com LPS de *P. gingivalis* quanto o tratamento com *L. reuteri* não foram tóxicos ou diminuíram a viabilidade celular dos osteoblastos, pois não houve diferença estatística em nenhum dos grupos avaliados (Figura 7).

Todos os valores encontrados no teste de óxido nítrico ficaram abaixo da curva padrão de nitrito, o que demonstra que não houve produção de óxido nítrico por nenhum dos grupos avaliados.

Figura 7- Média e erro padrão da porcentagem de viabilidade celular após 24h. a) concentração de 1:25 células de *L. reuteri*/osteoblasto; b) 1:100 células de *L. reuteri*/osteoblasto

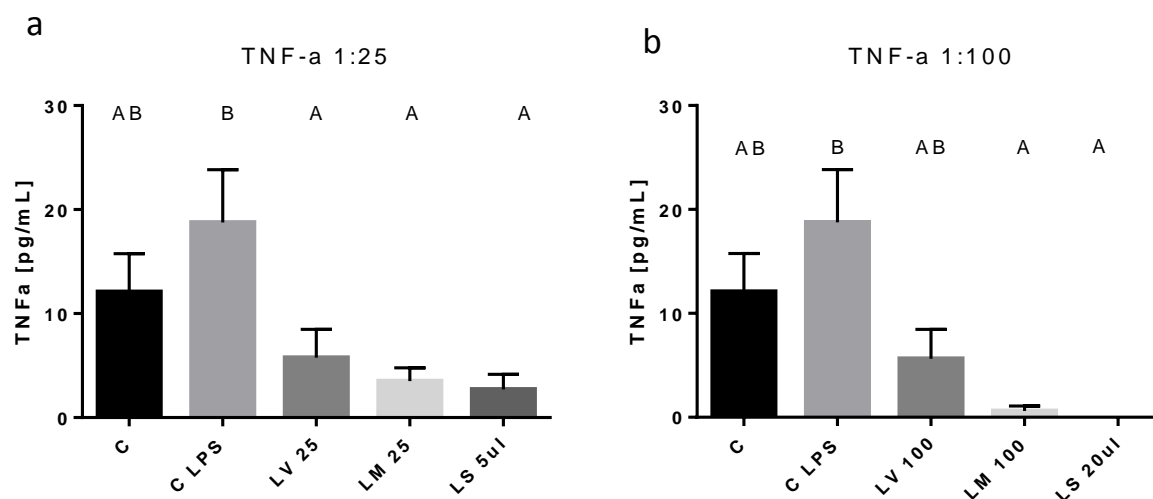


Legenda: C- Controle de células, CLPS – Controle de células e LPS de *P. gingivalis*, LV- *L. reuteri* vivo, LS- Sobrenadante de *L. reuteri*, LM - *L. reuteri* morto.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Citocinas inflamatórias

A secreção de TNF- α foi estatisticamente menor nos grupos tratados com *L. reuteri*, em sua forma morta ou sobrenadante quando comparada ao grupo controle de LPS de *P. gingivalis*, tanto na proporção de 1:25 (Figura 8a; F= 4,587; gl= 4; p= 0,0034) quanto na proporção de 1:100 osteoblastos/*L. reuteri* (Figura 8b; H=21,49; p= 0,0003), assim como nos dois volumes utilizados de sobrenadante, 5 e 20µl (Figura 8). Interessantemente, apenas o tratamento com *L. reuteri* vivo na proporção de 1:25 (e não na proporção 1:100) reduziu os níveis de TNF- α em comparação ao controle com LPS.

