



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

CARLOS MATHEUS LESCURA

**EFEITOS DE *Lactobacillus reuteri* VIÁVEL E INATIVADO PELO
CALOR EM PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS: estudo
imaginológico**

2019

CARLOS MATHEUS LESCURA

**EFEITOS DE *Lactobacillus reuteri* VIÁVEL E INATIVADO PELO CALOR EM
PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS: estudo imaginológico**

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: Patologia. Linha de Pesquisa: Inflamação e Reparação Tecidual.

Orientadora: Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. 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).

Lescura, Carlos Matheus

Efeitos do *Lactobacillus reuteri* viável e inativado pelo calor em periodontite induzida em ratos: estudo imaginológico / Carlos Matheus Lescura. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
45 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, 2019.

Orientador: Ana Lia Anbinder.

1. Periodontite. 2. *Lactobacillus reuteri*. 3. Probióticos. 4. Paraprobióticos. 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. Assoc. Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim

Instituto de Ciência e Tecnologia
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Campus de São José dos Campos

Profa. Lucilene Hernandes Ricardo

São José dos Campos, 08 de maio de 2019.

DEDICATÓRIA

À minha filha Daniella, a minha grande força para enfrentar e vencer os desafios.

À minha esposa Juliana que sempre me apoiou e incentivou.

À minha família, o verdadeiro alicerce para meu crescimento.

Às minhas amigas Jaqueline e Renata, pessoas especiais que conheci e reencontrei, que Deus me concedeu o privilégio de conviver, aprender, respeitar e que levo para a vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de vivenciar momentos únicos e importantes para minha evolução profissional e pessoal.

À Unesp- Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Dr. Estevão Tomomitsu e ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira, pela oportunidade e suporte na realização deste trabalho.

À minha orientadora, a Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder, por todo ensinamento compartilhado, um exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino desde minha iniciação científica e durante todo o mestrado.

Aos professores que, mesmo que indiretamente, colaboraram muito com meu experimento. À Profa Assoc. Luana M. R. Vasconcellos pelos ensinamentos na manipulação dos animais e rotina do Biotério.

Aos técnicos do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal por estarem sempre dispostos a me ajudar, principalmente ao Sr. Antônio D. S. B. M. Vasconcellos (Seu Toninho) e André Luiz Ortiz, que ajudaram no trato dos animais, a Ana Lourdes da Silva Machado e Walter Cruz, que auxiliaram na descalcificação das peças e no preparo das lâminas, as quais apesar de não estarem neste trabalho fazem parte do estudo por completo.

Aos meus colegas de equipe, Bruna Fernandes do Carmo Carvalho, Giovanna Lotto, Jaqueline Lemes Ribeiro, Luma Collino, Nayara de Sá Rodrigues, Renata Mendonça Moraes, Victor Bernardes Barroso da Costa, que me ajudaram em toda fase de experimento animal.

À Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira e os demais do Laboratório de Microbiologia pela disponibilidade e ensinamento na preparação das soluções para e probióticas.

Ao Prof. Dr. Fernando Vagner Raldi e demais professores da cirurgia pela oportunidade de fazer o estágio docência, uma experiência profissional importante.

Aos amigos da pós, Elis Andrade de Lima Zutin, Fernanda Herrera, Milagros Del Valle El Abras Ankha, Noala Vicensoto Moreira Milhan, pela oportunidade de ter convivido com pessoas tão especiais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio que proporcionou a execução desta pesquisa (processo nº 2016/06946-1).

Às tantas outras pessoas que auxiliaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Geral	15
2.2 Específica	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Animais	16
3.2 Grupos experimentais	16
3.3 Indução da doença periodontal	17
3.4 Fonte probiótico e paraprobiótico	18
3.5 Peso	19
3.6 Eutanásia	20
3.7 Análise radiográfica	20
3.7.1 Suporte ósseo	21
3.7.2 Perda óssea	22
3.8 Análise por microtomografia computadorizada (Micro-CT)	23
3.9 Análise estatística	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Peso dos animais	25
4.2 Suporte ósseo	26
4.3 Perda óssea	28
4.4 Porcentagem de volume ósseo, espessura trabecular, número de trabéculas, separação trabecular e porosidade óssea total	29
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	45

Lescura CM. Efeitos do *Lactobacillus reuteri* viável e inativado pelo calor em periodontite induzida em ratos: estudo imaginológico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

