



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**ALANA SANT'ANA DO PRADO**

**EFEITO DE UM COMPLEXO PROBIÓTICO NO  
DESENVOLVIMENTO DE LESÃO PERIAPICAL INDUZIDA  
EM RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO**

**Araçatuba**

**2022**

**ALANA SANT'ANA DO PRADO**

**EFEITO DE UM COMPLEXO PROBIÓTICO NO DESENVOLVIMENTO  
DE LESÃO PERIAPICAL INDUZIDA EM RATOS: ESTUDO  
HISTOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho

**Araçatuba**

**2022**

*Dedico à minha mãe, que se faz tão presente em  
minha memória, e ao meu pai, que sempre me incentivou e  
incentiva a conquistar meus sonhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente aos meus pais, que são os pilares da minha formação como ser humano. Mesmo tudo parecendo impossível, vocês lutaram e tornaram possível um sonho, não só meu, mas de vocês, também, que é formar e exercer uma profissão digna.

Às minhas irmãs, Nayara e Francielle, que se fizeram tão presentes mesmo à distância. Sou grata por todo amor, carinho e cuidado que recebi delas, não só como irmã, mas como uma filha, também.

Agradeço aos familiares, amigos e ao meu namorado que foram essenciais durante essa caminhada. Ajudaram-me de diversas formas, principalmente em momentos de desespero, de tristeza e de desânimo, e, também, financeiramente, que não é o principal, mas essencial para formação em um curso de Odontologia.

Ao meu orientador, Prof. João Eduardo, que sempre foi muito atencioso comigo. Nunca me deixou desanimar e me ajudou nos momentos em que mais precisei. Foi professor, amigo e pai ao mesmo tempo. Sou muito grata pelos seus conselhos, pelas longas conversas e por todo incentivo.

Agradeço aos professores que me ensinaram a amar uma profissão tão bonita, que me ensinaram com tanta dedicação aquilo que sabem. Estes professores fizeram toda a diferença e me mostraram que valeu a pena todo o caminho que percorrido até aqui.

E ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES por terem possibilitado a realização desta pesquisa para contribuir com a ciência. (Código de Financiamento 001)

*“Ser forte não significa exercitar os músculos.  
Significa encontrar seu próprio brilho sem fugir, vivendo  
ativamente com a natureza selvagem de uma maneira própria.  
Significa ser capaz de aprender, ser capaz de defender o que  
sabemos. Significa se manter e viver.”*

*Clarissa Pinkola Estés*

PRADO, A. S. **Efeito de um complexo probiótico no desenvolvimento de lesão periapical induzida em ratos: estudo histológico.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

## RESUMO

Probióticos são bactérias benéficas que melhoram a saúde geral do organismo e podem ser úteis no controle de doenças periodontais e cáries. Entretanto, não há estudos que relacionem o uso dos probióticos na endodontia. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi analisar e comparar o desenvolvimento de lesão periapical em ratos com dieta normal ou dieta suplementada com probióticos. Para tanto, 16 ratos albinos Wistar, todos recebendo a indução da lesão periapical, foram alocados em dois grupos da seguinte forma: Grupo Controle (GC) (n=8) dieta normal; Grupo Complexo Probiótico (GCP) (n=8) dieta sistêmica com um complexo de probiótico (Probiotic Complex Daily Need, GNC™). Durante todo o período experimental o peso dos animais e a ração consumida foram tabulados. Após 30 dias da indução da lesão e administração das dietas, os animais foram eutanasiados e as mandíbulas foram removidas, fixadas em formoldeido, descalcificadas em EDTA. Em seguida foram incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina para análise do processo inflamatório e imunomarcadas com proteínas que regulam as atividades celulares na remodelação do tecido ósseo: TRAP, OPG e RANKL. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, observando uma redução no processo inflamatório e na reabsorção óssea na periodontite apical. Portanto, a suplementação de complexos probióticos teve influência na redução do desenvolvimento da periodontite apical.

**Palavras-chave:** Lesão periapical; Lactobacillus; Bifidobacterium; Metabolismo ósseo.

PRADO, A. S. **Effect of a probiotic complex on the development of periapical injury induced in rats: histological study**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

## **ABSTRACT**

Probiotics are beneficial bacteria that improve the overall health of the body and can be useful in controlling periodontal diseases and cavities. However, there are no studies that relate the use of probiotics in endodontics. Thus, the aim of this study was to analyze and compare the development of periapical lesions in rats with a normal diet or a diet supplemented with probiotics. For this purpose, 16 albino Wistar rats, all receiving induction of periapical lesion, were allocated into two groups as follows: Control Group (CG) (n = 8) normal diet; Probiotic Complex Group (GCP) (n = 8) systemic diet with a probiotic complex (Probiotic Complex Daily Need, GNC™). Throughout the experimental period the weight of the animals and the feed consumed were tabulated. After 30 days of injury induction and administration of the diets, the animals were euthanized and the mandibles were removed, fixed in formaldehyde, decalcified in EDTA. Then they were embedded in paraffin to obtain histological sections. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin for analysis of the inflammatory process and immunostained with proteins that regulate cellular activities in bone tissue remodeling: TRAP, OPG and RANKL. The data obtained were submitted to statistical analysis, observing a reduction in the inflammatory process and bone resorption in apical periodontitis. Therefore, supplementation of probiotic complexes had an influence on reducing the development of apical periodontitis.

**Keywords:** Periapical injury; Lactobacillus; Bifidobacterium; Bone metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fotomicrografias mostrando aspectos histológicos das regiões periapicais (A-B, a-b). **19**
- Figura 2: Fotomicrografias mostrando o aspecto histológico da marcação imunológica nas regiões periapicais (A-F). **20**

## LISTA DE ABREVIATURAS

GC	Grupo Controle
GCP	Grupo Complexo Probiótico
IR	Imunorreativas
OPG	Osteoprotegerina
PA	Periodontite Apical
RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor-Kappa B Ligand
TRAP	Fosfatase Ácida Tartarato Resistente