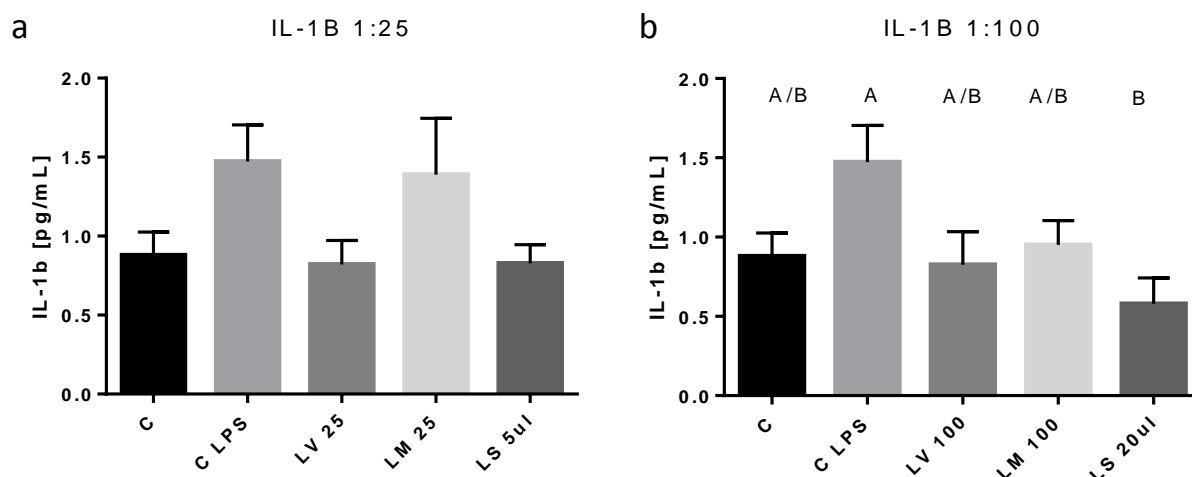
Figura 8- Média e erro padrão da quantificação de TNF- α ; a) concentração de 1:25 células de *L. reuteri*/osteoblasto; b) 1:100 células de *L. reuteri*/osteoblasto, e comparação entre os grupos. Comparação entre os grupos



Legenda: C- Controle de células, CLPS – Controle de células e LPS de *P. gingivalis*, LV- *L. reuteri* vivo, LS- Sobrenadante de *L. reuteri*, LM - *L. reuteri* morto.
 Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Em nenhum dos grupos tratados com *L. reuteri* e suas preparações, na proporção de 1:25 osteoblastos/*L. reuteri*, verificou-se redução significativa de IL-1 β , quando comparados ao grupo controle de LPS de *P. gingivalis* resultado da ANOVA (F= 2,194; gl=3; p= 0,0848). Apenas o sobrenadante, no volume de 20 μ l, reduziu significativamente a secreção da citocina quando comparada ao grupo controle de LPS resultado da ANOVA (F= 3,2; gl= 4; p= 0,0214) (Figura 9).

Figura 9- Média e erro padrão da quantificação de IL-1 β . a) concentração de 1:25 células de *L. reuteri*/osteoblasto; b) 1:100 células de *L. reuteri*/osteoblasto e comparação entre os grupos. Comparação entre os grupos



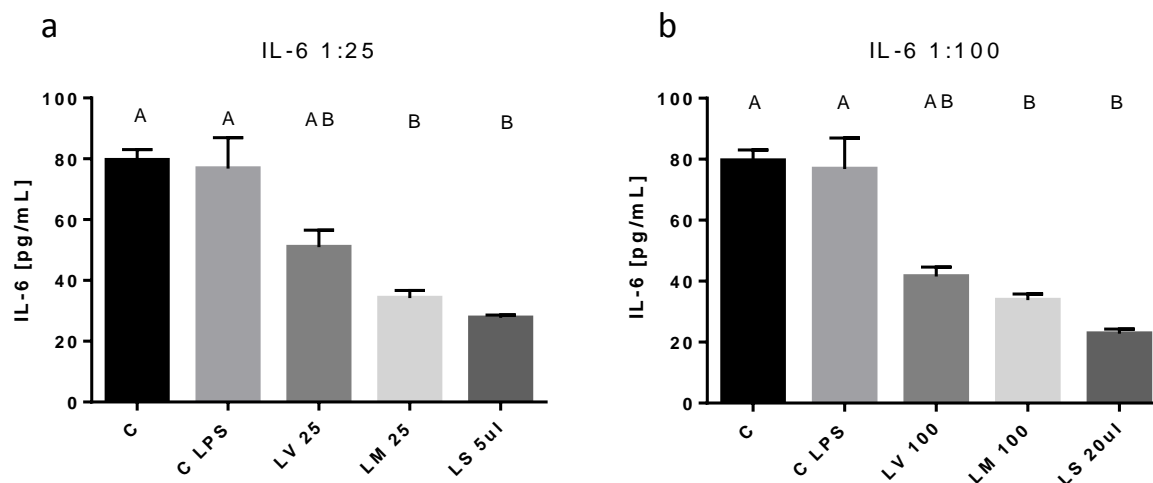
Legenda: C- Controle de células, CLPS – Controle de células e LPS de *P. gingivalis*, LV- *L. reuteri* vivo, LS- Sobrenadante de *L. reuteri*, LM - *L. reuteri* morto.

Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A secreção de IL-6 foi estatisticamente menor em todos os grupos tratados com *L. reuteri* morto e sobrenadante, independente da proporção (1:25 H= 32,14; p= <0,0001; 1:100 H= 3937; p= <0,0001), quando comparados ao grupo controle de LPS de *P. gingivalis* e ao controle só de células. Os grupos tratados com *L. reuteri* vivo não apresentaram diferença estatística em comparação aos grupos controle (Figura 10).

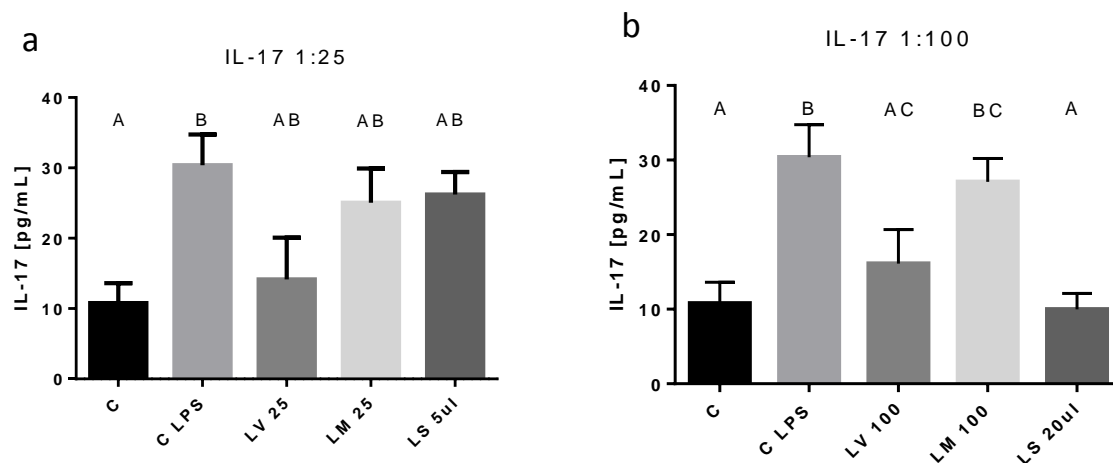
Figura 10- Média e erro padrão da quantificação de IL-6. a) concentração de 1:25 células de *L. reuteri*/osteoblasto; b) 1:100 células de *L. reuteri*/osteoblasto e comparação entre os grupos



Legenda: C- Controle de células, CLPS – Controle de células e LPS de *P. gingivalis*, LV- *L. reuteri* vivo, LS- Sobrenadante de *L. reuteri*, LM - *L. reuteri* morto.
Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Não houve diferença com relação aos valores de IL-17 em nenhum dos grupos tratados com *L. reuteri*, quando comparados ao grupo controle de LPS de *P. gingivalis*, na proporção de 1:25 resultado da ANOVA ($F= 4,05$; $p= 0,0069$; $gl=3$) assim como com o volume de 5 μ l do sobrenadante. O mesmo ocorreu com o tratamento com *L. reuteri* vivo e morto na proporção de 1:100. Já o volume de 20 μ l resultado da ANOVA ($F= 7,017$; $p= 0,0002$) conseguiu diminuir estatisticamente a secreção da citocina quando comparada ao grupo controle de LPS. Os grupos controle somente de células e o grupo controle LPS também apresentaram diferença estatística entre si (Figura 11).

Figura 11- Média e erro padrão da quantificação de IL-17. a) concentração de 1:25 células de *L. reuteri*/osteoblasto; b) 1:100 células de *L. reuteri*/osteoblasto e comparação entre os grupos



Legenda: C- Controle de células, CLPS – Controle de células e LPS de *P. gingivalis*, LV- *L. reuteri* vivo, LS- Sobrenadante de *L. reuteri*, LM - *L. reuteri* morto.

Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Embora probióticos sejam bactérias que conferem benefícios ao hospedeiro (Sanders, 2008), o seu uso não é isento de riscos (Zhang Y et al., 2014). Por isso, propusemos estudar os efeitos da preparação probiótica, paraprobótica, assim como o sobrenadante de *L. reuteri*. Além disso, estudar os efeitos separadamente da estrutura bacteriana e de seus produtos permite o melhor entendimento dos efeitos da bactéria viva.