A doença periodontal (DP) é caracterizada pela destruição dos tecidos de proteção e suporte dentário, osso alveolar, ligamento periodontal, cemento e gengiva, e é a principal causa de perda dentária na população adulta, um grande problema socioeconômico e de saúde pública. Com o aumento da resistência antibiótica, existe interesse no uso de outras substâncias para o combate de doenças infecciosas, como os probióticos. O uso de probióticos na prevenção e tratamento de doença periodontal em animais tem apresentado bons resultados. O estudo dos efeitos do *Lactobacillus reuteri* viável e inativado (paraprobótico) pode esclarecer mecanismos de ação e possibilitar o uso comercial de outras preparações, dado que os paraprobóticos teriam produção facilitada. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de *L. reuteri*, viável e inativado, em doença periodontal induzida em ratos. Foram utilizados 32 ratos machos, divididos em 4 grupos: (1) Grupo Controle: com saúde periodontal (n=8); (2) Grupo LIP: periodontite induzida (n=8); (3) Grupo LIP/PRO: periodontite induzida e probiótico (n=8); e (4) Grupo LIP/PARAPRO: periodontite induzida e paraprobótico (n=8). A indução da doença periodontal foi realizada com a inserção de fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores e foi realizado o tratamento com *L. reuteri* viável ou inativado pelo calor, via oral, diariamente, 30 dias antes da ligadura e 14 dias após, quando ocorreu a eutanásia. As hemimandíbulas direitas foram removidas e submetidas à análise radiográfica para quantificação do suporte ósseo. Foi realizada microtomografia computadorizada para avaliação da microarquitetura alveolar na região do primeiro molar. O uso de paraprobótico levou à maior porcentagem de ganho de peso, quando comparado aos outros tratamentos. Nas análises radiográfica e microtomográfica, comprovou-se a eficácia da indução de DP, havendo diferença significativa de suporte ósseo, perda óssea, porcentagem de volume ósseo, espessura trabecular, número de trabéculas, separação trabecular e porosidade óssea total entre os grupos com DP e grupo controle. Os tratamentos com probiótico e paraprobótico preservaram de maneira semelhante o volume ósseo (BV/TB), a porosidade óssea total (Po.Tot) e a perda óssea alveolar na furca, embora apenas paraprobóticos tenham levado a uma diferença significativa em comparação ao grupo LIP. Ambos os tratamentos diminuíram a perda óssea mesial alveolar e aumentaram o suporte ósseo alveolar. Além disso, o paraprobótico diminuiu a separação trabecular (Tb.Sp) e aumentou o número trabecular (Tb.N). Tanto as bactérias viáveis como inativados pelo calor reduziram a perda óssea alveolar e melhoraram os parâmetros da microarquitetura óssea. Estes resultados contribuem para o desenvolvimento futuro de formulações com *L. reuteri* não viável, que terão maior prazo de validade.

Palavras-chaves: Periodontite. *Lactobacillus reuteri*. Probióticos. Paraprobóticos.

Lescura CM. Effects of viable and heat inactivated *Lactobacillus reuteri* on induced periodontitis in rats: an imaging study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is characterized by the destruction of dental protection and support tissues, alveolar bone, periodontal ligament, cementum and gingiva, and is the major cause of tooth loss in the adult population, a major socioeconomic and public health problem. With the increase of antibiotic resistance, there is interest in the use of other substances to combat infectious diseases, such as probiotics. The use of probiotics in the prevention and treatment of periodontal disease in animals has shown good results. The study of the effects of viable and inactivated *Lactobacillus reuteri* (paraprobiotic) can clarify mechanisms of action and enable the commercial use of other preparations, since paraprobiotics would have facilitated production. The aim of this study was to evaluate the effects of viable and inactivated *L. reuteri* on induced periodontal disease in rats. Thirty-two male rats were divided into four groups: (1) Control group: with periodontal health (n = 8); (2) LIP group: induced periodontitis (n = 8); (3) LIP/PRO group: induced periodontitis and probiotic (n = 8); and (4) LIP/PARAPRO group: periodontitis induced and paraprobiotic (n = 8). Induction of periodontal disease was performed with the insertion of cotton thread around the lower first molars and treatment was performed with viable or heat-inactivated *L. reuteri* daily, 30 days prior to ligation and 14 days later, when euthanasia occurred. The right hemimandible were removed and submitted to radiographic analysis for quantification of the bone support. A computerized microtomography was performed to evaluate the alveolar microarchitecture in the first molar region. The use of paraprobiotic led to a higher percentage of weight gain when compared to other treatments. In the radiographic and microtomographic analyzes, the efficacy of the DP induction was verified, with a significant difference in bone support, bone loss, percentage of bone volume, trabecular thickness, trabecular number, trabecular separation and total bone porosity between the PD and group control. Probiotic and paraprobiotic treatments similarly preserved bone volume (BV/TB), total bone porosity (Po.Tot) and alveolar bone loss in the furcation, although only paraprobiotic led to significant difference in comparison to LIP group. Both treatments decreased the mesial alveolar bone loss and increased alveolar bone support. Moreover, the paraprobiotic decreased trabecular separation (Tb.Sp) and increased trabecular number (Tb.N). Both viable and heat-killed bacteria reduced alveolar bone loss and ameliorate the bone microarchitecture parameters. These results contribute to the future development of formulations with non-viable *L. reuteri* that will have a longer shelf-life.