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1	Objetivo Geral .....	13
2.2	Objetivos Específicos .....	13
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1	Animais.....	14
3.2	Lesão Periapical .....	14
3.3	Terapia com Probiótico.....	15
3.4	Formas de Análises dos Resultados.....	15
3.4.1	Análise Histomorfométrica e Imuno-histoquímica .....	15
3.4.2	Análise Estatística.....	18
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
4.1	Análise Histológica.....	19
4.2	Análise Imuno-histoquímica.....	20
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>24</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>
	<b>ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	<b>34</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro podendo interferir no processo saúde-doença (BOSCH *et al.*, 2012; GUARNER *et al.*, 2005). Os principais microrganismos utilizados como probióticos são bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Bifidobacterium* (BRON *et al.*, 2011; TEUGELS *et al.*, 2013; VIVEKANANDA *et al.*, 2010). Os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são microrganismos encontrados em alguns alimentos e são considerados probióticos devido à sua capacidade para modular a composição e atividade metabólica da flora intestinal e melhorar o sistema imunológico em humanos (SPANHAAK *et al.*, 1998; NAGAO *et al.*, 2000). Após seu consumo, este microrganismo é capaz de sobreviver durante a passagem através do trato gastrointestinal devido às suas propriedades acidogênicas (YUKI *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação dos probióticos é baseado na modificação do ambiente bacteriano patogênico através da competição entre patógeno X probiótico, modulando positivamente a resposta imune do hospedeiro (TEUGHELS; LOOZEN; QUIRYNEN, 2011). Os principais efeitos dessa competição são atribuídos à capacidade de aumentar a atividade dos macrófagos, defesa imune, elevar o número de “killer cells” e interferons (LODI *et al.*, 2015). Foi demonstrado que em modelos animais com sensibilização alérgica os probióticos administrados oralmente diminuíram a produção alergênico-específico de IgE, em parte pela modulação da produção de citocinas sistêmicas. Seguramente, os probióticos estão relacionados com a diminuição da resposta inflamatória pela indução de mecanismos regulatórios (BORCHERS *et al.*, 2009).

Em estudo conduzido por Amdekar e Singh (2016) foi demonstrado que o uso de probióticos do tipo *Lactobacillus acidophilus* em ratos com artrite demonstrou que o probiótico foi capaz de diminuir a expressão de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-1 $\beta$  e aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4. Além disso, o *Lactobacillus acidophilus* também reduziu o estresse oxidativo, que é um fator importante para causar inflamação. Satish Kumar *et al.*, (2017) avaliou o potencial terapêutico e as propriedades imunomoduladoras do probiótico *Bifidobacterium bifidum* em colite ulcerativa em ratos. Os autores

demonstraram os efeitos anti-inflamatórios do probiótico através da diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$  concomitantemente com o aumento da IL-10. Ricoldi *et al.*, (2017) demonstraram que a terapia probiótica com a cepa *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* potencializa os efeitos da raspagem e do alisamento radicular no tratamento da periodontite em ratos. O probiótico foi capaz de influenciar na regulação das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, reduzir a inflamação e a reabsorção óssea local e favorecer a reparação tecidual.

Uma série de benefícios decorrentes da utilização de probióticos tem sido demonstrada incluindo o aumento a resistência a doenças infecciosas, alívio da intolerância à lactose, prevenção de doenças intestinais como diarreias, prevenção de infecções vaginais e urogenitais, redução de quadros alérgicos e infecções respiratórias, diminuição da concentração de colesterol sérico e aumento da resistência à quimioterapia (ARUNACHALAM *et al.*, 2000; HATAKKA *et al.*, 2001; PERDIGON *et al.*, 1995; STAMATOVA e MEURMAN, 2005; VANDERHOOF *et al.*, 1999; VON BÜLTZINGSLÖWN *et al.*, 2003; VUOTTO *et al.*, 2013). Além disso, os efeitos positivos do uso de probióticos também estão relacionados com infecções da cavidade oral (MEURMAN, 2005).

Os probióticos podem ser benéficos para prevenir ou tratar doenças orais como cárie, gengivite ou periodontite, que estão associadas a uma alteração na composição e atividade do biofilme bacteriano (GRUNER; PARIS; SCHWENDICKE, 2016). Existem vários mecanismos pelos quais os probióticos podem influenciar a saúde oral, por exemplo, modulação imunológica, impacto sobre a microbiana oral, produção de substâncias antimicrobianas pelo probiótico e exclusão competitiva de bactérias patogênicas dificultando a adesão de patógenos orais (TEUGHEL; LOOZEN; QUIRYNEN, 2011). Os efeitos dos probióticos nos patógenos causadores da cárie ou doenças periodontais têm sido estudados *in vitro* com bons resultados (CHUANG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011; SCHWENDICKE *et al.*, 2014).

Em endodontia, está bem estabelecido que as bactérias fazem parte da etiologia das lesões pulpares e perirradiculares, e o objetivo da terapia da endodontia é alcançar uma redução significativa na carga bacteriana intracanal (SIGNORETTI *et al.*, 2013; SUBRAMANIAN e MICKEL, 2009). A patogênese das lesões periapicais envolve uma série complexa de resposta imune inflamatória à

infecção bacteriana do sistema de canais radiculares podendo levar a destruição de tecidos periapicais (GRAVES *et al.*, 2011; SUBRAMANIAN e MICKEL, 2009). Quando a lesão periapical está instalada, citocinas inflamatórias ou interleucinas possuem um papel importante na resposta imune, iniciando e coordenando eventos celulares e regulando a resposta do hospedeiro às endotoxinas. Além disso, a reabsorção óssea que ocorre nestas patologias aparece como um fator determinante à expansão destas lesões, sendo iniciada pela proliferação de células precursoras de osteoclastos imaturos e diferenciação das mesmas em células osteoclásticas maduras que promovem a degradação dos componentes ósseos orgânicos e inorgânicos (KAJIYA *et al.*, 2010).

Há estudos que demonstraram que, isoladamente, os probióticos *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus* tiveram um efeito significativo na redução da inflamação e reabsorção óssea no desenvolvimento da periodontite apical em ratos (COSME-SILVA *et al.*, 2019; COSME-SILVA *et al.*, 2020). Entretanto, a resposta imune pode aumentar quando um ou mais probióticos são consumidos concomitantemente e agem sinergicamente, como parece ser o caso de *Lactobacillus* administrado em combinação com *Bifidobacterium* (CALDER e KEW, 2002; KOPP-HOOLIHAN, 2001). A hipótese deste estudo é que a administração sistêmica do probiótico possa alterar a formação da lesão periapical induzida em ratos.