No estudo da atividade antimicrobiana foram avaliados os efeitos diretos das células de *L. reuteri* sobre *P. gingivalis* e também os efeitos anti- *P. gingivalis* do sobrenadante da cultura de *L. reuteri*, sem e com ajuste de pH, para avaliar a interferência da acidez e também dos produtos do sobrenadante na inibição dos micro-organismos. Houve redução na contagem de UFC/mL de *P. gingivalis* após interação com as células de *L. reuteri* viáveis, bem como na interação com o sobrenadante sem ajuste do pH. O sobrenadante que teve o pH ajustado para 6,5 não apresentou efeito inibitório sobre *P. gingivalis*. Pode-se considerar, frente a esse resultado, que o meio ácido é essencial para o efeito inibitório do sobrenadante, diferentemente dos demais produtos. A literatura tem mostrado a importância do ambiente ácido nas interações entre *L. reuteri* e outros micro-organismos. Söderling et al. (2011) por exemplo, estudaram os efeitos das cepas de *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* 299V e *L. reuteri* PTA 5289 e SD2112 sobre a formação de biofilmes de *S. mutans*. Todas as cepas analisadas diminuíram a formação de biofilme por *S. mutans* *in vitro* e a atividade antimicrobiana foi dependente do pH da cultura dos probióticos.

A reuterina (β -hidroxi-propionaldeído) é um pequeno composto antimicrobiano, produzido pelo *L. reuteri*, que possui atividade antimicrobiana para uma gama de patógenos incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e protozoários. A reuterina inibe a atividade de ribonucleotídeo redutase *in vitro*, e uma vez que a ribonucleotídeo redutase catalisa o primeiro passo na síntese de DNA, esta é provavelmente a razão para o amplo espectro antimicrobiano da reuterina (Talarico, Dobrogosz, 1989). A atividade da reuterina é influenciada pela temperatura, mas não pelo pH (Rasch, 2002). Uma limitação desta pesquisa foi não

termos isolado a reuterina para avaliar sua atividade antimicrobiana contra *P. gingivalis*.

O ensaio da atividade antimicrobiana mostra que o sobrenadante do *L. reuteri* foi tão eficaz em inibir *P. gingivalis* quanto a bactéria viva. Tais resultados evidenciam que a redução da atividade microbiana não ocorre pela competição bacteriana, mas sim pelos produtos produzidos pelo probiótico.

Há uma grande tendência em se reduzir o número de animais experimentais utilizados em laboratório, assim como aumentar o seu conforto e reduzir a dor. Para isso, cada vez mais se procura um modelo bioético para substituí-los, como o modelo de invertebrado. O uso da espécie *Galleria mellonella* tem se tornado uma alternativa de modelo experimental aos tradicionais mamíferos. As lagartas são de fácil manutenção e manipulação, vivem em temperatura de 37°C semelhante aos mamíferos. Possuem estrutura similar aos mamíferos também, com uma substância parecida com o sangue, a hemolinfa, a qual é composta de células responsáveis pela imunomodulação do invertebrado (Le et al., 2009; Hughes et al., 2010; Cook, McArthur, 2013) .

No presente estudo, foi inoculada a bactéria *P. gingivalis* em modelo invertebrado de *G. mellonella* para o estudo *in vivo* das interações com diferentes formulações de *L. reuteri*. Como não há estudos na literatura sobre a inoculação de *L. reuteri* em *G. mellonella* como modelo experimental, avaliou-se a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *L. reuteri* antes do estudo com *P. gingivalis*, e houve 100% de sobrevivência.

As lagartas de *G. mellonella* se apresentavam mais lentas e escurecidas após a inoculação do micro-organismo patogênico e ao final de 7 dias todas estavam mortas na concentração de 10^8 células/mL. Esta concentração foi definida em estudo de susceptibilidade, por ser uma quantidade letal para o modelo de invertebrado. Para se evitar o favorecimento de uma ou outra espécie bacteriana, também utilizamos 10^8 células/mL de *L. reuteri* para o estudo da curva de sobrevivência.

O grupo controle somente com caldo MRS obteve 100% de sobrevivência, indicando que o caldo MRS é inócuo para *G. mellonella*. A interação de *P. gingivalis* com *L. reuteri* vivo e morto aumentou significativamente a sobrevivência, 57,43% no grupo de *L. reuteri* vivo (LV+PG) e 73,68% no grupo de *L. reuteri* morto

(LM + PG). O grupo sobrenadante (LS+PG) não aumentou significativamente a sobrevivência das lagartas.

Tanto o lactobacilo vivo (LV) como o paraprobiótico (LM) demonstraram efeito na sobrevivência das lagartas, entretanto o sobrenadante não apresentou a mesma eficácia. No processo de imunomodulação avaliado pela sobrevivência, as características estruturais do *L. reuteri* são mais importantes que as substâncias que ele produz.