Keywords: Periodontitis. *Lactobacillus reuteri*. Probiotics. Paraprobiotics.

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte e proteção dentária, osso alveolar, ligamento periodontal, cemento e gengiva, e é a principal causa de perda dentária na população adulta, um grande problema socioeconômico e de saúde pública (Souza et al., 2008). Essa destruição se dá a partir da resposta inflamatória induzida no tecido periodontal devido ao acúmulo de placa bacteriana, causando a liberação de citocinas (como Interleucina-1 e RANKL) que promovem a atividade de osteoclastos, levando à reabsorção óssea (Hienz et al., 2015).

As DPs representam um conjunto de doenças multifatoriais que possuem fatores de risco como uso de álcool/cigarro, diabetes, estresse, osteoporose, fatores genéticos e microbiológicos (Genco, Borgnakke, 2013). É uma condição prevalente em indivíduos adultos, porém podem acometer crianças e adolescentes (Kinane et al., 2017). Em 2010, 10,8% da população mundial (aproximadamente 743 milhões de pessoas) eram afetadas por periodontite severa, sendo a sexta condição mais prevalente na população (Kassebaum et al., 2014). As superfícies proximais dos primeiros molares, tanto na dentição decídua quanto na permanente, são as mais frequentemente afetadas pela DP (Jenkins et al., 2001). No Brasil, a prevalência das formas mais brandas da DP (gengivite e periodontite crônica) é consideravelmente alta, e sua forma severa (periodontite agressiva) acomete menor porcentagem da população (Araújo, Sukekava, 2007).

Um fator etiológico importante das DP são as bactérias Gram-negativas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* e *Fusobacterium nucleatum*, presentes na microbiota bucal (Haffajee et al., 2006; Kang et al., 2011). Com o aumento do índice da resistência antibiótica, surgiu o interesse no uso de outras substâncias para o combate de doenças, como os probióticos (Devine, Marsh, 2009). O termo “probiótico” foi derivado do grego, que significa “para a vida”, e é definido como “microrganismos viáveis que conferem benefícios à saúde quando administrados em doses suficientes” (McFarland, Elmer, 1995). Elie Metchnikoff (Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina - 1908) no início do século XX verificou o

efeito do consumo de leite fermentado contendo bactérias produtoras de ácido láctico como responsável pela longevidade dos camponeses búlgaros (Meuman, Stamatova, 2007; Seminario-Amez et al., 2017). Estudos demonstraram seus efeitos positivos para tratamento de distúrbios gastrointestinais (Wilkins et al., 2017) como diarreia, colites e mucosite intestinal, redução de risco de infecção pós-cirúrgica, prevenção do câncer cólon e restabelecimento do sistema imune (Reid et al., 2003; Whitford et al., 2009; Eslami et al., 2019).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO; World Health Organization - WHO) afirmaram que há evidência científica adequada para indicar que há potencial para probióticos fornecerem benefícios à saúde e que as cepas específicas são seguras para uso humano, porém, mais estudos científicos devem ser realizados para determinar seus mecanismos de ação e entender o porquê de não apresentarem efeitos positivos em determinadas situações (Reid et al., 2003). O uso de probiótico é considerado seguro, e raramente tem sido associado a risco de sepse. O conhecimento do mecanismo de ação e da via de administração são importantes para correta indicação e promoção de saúde (Boyle et al., 2006).