Até o momento, nenhum estudo trata o uso dos probióticos da forma comercial mais comum no mundo, a administração do mesmo por meio de misturas de cepas probióticas, embora, atualmente, alguns estudos estejam sugerindo o uso isolado em endodontia (COSME-SILVA *et al.*, 2019; COSME-SILVA *et al.*, 2020). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os resultados histopatológicos e imuno-histoquímicos após a administração do Complexo Probiótico de GNC (CODE424639) em ratos com periodontite apical induzida. A hipótese nula testada foi de que não haverá diferença entre o grupo controle (GC) - sem probióticos e o grupo complexo probiótico (GCP).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Analisar e comparar o desenvolvimento de lesão periapical em ratos com dieta suplementada ou não com probióticos através de análises locais.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Analisar e comparar histologicamente a lesão periapical;
- Analisar e comparar os tecidos da região periapical de dentes de ratos utilizando a expressão das proteínas correlacionadas a osteoclastogênese (TRAP, OPG e RANKL) como indicadores celulares de predisposição à reabsorção.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

O presente estudo foi submetido ao comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista UNESP (00516-2017). Dezesesseis ratos (*Rattus norvegicus*, da variedade Wistar, albinus), com peso entre 250 a 300g foram utilizados, os quais foram divididos em dois grupos experimentais com oito animais em cada grupo. As estimativas do tamanho da amostra foram baseadas em dados de um estudo anterior (AZUMA *et al.*, 2017). Uma diferença de 1 no SCORES era esperada como significativa. Considerando erro alfa de 0,05 e poder de 95% para reconhecer uma diferença significativa, um número mínimo de 7 animais por grupo foi considerado necessário. Levando em conta possíveis mortes de animais, mais um animal foi adicionado em cada grupo, resultando em 8 ratos / grupo.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (4 animais por gaiola), ambiente com temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70% de umidade) e ciclo de luz controlado (12/12 h, claro-escuro), com acesso livre a água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais foram divididos aleatoriamente de acordo com os grupos experimentais:

**Grupo Controle- GC (n=8) Indução da lesão periapical e dieta normal;**

**Grupo Complexo Probiótico- GCP (n=8) Indução da lesão periapical e dieta suplementada com probiótico (GNC Probiotic Complex)** (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivaris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis subs. lactis* and *Streptococcus thermophilus*) (CODE424639) General Nutrition Centers, Inc., Nova York, United States. Via gavagem.

#### 3.2 Lesão Periapical

A indução da lesão periapical foi realizada sob efeito de anestesia geral por injeção intramuscular com Ketamina- 80mg/kg (Avenco Inc., Fort Dodge, IA) e

Xilazina- 4mg/kg (Mobay Corp. Shawnee, KS), e foi realizada a abertura coronária dos primeiros molares superiores e inferiores de ambos os lados (4 dentes) (Cintra et al., 2016) com auxílio de uma broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck - Maillefer, Dentsply) com 0,1mm de diâmetro, desta forma, todas as exposições pulpares serão padronizadas com 0,1mm de diâmetro. O tecido pulpar coronal foi exposto e desorganizado através da cavidade de acesso na coroa e mantido aberto na cavidade oral até a eutanásia (CINTRA et al., 2016; DAL-FABBRO et al., 2019).

### **3.3 Terapia com Probiótico**

Os probióticos utilizados neste estudo foram administrados por gavagem, de forma complementar a dieta convencional, logo após a indução da lesão periapical por um período de 30 dias, diariamente no período da manhã. No GC não houve suplementação da dieta com o probiótico, porém o processo de gavagem foi realizado com 5 ml de água (RICOLDI et al., 2017) apenas, para que a influência do estresse ocasionado por esta etapa pudesse ser descartado como um possível fator de interferência nos resultados a serem obtidos. No GCP, GNC Probiotic Complex (PCG) (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivaris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis subs. lactis* and *Streptococcus thermophilus*) (CODE424639) General Nutrition Centers, Inc., Nova York, United States, foi administrado por gavagem diluindo uma cápsula na concentração de  $10^9$  CFU/ml em 3 ml de água, sendo que uma cápsula corresponde a um bilhão de unidades formadoras de colônias (UFC).

### **3.4 Formas de Análises dos Resultados**

#### **3.4.1 Análise Histomorfométrica e Imuno-histoquímica**

Foi realizada a eutanásia dos animais, após 30 dias, por overdose de solução anestésica. Os primeiros molares inferiores do lado esquerdo foram utilizados para análise histomorfométrica e imuno-histoquímica. Logo depois de retiradas as mandíbulas e maxilas foram fixadas em formalina neutra (10%), durante

24 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 24 horas e descalcificadas em solução de EDTA (10%), lavadas em água corrente (24 horas), desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina pelo método de rotina. Nos blocos obtidos, foram efetuados cortes semi-seriados realizados em micrótomo (Leica - RM 2045), com 06 micrômetros de espessura. Para cada espécime, 04 lâminas com 3 cortes teciduais, foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (02 lâminas) e as outras lâminas foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica, para os marcadores biológicos TRAP e OPG.

A análise histológica das mandíbulas serviu para caracterização do perfil inflamatório das lesões periapicais (GOMES-FILHO *et al.*, 2015). Foi realizada análise descritiva e qualitativa. As lâminas contendo os cortes representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise descritiva consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais (GOMES-FILHO *et al.*, 2015).

A análise qualitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando as magnitudes dos fenômenos histopatológicos de forma dissociada e da análise histométrica das estruturas do periodonto apical (GOMES-FILHO *et al.*, 2015). A raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo foi escolhida para esta análise. As variáveis estudadas foram: infiltrado inflamatório quanto à sua intensidade e extensão e perda de estrutura óssea periapical. Foram atribuídos escores para os critérios intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e para a perda de estrutura óssea foi realizada a mensuração por área empregando programa de imagens específico (Leica QWin Plus - Leica Microsystems, Nussloch – Germany).

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em torno da área periapical da raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário. Foram consideradas pontuações: 0 (ausente ou poucas células inflamatórias), pontuação 1 (até 25 células e reação leve), pontuação 2 (25- 125

células inflamatórias e reação moderada) e pontuação 3 (mais de 125 células e reação grave) (GOMES-FILHO *et al.*, 2015).

Para a técnica da imuno-histoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imuno-histoquímica foram efetuadas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em peróxido de hidrogênio 3% por 1 hora e em 1% de soro albumina bovino por 12 horas, para o bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com seus respectivos anticorpos primários diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida (anticorpos primários (1:100) contra a OPG (Rabbit anti-opg – SC11383) e TRAP (Goat anti-TRAP - SC 30832)). Nas etapas subsequentes foi empregado o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). As secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário universal biotilado (Universal LSAB “+ Kit/HRP, Rb/Mo/Goat), durante 2 horas, e posteriormente tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Na revelação foi empregado como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA) e em seguida a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

A análise imuno-histoquímica foi realizada sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador cego e calibrado. OPG foi analisada nas adjacências da lesão periapical com um aumento de 400x. A imunomarcagem foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma das células e/ou na matriz extracelular. A análise qualitativa foi efetuada utilizando-se cinco secções histológicas de cada animal e ao padrão de imunomarcagem foi atribuído um escore. O critério para o estabelecimento dos escores foi adotado de acordo com Gomes-Filho *et al.* (2015) - 0 (ausência completa

de células imunorreativas (IR)); 1 (baixo IR), poucas células imunorreativas e marcação fraca da matriz extracelular (aproximadamente um quarto das células IR); 2 (IR moderado), número moderado de células imunorreativas e marcação moderada da matriz extracelular (aproximadamente a metade das células imunorreativas); e 3 (IR elevado), grande número de células IR e forte marcação da matriz extracelular (aproximadamente três quartos das células IR).