A hemolinfa da *G. mellonella* contém células (hemócitos) e peptídeos antimicrobianos capazes de imobilizar e matar microrganismos invasores. Estas células, que são fagócitos e executam funções semelhantes a macrófagos e neutrófilos humanos, também circulam livremente na hemolinfa e nos tecidos para reconhecer e fagocitar antígenos, incluindo micro-organismos invasores como vírus e bactérias, ou encapsular estruturas maiores como helmintos, e então destruí-los (Cook, McArthur, 2013).

Foi realizada a contagem de hemócitos, e apenas a presença do lactobacilo vivo levou a um aumento significativo destas células na interação com o patógeno, com diferença estatística quando comparado ao grupo CPG. No modelo de invertebrado, a infecção de um patógeno com alto grau de patogenicidade leva à diminuição da quantidade de hemócitos. Micro-organismos de alta virulência em seres humanos possuem alta virulência nas lagartas, e o contrário também é verdadeiro, micro-organismos de baixa virulência em mamíferos agridem menos este invertebrado (Bergin et al., 2003). No grupo CPG, a quantidade de células de defesa sofreu um decréscimo, o que se deve à alta patogenicidade da *P.gingivalis*. O grupo CPG apresentava menor quantidade de hemócitos que o grupo PBS e CLR, demonstrando que o modelo experimental estava sob infecção. Na inoculação isoladamente do lactobacilo vivo (CLR), não houve alteração no número de hemócitos revelando que *L. reuteri* não causou patogenicidade alguma à lagarta. Apesar de tanto o lactobacilo vivo como a preparação paraprobiótica terem aumentado a sobrevivência, apenas o lactobacilo vivo levou ao aumento do número de hemócitos.

Verificamos com este estudo que a densidade hemocitária não é a única responsável pela resposta imune em *G. mellonella*, pois apesar de termos obtido nesta análise diferença estatística somente com *L. reuteri* viável, na análise da curva

de sobrevivência, o *L. reuteri* morto reduziu a taxa de mortalidade igualmente à bactéria viva. Isso confirma que, na imunomodulação há também a participação humoral, dos peptídeos antimicrobianos, e do processo de melanização, não sendo os hemócitos os únicos responsáveis pelo aumento da sobrevivência. A resposta celular dos insetos inclui fagocitose, nodulação, e encapsulamento e a resposta imune humoral consiste em diversos processos, incluindo a melanização, coagulação da hemolinfa, e a produção de inúmeros peptídeos antimicrobianos potentes em grande escala (Hoffman, 1995).

O teste de viabilidade celular (MTT) demonstrou que o LPS de *P. gingivalis* e as preparações de *L. reuteri* não foram tóxicos às células e também não interferiram na proliferação celular. O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da parede celular de todos os micro-organismos Gram-negativos, sendo um dos mais importantes estimulantes da resposta imune inflamatória. Os LPS são conhecidos por induzir infiltração de leucócitos polimorfonucleares, edema e dilatação vascular em tecidos periodontais inflamados. Além disso, o LPS desempenha um papel fundamental na destruição do tecido periodontal, incluindo a gengiva, o ligamento periodontal e o osso alveolar, através do estímulo da produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-1 β , IL-6 e IL-17 (Page, 1991; Cross et al., 2004). Berklen et al. (2007) demonstraram que IL-1 β , TNF- α e IL-17 são produzidos pelo tecido gengival saudável em níveis baixos, mas são altamente elevados em periodontite. Tanto a interleucina-1 β como o fator de necrose tumoral são citocinas pró-inflamatórias envolvidas na inflamação sistêmica e causam morte celular apoptótica, proliferação celular e inflamação (Agarwal et al., 1995; Scheres et al., 2009).

Um estudo piloto foi realizado para avaliar qual seria a melhor concentração de LPS para estimular as células osteoblásticas. A literatura relata uma grande variação de concentrações capazes de estimular os osteoblastos, e foram testadas então as quantidades de 500ng/mL, 1 μ g/mL, 5 μ g/mL e 10 μ g/mL (Kato et al., 2014). Neste estudo optou-se pela concentração de 10 μ g/mL de LPS de *P. gingivalis*, a mesma utilizada por Kato et al. (2014), pois foi a que estimulou a maior produção de IL-6 nas células osteoblásticas, após 24h no estudo piloto. Dentre os grupos testados, LPS foi capaz de aumentar significativamente somente a produção de IL-17 comparada ao grupo controle.

Diferentes grupos celulares reagem de forma distinta a diferentes concentrações de LPS. Um estudo avaliou fibroblastos gengivais humanos com diferentes concentrações de LPS de *P. gingivalis*, e observaram que apenas as concentrações mais elevadas (1000 e 3000ng/ml) de LPS aumentaram a expressão de interleucina IL-6 e IL-8 (Bozkurt et al., 2017).

