

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/05/2018.



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 $\beta$ , IL-6, IL-17 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , 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 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17, sendo que o paraprobótico, diferentemente do lactobacilo vivo, reduziu significativamente as quantidades de IL-6 e TNF- $\alpha$ , 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 $\beta$ , IL-6, IL-17 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , 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 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-17 cytokines, whereas paraprobiotic, unlike living lactobacillus, significantly reduced the amounts of IL-6 and TNF- $\alpha$ , 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)- $\alpha$ , interleucina (IL)-6, IL-8 e IL-1 $\beta$ , 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 reuterociclina, 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- $\alpha$  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.

## 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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17), sendo que o paraprobiótico, diferentemente do lactobacilo vivo, reduziu significativamente as quantidades de IL-6 e TNF- $\alpha$  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](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.