Somente osteoclastos maduros ou células multinucleadas TRAP-positivas foram quantificados. A reação de imuno-histoquímica foi realizada logo após a seleção da secção histológica para a medição da área da lesão. Esta quantificação foi inicialmente para determinar o perímetro da lesão ao nível ósseo, ou foi delimitada a superfície externa do osso alveolar na área da lesão. As células multinucleadas foram quantificadas no perímetro, e foram expressas em células TRAP-positivas multinucleadas por mm.

#### **3.4.2 Análise Estatística**

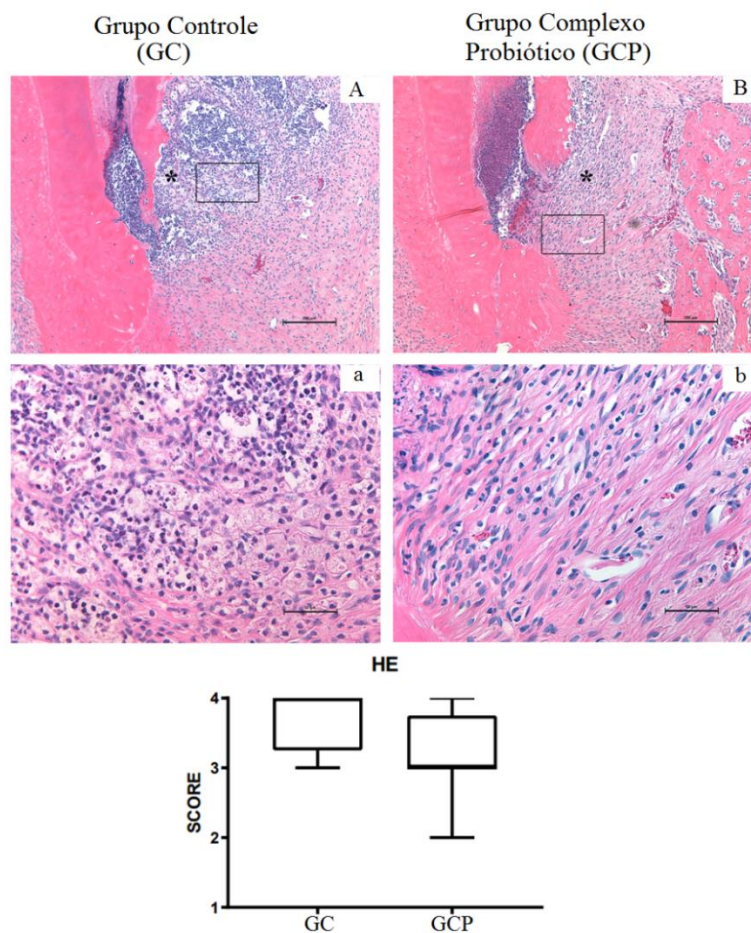
Foram utilizadas as médias  $\pm$  EPM para apresentação dos resultados. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo de Dunn. O nível de significância utilizado foi de  $P < 0,05$  para todas as comparações.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise Histológica

Imagens histológicas de PA em diferentes grupos experimentais são mostradas na Figura 1. Foi observada necrose no grupo Controle e Complexo Probiótico aos 30 dias após a exposição. Na PA, o grupo C apresentou infiltrado inflamatório mais intenso em comparação ao grupo CP (Figura 1). As pontuações medianas atribuídas ao grupo C foram mais severas do que as do grupo CP ( $P < 0,05$ ).

**Figura 1-** Fotomicrografias mostrando aspectos histológicos das regiões periapicais (A-B, a-b).

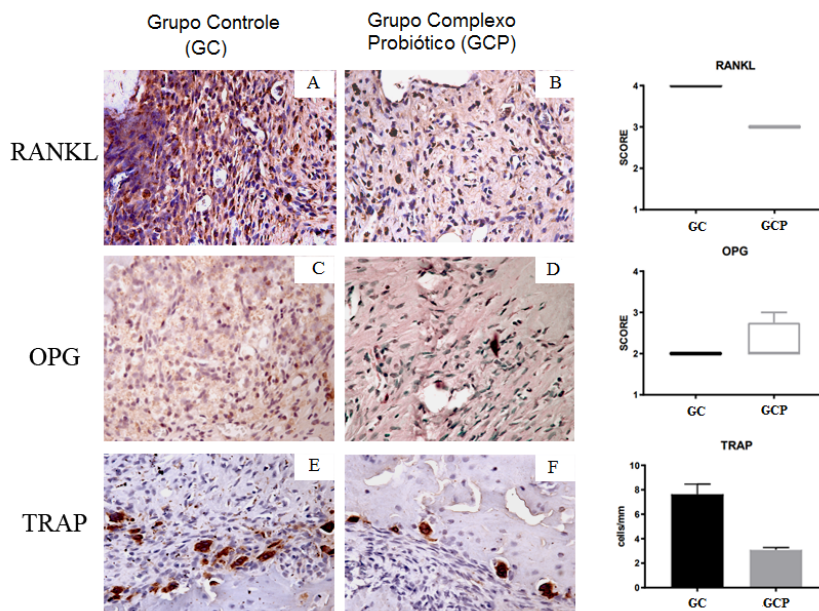


**Legenda:** Periodontite apical de maior gravidade foi observada no grupo Controle (A, a) do que no grupo que consumiu Complexo Probiótico (B, b). \* Infiltrado inflamatório. Coloração com hematoxilina-eosina. O retângulo mostra a área eleita para ampliação de 400X. Ampliação original: A, B 100X; a, b 400X. Gráficos mostrando pontuações para infiltrado inflamatório. Fonte: PRADO, 2022.

## 4.2 Análise Imuno-histoquímica

As imagens imuno-histoquímicas da PA nos grupos C e CP são mostradas na Figura 2. O nível de RANKL diminuiu no grupo CP em comparação com os do grupo C ( $P < 0,05$ ). O nível de OPG foi semelhante em ambos os grupos ( $P > 0,05$ ). O grupo CP apresentou menor contagem de células multinucleadas TRAP-positivas na região periapical quando comparado ao grupo C ( $P < 0,05$ ).