Diversos trabalhos na literatura associam o uso de *L. reuteri* ou outros lactobacilos à redução de níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-17 em indivíduos com gengivite/ periodontite (Twetman et al., 2009; Maekawa, Hajishegallis, 2014), evidenciando os efeitos imunomoduladores do tratamento na inflamação periodontal. O sobrenadante de *L. reuteri* ATCC PTA 5289 inibiu o TNF em 73% em comparação com o grupo controle (Jones, Versalovic, 2009). Este trabalho demonstrou que *L. reuteri* vivo não obteve melhores resultados se comparado ao paraprobiótico e ao sobrenadante. Os efeitos do *L. reuteri* vivo foram iguais ao do *L. reuteri* morto *in vivo* (exceto contagem de hemócitos) e em cultura celular. Na expressão de citocinas, *L. reuteri* morto e o sobrenadante foram melhores que a bactéria viva. Sugere-se que a estrutura bacteriana assim como o seu produto são tão eficazes contra *P. gingivalis* quanto *L. reuteri* vivo e devem ser avaliados em animais experimentais e ensaios clínicos.

A criação de um produto paraprobiótico auxiliaria no tratamento da doença periodontal assim como o produto vivo, entretanto não confere qualquer risco para o paciente. Este produto ainda teria maior tempo de armazenamento que os atuais produtos com a bactéria viva, existentes no mercado.

6 CONCLUSÃO

Perante os resultados obtidos conclui-se que, neste modelo experimental:

- a) *Lactobacillus reuteri* vivo e seu sobrenadante sem ajuste de pH possuem efeito antimicrobiano em relação a *Porphyromonas gingivalis*;
- b) *Porphyromonas gingivalis* é patogênica ao modelo de invertebrado *Galleria mellonella* e *Lactobacillus reuteri* oferece uma ação probiótica e paraprobiótica na presença da *Porphyromonas gingivalis in vivo*;
- c) O paraprobiótico apresentou os mesmos efeitos que o lactobacilo viável na redução de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17), sendo que o paraprobiótico, diferentemente do lactobacilo vivo, reduziu significativamente as quantidades de IL-6 e TNF- α com relação ao grupo controle de LPS. As maiores reduções nas citocinas estudadas foram obtidas com o uso do sobrenadante;
- d) Os efeitos antimicrobianos e imunomoduladores de *L. reuteri* não dependem da viabilidade celular, o que possibilita o desenvolvimento de produtos sem a bactéria viva com efeitos semelhantes. Estudos em vertebrados e clínicos são necessários para confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS*

Adams CA. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev.* 2010;23(1):37-46. doi: 10.1017/S0954422410000090.

Agarwal S, Baran C, Piesco ND, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, et al. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta. *J Periodontal Res.* 1995;30:382-9.

Bainbridge BW, Coats SR, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the innate host defense system. *Ann Periodontol.* 2002;7(1):29-37. doi:10.1902/annals.2002.7.1.29

Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz MT, Luquet FM, Lacroix M. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Nutr Cancer.* 2010;62(3):371-8. doi:0.1080/01635580903407197.

Belibasakis GN, Bostanci N, Hashim A, Johansson A, Aduse-Opoku J, Curtis MA, et al. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. *Microb Pathog.* 2007;43(1):46-53. doi: 10.1016/j.micpath.2007.03.001

Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gürkan C, Sorsa T, Kontinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res.* 2007;86(4):347-51. doi: 10.1177/154405910708600409

Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* 2003;5(15):1389-95.

Biogaia [Internet] Suiça. History of *Lactobacillus reuteri*; [acesso em 2015 Dec 14]; [aproximadamente 4 p.]; Disponível em: <http://www.biogaia.com/history-lactobacillus-reuteri>.

Bozkurt BS, Hakki SS, Hakki EE, Durak Y, Kantarci A. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces a pro-inflammatory human gingival fibroblast phenotype. *Inflamm.* 2017;40(1):144-53. doi: 10.1007/s10753-016-0463-7.

Britton RA, Irwin R, Quach D, Schaefer L, Zhang J, Lee T, et al. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model. *J Cell Physiol.* 2014;229(11):1822-30. doi: 10.1002/jcp.24636.

Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr Clin Care.* 2004;7(2):56-68.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Chatterjee A, Bhattacharya H, Kandwal A. Probiotics in periodontal health and disease. *J Indian Soc Periodontol*. 2011;15(1):23-8. doi: 10.4103/0972-124X.82260
- Cook SM, McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*. 2013;4(5):350-3. doi: 10.4161/viru.25240.
- Cross ML, Ganner A, Teilab D, Fray LM. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *Immunol Med Microbiol*. 2004;42(2):173-80. doi: 10.1016/j.femsim.2004.04.001
- Devine DA, Marsh PD. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *J Oral Microbiol*. 2009;1. doi: 10.3402/jom.v1i0.1949
- Ditmann C, Doueiri S, Kluge R, Dommisch H, Gaber T, Pischon N. *Porphyromonas gingivalis* Suppresses Differentiation and Increases Apoptosis of Osteoblasts From New Zealand Obese Mice. *J Periodontol*. 2015 Sep;86(9):1095-102. doi: 10.1902/jop.2015.150032.
- Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:112-41.
- Flichy-Fernández AJ, Ata-Ali J, Alegre-Domingo T, Candel-Martí E, Ata-Ali F, Palacio JR, et al. The effect of orally administered probiotic *Lactobacillus reuteri*-containing tablets in peri-implant mucositis: a double-blind randomized controlled trial. *J Periodontal Res*. 2015 Dec;50(6):775-85. doi: 10.1111/jre.12264
- Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr*, 2005 Apr;93 Suppl 1:S41-8.
- Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol*. 2007;115(1):1-11. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.006
- Gupta G. Probiotics and periodontal health. *J Med Life*. 2011;4(4):387-94.
- Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Cur. Opinion in Immunol*. 1995 Feb;7(1):4-10.
- Hughes FJ, Ghuman M, Talal A. Periodontal regeneration: a challenge for the tissue engineer. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010 Dec;224(12):1345-58. doi: 10.1243/09544119JEIM820.
- İnce G, Gürsoy H, İpçi Ş, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yılmaz S. Clinical and biochemical evaluation of *Lactobacillus reuteri* containing lozenges as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2015:1-13. doi: 10.1902/jop.2015.140612
- Jones SE, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol*. 2009;9:35. doi: 10.1186/1471-2180-9-35.

Kang MS, Oh JS, Lee HC, Lim HS, Lee SW, Yang KH, et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *J Microbiol.* 2011;49(2):193-9. doi: 10.1007/s12275-011-0252-9.

Kataria J, Li N, Wynn JL, Neu J. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutr Rev.* 2009;67(9):546-50. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00226.x.

Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol.* 2014;59(2):167-75. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.11.008.

Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J.* 2006;30(2):55-60.

Koduganti RR, Sandeep N, Guduguntla S, Chandana Gorthi VS. Probiotics and prebiotics in periodontal therapy. *Indian J Dent Res.* 2011;22(2):324-30. doi: 10.4103/0970-9290.84312.

Le XK, Laflamme C, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis* decreases osteoblast proliferation through IL-6-RANKL/OPG and MMP-9/TIMPs pathways. *Indian J Dent Res.* 2009;20(2):141-9. doi: 10.4103/0970-9290.52884.

Lin FY, Hsiao FP, Huang CY, Shih CM, Tsao NW, Tsai CS, et al. *Porphyromonas gingivalis* GroEL induces osteoclastogenesis of periodontal ligament cells and enhances alveolar bone resorption in rats. *PLoS One.* 2014;9(7):e102450. doi: 10.1371/journal.pone.0102450.

Lin X, Chen X, Chen Y, Jiang W, Chen H. The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Dis.* 2015;21(1):e128-34. doi: 10.1111/odi.12257.

Loomer PM, Ellen RP, Tenenbaum HC. Characterization of inhibitory effects of suspected periodontopathogens on osteogenesis *in vitro*. *Infect Immun.* 1995;63(9):3287-96.

Loomer PM, Sigusch B, Sukhu B, Ellen RP, Tenenbaum HC. Direct effects of metabolic products and sonicated extracts of *Porphyromonas gingivalis* 2561 on osteogenesis *in vitro*. *Infect Immun.* 1994;62(4):1289-97.

Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res.* 2014;49(6):785-91. doi: 10.1111/jre.12164.

Mao S, Park Y, Hasegawa Y, Tribble GD, James CE, Handfield M, et al. Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas*

gingivalis. Cell Microbiol. 2007;9(8):1997-2007. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00931.x.

McCabe LR, Irwin R, Schaefer L, Britton RA. Probiotic use decreases intestinal inflammation and increases bone density in healthy male but not female mice. J Cell Physiol. 2013;228(8):1793-8. doi: 10.1002/jcp.24340.