**Figura 2- Fotomicrografias mostrando o aspecto histológico da marcação imunológica nas regiões periapicais (A-F).**



**Legenda:** Imunomarcção padrão mais intensa para RANKL no grupo Controle (A) quando comparada com o grupo Complexo Probiótico (B); Padrão de marcação imunológica semelhante para OPG nos grupos Controle (C) e Complexo Probiótico (D); Contagem de células multinucleadas TRAP-positivas por mm na região periapical, o grupo CP (F) obteve menor contagem quando comparado ao grupo C (E). Ampliação original: 400X. Gráficos mostrando pontuações para RANKL, OPG e TRAP. Fonte: PRADO, 2022.

## 5 DISCUSSÃO

Para o conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo que mostra o efeito sistêmico dos complexos probióticos na periodontite apical. A hipótese nula deste estudo foi rejeitada porque a inflamação patogênica / reabsorção óssea induzida no PA pela exposição pulpar foi significativamente suprimida quando a suplementação sistêmica com complexo probiótico General Nutrition Centers (GNC) foi administrada. Em estudos anteriores, foram administrados probióticos separadamente, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*, demonstrando efeitos no desenvolvimento da periodontite apical (COSME-SILVA *et al.*, 2019; COSME-SILVA *et al.*, 2020). O mesmo foi observado no presente estudo, porém, quando comparado a estudos anteriores que utilizavam a mesma metodologia, houve uma tendência menos intensa a inflamação e, também, um número menor de células osteoclásticas. Portanto, o uso da fórmula multi-strain de probióticos, também, pode ser uma alternativa na tentativa de diminuir a intensidade do processo inflamatório e a reabsorção óssea na periodontite apical.

O complexo probiótico utilizado neste estudo foi composto pelas seguintes linhagens: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivaris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis subs. lactis* and *Streptococcus thermophilus*. Os ratos utilizados, como modelos experimentais neste estudo, apresentam a microbiota bacteriana oral e a resposta apical à exposição pulpar semelhante às observadas em humanos (TANI-ISHII *et al.*, 1994). A indução de periodontite apical em ratos permite que os pesquisadores destaquem fatores extrínsecos que seriam difíceis de gerenciar se a investigação fosse realizada diretamente com seres humanos (AZUMA *et al.*, 2017; CINTRA *et al.*, 2016; DAL-FABBRO *et al.*, 2019; TANI-ISHII *et al.*, 1994). Portanto, em um estágio inicial, essa abordagem é oportuna. Para induzir a PA por um período de 30 dias (CINTRA *et al.* 2016; DAL-FABBRO *et al.* 2019; GOMES-FILHO *et al.* 2015), a polpa dos molares de rato foi exposta ao ambiente oral, permitindo a infecção do tecido pulpar e culminando em necrose pulpar e subsequente desenvolvimento da PA crônica. Além disso, o modelo crônico de PA pode garantir a ausência de sinais sistêmicos de infecção aguda, como abscessos, que podem influenciar a expressão de mediadores pró-inflamatórios nos tecidos periapicais (AZUMA *et al.*, 2018).

O uso de probióticos na Odontologia, especialmente em periodontia, demonstrou um efeito benéfico na doença periodontal devido à redução do índice de placa bacteriana e menor destruição dos tecidos periodontais (RICOLDI *et al.*, 2017; TOIVIAINEN *et al.*, 2015). Além disso, melhores parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, inflamação e sangramento gengival foram observados na periodontite (TOIVIAINEN *et al.*, 2015). A administração de probióticos por gavagem foi o método de escolha neste estudo, pois o objetivo desta investigação era avaliar o efeito sistêmico dos probióticos durante o desenvolvimento da PA. O modo de administração da terapia probiótica é um fator que pode influenciar os resultados do tratamento. No entanto, Gatej *et al.* (2018) demonstraram que, independentemente do modo de administração (inoculação oral ou gavagem oral), o efeito benéfico dos probióticos na doença periodontal permaneceu o mesmo. Embora não haja diferença, o modo de administração via gavagem é um método seguro e fiel ao que se espera. Além disso, a dose/frequência também possui poder de influência. Ricoldi *et al.* (2017) usaram uma dose de  $10^9$  UFC e tiveram sucesso no tratamento coadjuvante da periodontite. Assim, essa dosagem foi escolhida para o presente estudo.

Um número reduzido de células multinucleadas TRAP-positivas foi encontrado no GCP quando comparado ao GC. Isto pode ser explicado em parte pela imunomarcagem reduzida de RANKL presente na GCP. Uma vez que a RANKL é o regulador positivo para osteoclastogênese e OPG atua como um fator inibidor, ligando-se RANK e RANKL impedindo de se ligar a ele (BOYCE e XING, 2008). Dessa forma, evita a sequência de eventos fundamentais à formação de osteoclastos. No presente estudo, uma vez que os valores de OPG permaneceram praticamente os mesmos em ambos os grupos, a diminuição apresentada de RANKL no GCP foi vital para as células multinucleadas com TRAP-positivo baixo. Os *Lactobacillus salivaris* mostraram forte inibição de bactérias periopatógenas. Além da produção de bacteriocina, contribuiu ativamente para o processo de defesa do hospedeiro: diminuindo a resposta inflamatória por inibir a via NF- $\kappa$ B, um fator-chave relacionado ao sistema RANK / RANKL / OPG (ZUPANCIC *et al.*, 2017).

O *Streptococcus thermophilus* apresentado no complexo probiótico também é um potente indutor da IL-10 em macrófagos (JUNJUA *et al.*, 2016). Além disso, essa cepa pode produzir termofilinas chamadas bacteriocinas, que são proteínas produzidas por certas bactérias que possuem uma característica de inibir o

crescimento de cepas bacterianas semelhantes ou estreitamente relacionadas. Demonstrou-se que essas termofilinas apresentam atividades inibitórias in vitro contra cepas patogênicas Gram-positivas, como *E. faecalis*, uma das espécies bacterianas mais desafiadoras a serem eliminadas, apresentadas no desenvolvimento da periodontite apical (ROSSI *et al.*, 2013).