Moysés SJ. Inequalities in oral health and oral health promotion. Braz Oral Res. 2012;26 Suppl 1:86-93.

Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I, Yamamura T, Kuboniwa M, Nakayama K, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. Infect Immun. 2004;72(3):1706-14.

Page R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodont Res. 1991;26:230-42.

Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. Periodontol 2000. 2002;28:72-90.

Rasch M. The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. Int J Food Microbiol. 2002 Feb 5;72(3):225-31.

Salehi R, Savabi O, Kazemi M, Kamali S, Salehi AR, Eslami G, et al. Effects of *Lactobacillus reuteri*-derived biosurfactant on the gene expression profile of essential adhesion genes (*gtfB*, *gtfC* and *ftf*) of *Streptococcus mutans*. Adv Biomed Res. 2014;3:169. doi: 10.4103/2277-9175.139134.

Salvi GE, Spets-Happonen S, Singer RE, Offenbacher S. Reconstitution of a hyperinflammatory prostaglandin E2 response to *Porphyromonas gingivalis* challenge in severe combined immunodeficient mice. J Periodontol. 2005;76(1):16-21. doi:10.1902/jop.2005.76.1.16.

Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. Clin Infect Dis. 2008;46 Suppl 2:S58-61; discussion S144-51. doi: 10.1086/523341.

Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res. 2010 Apr;45(2):262-70. doi: 10.1111/j.1600-0765.2009.01229.x.

Söderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL. Probiotic Lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. Curr Microbiol. 2011 Feb;62(2):618-22. doi: 10.1007/s00284-010-9752-9. Epub 2010 Sep 11.

- Szkaradkiewicz AK, Karpin Ski TM, Zeidler A, Szkaradkiewicz A. Opposite effect of supernatants from selected periopathogens and oral lactobacilli cultures on ATP levels in human gingival fibroblasts. *New Microbiol.* 2014;37(4):509-16.
- Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(12):1854-8.
- Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(5):674–9.
- Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 2011;6(3):261-74. doi: 10.1007/s12263-011-0218-x.
- Tekce M, Ince G, Gursoy H, Dirikan Ipci S, Cakar G, Kadir T, et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol.* 2015;42(4):363-72. doi: 10.1111/jcpe.12387.
- Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2013;40(11):1025-35. doi: 10.1111/jcpe.12155.
- Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand.* 2009;67(1):19-24. doi: 10.1080/00016350802516170.
- Vicario M, Santos A, Violant D, Nart J, Giner L. Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(3-4):813-9. doi: 10.3109/00016357.2012.734404.
- Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol.* 2010;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5344.
- Wang YH, Jiang J, Zhu Q, AlAnezi AZ, Clark RB, Jiang X, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipids inhibit osteoblastic differentiation and function. *Infect Immun.* 2010;78(9):3726-35. doi: 10.1128/IAI.00225-10.
- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000 Oct;27(10):722-32.

- Xing Q, Ye Q, Fan M, Zhou Y, Xu Q, Sandham A. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide inhibits the osteoblastic differentiation of preosteoblasts by activating Notch1 signaling. *J Cell Physiol.* 2010;225(1):106-14. doi: 10.1002/jcp.22201.
- Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2004;72(7):3743-51.
- Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol.* 2002;4(5):305-14.
- Zhang D, Zheng H, Zhao J, Lin L, Li C, Liu J, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces intracellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells through the nuclear factor-kappaB pathway, but not through the p38 MAPK pathway. *J Periodontal Res.* 2011;46(1):31-8. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01305.x.
- Zhang JY, Yu SJ, Fu Y. Effect of sonicated extracts of *Porphyromonas gingivalis* on osteogenic differentiation of mouse osteoblasts. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2013;48(7):398-402.
- Zhang W, Swearingen EB, Ju J, Rigney T, Tribble GD. *Porphyromonas gingivalis* invades osteoblasts and inhibits bone formation. *Microbes Infect.* 2010;12(11):838-45. doi: 10.1016/j.micinf.2010.05.011.
- Zhang Y, Wang XC, Bao XF, Hu M, Yu WX. Effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on osteoblast-osteoclast bidirectional EphB4-EphrinB2 signaling. *Exp Ther Med.* 2014;7(1):80-4. doi:10.3892/etm.2013.1357
- Zhao JJ, Feng XP, Zhang XL, Le KY. Effect of *Porphyromonas gingivalis* and *Lactobacillus acidophilus* on secretion of IL1B, IL6, and IL8 by gingival epithelial cells. *Inflammation.* 2012;35(4):1330-7. doi: 10.1007/s10753-012-9446-5.