O *Lactobacillus plantarum* tem função imunorreguladora por meio da ativação das respostas imunes Th1, promoção da secreção de IgA e melhora da atividade celular do natural killer (NK) (MENG *et al.*, 2018). *Lactobacillus rhamnosus* está relacionado ao aumento dos níveis de resposta celular de leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico e da atividade das células natural killers, apresentando ação imunomoduladora pela regulação de citocinas como TNF-alfa, IL-6, IL-12 e IL-10 (COSME-SILVA *et al.*, 2019; SHEIH *et al.*, 2001). *Bifidobacterium animalis subs. lactis* exerce efeitos anti-inflamatórios no epitélio, regulando negativamente a secreção de IL-8. É considerado um probiótico em potencial por possuir propriedades imunomodulatórias e antimicrobianas (RICOLDI *et al.*, 2017).

Os probióticos estimulam as células dendríticas (antígeno - células apresentadoras), resultando na expressão de células T-helper 1 (Th1) ou de resposta de Th2, que vão fagocitar agentes patogênicos intracelulares e extracelulares, respectivamente, modulação do sistema imunológico. Os probióticos aumentaram a imunidade inata e modularam a inflamação induzida por patógenos através de receptores do tipo Toll nas células dendríticas. Patógenos intracelulares são fagocitados por resposta Th1, e patógenos extracelulares são tratados pela resposta Th2 (CHATERJEE; BHATTACHARYA; KANDWAL, 2011). De fato, a justificativa para o uso de probióticos se baseia principalmente em sua capacidade de promover o crescimento e a sobrevivência de bactérias comensais. Estas bactérias são frequentemente associadas com a saúde periodontal e pode auxiliar no controle da inflamação na região periodontal (KECHAGIA *et al.*, 2013).

Embora resultados promissores tenham sido relatados na literatura científica, é importante lembrar que os achados referentes aos probióticos não podem ser generalizados, pois são dependentes da cepa, dosagem, frequência e modelo experimental. Dessa forma, novos estudos são essenciais para explorar o mecanismo de ação e definir um protocolo sólido para uso de probióticos na endodontia.

## **6 CONCLUSÃO**

A suplementação alimentar com complexos probióticos teve um efeito significativo na redução do processo inflamatório e reabsorção óssea na periodontite apical, pois histologicamente foi observada uma menor intensidade do infiltrado inflamatório e uma redução na expressão de proteínas correlacionadas à osteoclastogênese indicando uma menor predisposição à reabsorção óssea.

## REFERÊNCIAS

AGHALOO, T. L.; KANG, B.; SUNG, E. C.; SHOFF, M.; RONCONI, M.; GOTCHER, J. E.; BEZOUGLAIA, O.; DRY, S. M.; TETRADIS, S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *Journal Of Bone And Mineral Research*, v. 26, n. 8, p. 1871-1882, 2011. <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.379>.

AMDEKAR, S.; SINGH, V. Studies on anti-inflammatory and analgesic properties of *Lactobacillus rhamnosus* in experimental animal models. *Journal Of Complementary And Integrative Medicine*, v. 13, n. 2, p. 145-150, 2016. <http://dx.doi.org/10.1515/jcim-2015-0087>.

ARAYA, M. M.; LORENZO, M.; REID, G.; SANDERS, M. E.; STANTON, C. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002.

ARUNACHALAM, K.; GILL, H. S.; CHANDRA, R. K. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *European Journal Of Clinical Nutrition*, v. 54, n. 3, p. 263-267, 2000. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600938>.

AUSTAH, O. N.; RUPAREL, N. B.; HENRY, M. A.; FAJARDO, R. J.; SCHMITZ, J. E.; DIOGENES, A. Capsaicin-sensitive Innervation Modulates the Development of Apical Periodontitis. *Journal Of Endodontics*, v. 42, n. 10, p. 1496-1502, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.06.009>.

AZUMA, M. M.; GOMES-FILHO, J. E.; PRIETO, A. K. C.; SAMUEL, R. O.; LIMA, V. M. F.; SUMIDA, D. H.; ERVOLINO, E.; CINTRA, L. T. A. Diabetes increases interleukin-17 levels in periapical, hepatic, and renal tissues in rats. *Archives Of Oral Biology*, v. 83, p. 230-235, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.08.001>.

AZUMA, M. M.; GOMES-FILHO, J. E.; ERVOLINO, E.; CARDOSO, C. B. M.; PIPA, C. B.; KAWAI, T.; CONTI, L. C.; CINTRA, L. T. A. Omega-3 Fatty Acids Reduce Inflammation in Rat Apical Periodontitis. *Journal Of Endodontics*, v. 44, n. 4, p. 604-608, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.12.008>.

BECCONSALL-RYAN, K.; TONG, D.; LOVE, R. M. Radiolucent inflammatory jaw lesions: a twenty-year analysis. *International Endodontic Journal*, v. 43, n. 10, p. 859-865, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01751.x>.

BORCHERS, A. T.; SELMI, C.; MEYERS, F. J.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Probiotics and immunity. *Journal Of Gastroenterology*, v. 44, n. 1, p. 26-46, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-008-2296-0>.

BOSCH, M.; NART, J.; AUDIVERT, S.; BONACHERA, M. A.; ALEMANY, A. S.; FUENTES, Mari Carmen; CUÑÉ, Jordi. Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Archives Of Oral Biology*, v. 57, n. 5, p. 539-549, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.10.006>.

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, v. 473, n. 2, p. 139-146, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018>.

BRON, P. A.; VAN BAARLEN, P.; KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 66-78, 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2690>.

CALDER, P. C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? *British Journal Of Nutrition*, v. 88, n. 2, p. 165-176, 2002. <http://dx.doi.org/10.1079/bjn2002682>.

CHATTERJEE, A.; BHATTACHARYA, H.; KANDWAL, A. Probiotics in periodontal health and disease. *Journal Of Indian Society Of Periodontology*, v. 15, n. 1, p. 23, 2011. <http://dx.doi.org/10.4103/0972-124x.82260>.

CHUANG, L. C.; HUANG, C. S.; OU-YANG, L. W.; LIN, S. Y. Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. *Clinical Oral Investigations*, v. 15, n. 4, p. 471-476, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-010-0423-9>.

CINTRA, L. T. A.; SAMUEL, R. O.; AZUMA, M. M.; QUEIRÓZ, A. O. S.; ERVOLINO, E.; SUMIDA, D. H.; LIMA, V. M. F.; GOMES-FILHO, J. E. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *Journal Of Endodontics*, v. 42, n. 5, p. 747-751, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.01.022>.

COSME-SILVA, L.; DAL-FABBRO, R.; CINTRA, L. T. A.; SANTOS, V. R.; DUQUE, C.; ERVOLINO, E.; BOMFIM, S. M.; GOMES-FILHO, J. E. Systemic administration of probiotics reduces the severity of apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, v. 52, n. 12, p. 1738-1749, 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13192>.

COSME-SILVA, L.; DAL-FABBRO, R.; CINTRA, L. T. A.; ERVOLINO, E.; PLAZZA, F.; BOMFIM, S. M.; DUARTE, P. C. T.; SANTOS JUNIOR, V. E. D.; GOMES-FILHO, J. E. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *International Endodontic Journal*, v. 53, n. 8, p. 1084-1092, 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13311>.

DAL-FABBRO, R.; MARQUES-DE-ALMEIDA, M.; COSME-SILVA, L.; ERVOLINO, E.; CINTRA, L. T. A.; GOMES-FILHO, J. E. Chronic alcohol consumption increases inflammation and osteoclastogenesis in apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, v. 52, n. 3, p. 329-336, 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13014>.

GATEJ, S. M.; MARINO, V.; BRIGHT, R.; FITZSIMMONS, T. R.; GULLY, N.; ZILM, P.; GIBSON, R. J.; EDWARDS, S.; BARTOLD, P. M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *Journal Of Clinical Periodontology*, v. 45, n. 2, p. 204-212, 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12838>.

GOMES-FILHO, J. E.; WAYAMA, M. T.; DORNELLES, R. C. M.; ERVOLINO, E.; COCLETE, G. A.; DUARTE, P. C. T.; YAMANRI, G. H.; LODI, C. S.; DEZAN-JÚNIOR, E.; CINTRA, L. T. A. Effect of Raloxifene on Periapical Lesions in Ovariectomized Rats. *Journal Of Endodontics*, v. 41, n. 5, p. 671-675, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.11.027>.

GRAVES, D. T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal Of Oral Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 5304, 2011. <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v3i0.5304>.

GRUNER, D.; PARIS, S.; SCHWENDICKE, F. Probiotics for managing caries and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *Journal Of Dentistry*, v. 48, p. 16-25, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.002>.

GUARNER, F.; PERDIGON, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal Of Nutrition*, v. 93, n. 6, p. 783-786, 2005. <http://dx.doi.org/10.1079/bjn20051428>.

HATAKKA, K.; SAVILAHTI, E.; PÖNKÄ, A.; MEURMAN, J. H.; POUSSA, T.; NÄSE, L.; SAXELIN, M.; KORPELA, R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending daycare centres: double blind, randomised. *Bmj*, v. 322, n. 7298, p. 1327-1327, 2001. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.322.7298.1327>.

INVERNICI, M. M.; SALVADOR, S. L.; SILVA, P. H. F.; SOARES, M. S. M.; CASARIN, R.; PALIOTO, D. B.; SOUZA, S. L. S.; TABA, M.; NOVAES, A. B.; FURLANETO, F. A. C. Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *Journal Of Clinical Periodontology*, v. 45, n. 10, p. 1198-1210, 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12995>.

JUNJUA, M.; KECHAOU, N.; CHAIN, F.; AWUSSI, A. A.; ROUSSEL, Y.; PERRIN, C.; ROUX, E.; LANGELLA, P.; BERMÖDEZ-HUMARÁN, L. G.; ROUX, Y. L. A large scale in vitro screening of Streptococcus thermophilus strains revealed strains with a high anti-inflammatory potential. *Lwt*, v. 70, p. 78-87, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.006>.

KAJIYA, M.; GIRO, G.; TAUBMAN, M. A.; HAN, X.; MAYER, M. P. A.; KAWAI, T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *Journal Of Oral Microbiology*, v. 2, n. 1, p. 5532, 2010. <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v2i0.5532>.

KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTOPOULOU, K.; SKARMOUTSOU, N.; FAKIRI, E. M.. Health Benefits of Probiotics: a review. *Isrn Nutrition*, v. 2013, p. 1-7, 2013. <http://dx.doi.org/10.5402/2013/481651>.

KLEIN, A.; FRIEDRICH, U.; VOGELANG, H.; JAHREIS, G. Lactobacillus acidophilus 74-2 and Bifidobacterium animalis subsp lactis DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. *European Journal Of Clinical Nutrition*, v. 62, n. 5, p. 584-593, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602761>.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and Therapeutic Uses of Probiotics. *Journal Of The American Dietetic Association*, v. 101, n. 2, p. 229-241, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-8223\(01\)00060-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-8223(01)00060-8).

KUMAR, C. S. V. S.; REDDY, K. K.; BOOBALAN, G.; REDDY, A. G.; CHOWDHARY, C. S. R.; VINOTH, A.; JAYAKANTH, K.; RAO, G. S. Immunomodulatory effects of Bifidobacterium bifidum 231 on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Research In Veterinary Science*, v. 110, p. 40-46, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.10.010>.

LEE, D. K.; PARK, S. Y.; AN, H. M.; KIM, J. R.; KIM, M. J.; LEE, S. W.; CHA, M. K.; KIM, S. A.; CHUNG, M. J.; LEE, K. O. Antimicrobial activity of Bifidobacterium spp. isolated from healthy adult Koreans against cariogenic microflora. *Archives Of Oral Biology*, v. 56, n. 10, p. 1047-1054, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.002>.

LODI, C. S.; OLIVEIRA, L. V.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C. B.; MARTINHON, C. C. R. Effects of probiotic fermented milk on biofilms, oral microbiota, and enamel. *Brazilian Oral Research*, v. 29, n. 1, p. 01-7, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107bor-2015.vol29.0033>.

MENG, Y.; LI, B.; JIN, D.; ZHAN, M.; LU, J.; HUO, G. Immunomodulatory activity of Lactobacillus plantarum KLDS1.0318 in cyclophosphamide-treated mice. *Food Nutr Res*, v. 62, 2018. <http://dx.doi.org/10.29219/fnr.v62.1296>

MEURMAN, J. H. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *European Journal Of Oral Sciences*, v. 113, n. 3, p. 188-196, 2005. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.2005.00191.x>.

NAGAO, F.; NAKAYAMA, M.; MUTO, T.; OKUMURA, K. Effects of a Fermented Milk Drink Containing Lactobacillus casei Strain Shirota on the Immune System in Healthy

Human Subjects. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, v. 64, n. 12, p. 2706-2708, 2000. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.64.2706>.

PARVANEH, K.; EBRAHIMI, M.; SABRAN, M. R.; KARIMI, G.; HWEI, A. N. M.; ABDUL-MAJEED, S.; AHMAD, Z.; IBRAHIM, Z.; JAMALUDDIN, R. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) Increase Bone Mass Density and Upregulate *Sparc* and *Bmp-2* Genes in Rats with Bone Loss Resulting from Ovariectomy. *Biomed Research International*, v. 2015, p. 1-10, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/897639>.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M; AGÜERO, G.; GOBBATO, N. Immune System Stimulation by Probiotics. *Journal Of Dairy Science*, v. 78, n. 7, p. 1597-1606, 1995. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(95\)76784-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(95)76784-4).

RICOLDI, M. S. T.; FURLANETO, F. A. C.; OLIVEIRA, L. F. F.; TEIXEIRA, G. C.; PISCHIOTINI, J. P.; MOREIRA, A. L. G.; ERVOLINO, E.; OLIVEIRA, M. N. de; BOGSAN, C. S. B.; SALVADOR, S. L. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *Plos One*, v. 12, n. 6, p. 0179946, 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0179946>.

ROSSI, F.; MARZOTTO, M.; CREMONESE, S.; RIZZOTTI, L.; TORRIANI, S. Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production; inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. *Food Microbiology*, v. 35, n. 1, p. 27-33, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.006>.

SCHWENDICKE, F.; DÖRFER, C.; KNEIST, S.; MEYER-LUECKEL, H.; PARIS, S. Cariogenic Effects of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a Dental Biofilm Model. *Caries Research*, v. 48, n. 3, p. 186-192, 2014. <http://dx.doi.org/10.1159/000355907>.

SHEIH, Y. H.; CHIANG, B. L.; WANG, L. H.; LIAO, C. K.; GILL, H. S. Systemic Immunity-Enhancing Effects in Healthy Subjects Following Dietary Consumption of the Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal Of The American College Of Nutrition*, v. 20, n. 2, p. 149-156, 2001. <http://dx.doi.org/10.1080/07315724.2001.10719027>.

SIGNORETTI, F. G. C.; GOMES, B. P. F. A.; MONTAGNER, F.; JACINTO, R. C. Investigation of Cultivable Bacteria Isolated from Longstanding Retreatment-resistant Lesions of Teeth with Apical Periodontitis. *Journal Of Endodontics*, v. 39, n. 10, p. 1240-1244, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.06.018>.

SPANHAAK, S; HAVENAAR, R; SCHAAF SMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European Journal Of Clinical Nutrition*, v. 52, n. 12, p. 899-907, 1998. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600663>.

STAMATOVA, I.; MEURMAN, J. H. Probiotics and periodontal disease. *Periodontology* 2000, v. 51, n. 1, p. 141-151, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00305.x>.

SUBRAMANIAN, K.; MICKEL, A. K. Molecular Analysis of Persistent Periradicular Lesions and Root Ends Reveals a Diverse Microbial Profile. *Journal Of Endodontics*, v. 35, n. 7, p. 950-957, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.04.010>.

TAKEDA, K.; OKUMURA, K. Effects of a Fermented Milk Drink Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota on the Human NK-Cell Activity. *The Journal Of Nutrition*, v. 137, n. 3, p. 791-793, 2007. <http://dx.doi.org/10.1093/jn/137.3.791s>.

TANI-ISHII, N.; WANG, C.-Y.; TANNER, A.; STASHENKO, P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiology And Immunology*, v. 9, n. 3, p. 129-135, 1994. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302x.1994.tb00048.x>.

TEUGHEL, W.; DURUKAN, A.; OZCELIK, O.; PAUWELS, M.; QUIRYNEN, M.; HAYTAC, M. C. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal Of Clinical Periodontology*, v. 40, n. 11, p. 1025-1035, 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12155>.

TEUGHEL, W.; LOOZEN, G.; QUIRYNEN, M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *Journal Of Clinical Periodontology*, v. 38, p. 159-177, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051x.2010.01665.x>.

TOIVIAINEN, A.; JALASVUORI, H.; LAHTI, E.; GURSOY, U.; SALMINEN, S.; FONTANA, M.; FLANNAGAN, S.; ECKERT, G.; KOKARAS, A.; PASTER, B. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clinical Oral Investigations*, v. 19, n. 1, p. 77-83, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-014-1221-6>.

VANDERHOOF, J. A.; WHITNEY, D. B.; ANTONSON, D. L.; HANNER, T. L.; LUPO, J. V.; YOUNG, R. J. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *The Journal Of Pediatrics*, v. 135, n. 5, p. 564-568, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476\(99\)70053-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476(99)70053-3).

VIVEKANANDA, M.R.; VANDANA, K.L.; BHAT, K.G. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *Journal Of Oral Microbiology*, v. 2, n. 1, p. 5344, 2010. <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v2i0.5344>.


VON BULTZINGSLOWEN, I.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E.; DAHLEN, G.; JONTELL, M. Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. *Oral Microbiology And Immunology*, v. 18, n. 5, p. 278-284, 2003. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-302x.2003.00075.x>.

VUOTTO, C; BARBANTI, F; MASTRANTONIO, P; DONELLI, G. *Lactobacillus brevis*CD2 inhibits *Prevotella melaninogenica* biofilm. *Oral Diseases*, v. 20, n. 7, p. 668-674, 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/odi.12186>.

YUKI, N.; WATANABE, K.; MIKE, A.; TAGAMI, Y.; TANAKA, R.; OHWAKI, M.; MOROTOMI, M. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *International Journal Of Food Microbiology*, v. 48, n. 1, p. 51-57, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00029-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00029-x).

ZUPANCIC, K.; KRIKSIC, V.; KOVACEVIC, I.; KOVACEVIC, D. Influence of Oral Probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on Ear and Oral Cavity Health in Humans: systematic review. *Probiotics And Antimicrobial Proteins*, v. 9, n. 2, p. 102-110, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-017-9261-2>.

## ANEXO A – Comitê de Ética

**unesp** **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"** 

CAMPUS ARAÇATUBA  
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
 CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

**CERTIFICADO**

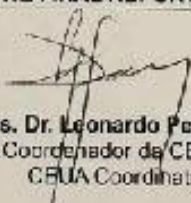
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Efeito de probióticos no desenvolvimento de lesão periapical induzida em ratos**", Processo FOA nº 00516-2017, sob responsabilidade de João Eduardo Gomes Filho apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 05 de Julho de 2017.

**VALIDADE DESTA CERTIFICADO:** 15 de Junho de 2020  
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 15 de Julho de 2020

**CERTIFICATE**

We certify that the study entitled "**Effect of probiotics on the development of induced periapical lesion in rats**", Protocol FOA nº 00516-2017, under the supervision of João Eduardo Gomes Filho presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 05, 2017.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** June 15, 2020.  
**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** July 15, 2020

  
 Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani  
 Coordenador da CEUA  
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
 Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Manduça - CEP: 16015-060 - ARAÇATUBA - SP