Nas últimas décadas, a comunidade científica vem se interessando pelo uso de probióticos na saúde bucal, e a maioria dos estudos utilizaram cepas sugeridas para a saúde intestinal. Efeitos positivos foram observados para o controle e tratamento de doença periodontal, infecções por *Candida albicans* e lesões cáries (Meurman, 2005). Yanine et al. (2013) e Jayaram et al. (2016) realizaram revisões sistemáticas sobre o efeito do uso de probiótico na doença periodontal, e observaram que a heterogeneidade dos estudos dificulta concluir os benefícios dos probióticos sobre a doença. Porém, outras revisões sistemáticas recentes verificaram que apesar da redução de unidades formadoras de colônia (UFC) não ser significativa, não haver redução do índice de placa e incidência de cárie dentária (Gruner et al., 2016), observa-se melhora clínica no sangramento, profundidade de sondagem e índice gengival com o uso dos probióticos em pacientes com periodontite (Seminario-Amez et al., 2017). Na revisão de Bustamante et al. (2019), verificou-se que o uso de probióticos pode prevenir e tratar de forma eficaz algumas doenças na cavidade bucal, como halitose e periodontite, e pode reduzir o desenvolvimento de cárie dentária e a concentração de bactérias nocivas.

Probióticos a partir de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus helveticus* consumidos via oral diariamente por 13 semanas apresentaram efeitos benéficos na redução de candidose oral e hipossalivação em idosos (Hatakka et al., 2007).

Embora os mecanismos de ação dos probióticos na cavidade oral ainda não estejam totalmente elucidados, parece que eles são análogos aos descritos para o equilíbrio da microbiota intestinal (Haukioja, 2010). As principais bactérias utilizadas são dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Bifidobacterium* (Bron et al., 2012), que são considerados como uma parte da microbiota humana normal (Saxelin et al., 2005).

Lactobacillus reuteri é uma espécie heterofermentativa que reside nos tratos gastrointestinal, urogenital e oral de humanos, e produz a reuterina (Mu et al., 2018), um composto neutro, de baixo peso molecular, solúvel em água, funcional em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas, que apresenta ação antimicrobiana (Talarico et al., 1988; El-Ziney et al., 1999; Cleusix et al., 2007).

L. reuteri inibe o crescimento de *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia*, que são microrganismos importantes no desenvolvimento das doenças periodontais e diminui a produção de CH₃SH produzido por *P. gingivalis* e *F. nucleatum* que promovem halitose, podendo ser utilizado na prevenção de doenças periodontais (Kang et al., 2011). *S. mutans* tem o seu crescimento inibido com a presença de *L. reuteri*, promovendo prevenção de lesões cáries (Kang et al., 2011). O probiótico *L. reuteri* tem se mostrado efetivo no tratamento de mucosite peri-implantar, diminuindo a liberação de mediadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, IL-8, melhora do aspecto clínico com redução do índice placa, fluído crevicular e profundidade de sondagem (Fernández et al., 2015).

No entanto, o uso desta terapia no tratamento de doenças da cavidade oral ainda é uma abordagem emergente. Outros estudos são essenciais para elucidar o papel das bactérias benéficas na cavidade, identificar novas espécies, estabelecer a duração do tratamento e novos veículos de entrega, e também determinar o significado clínico real desta terapia (Teughels et al., 2011; Stamatova, Meurman, 2009).

Martin-Cabezas et al. (2016) concluíram por meio de revisão sistemática e meta-análise que *L. reuteri* administrado duas vezes por dia como adjuvante a

raspagem e aplainamento radicular apresenta maior ganho do nível de inserção clínica, redução do sangramento a sondagem e redução da profundidade da bolsa periodontal quando comparado ao tratamento convencional isolado em periodontite crônica a curto prazo.

Vivekananda et al. (2010) realizaram um estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo para avaliar os efeitos de *L. reuteri* (Prodentis) sozinho e em combinação com raspagem e aplainamento radicular em pacientes com periodontite crônica. Foram realizadas comparações de parâmetros clínicos (índice de placa, gengival, de sangramento gengival, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica) e níveis microbiológicos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. O estudo teve duração de 42 dias e o uso do *L. reuteri* (Prodentis; dois comprimidos da preparação comercial ao dia) ou placebo se iniciou no vigésimo primeiro até o quadragésimo segundo dia do estudo. Os autores observaram maior inibição de placa bacteriana, efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos de *L. reuteri* (Prodentis) quando comparados ao placebo.

O mecanismo de ação dos probióticos está geralmente relacionado com a competição por nutrientes ou sítios de adesão, liberação de moléculas antimicrobianas ou aumento do crescimento de componentes saudáveis da microbiota. Observa-se em diversos estudos que a interação direta com o hospedeiro pode ser mediada por células bacterianas independentemente de sua viabilidade; isso é possível devido à capacidade das células humanas reconhecerem componentes ou produtos bacterianos específicos (Adams, 2010). Existe uma preocupação em relação aos problemas de segurança decorrentes do uso de probióticos, além de interesse no uso de microrganismos não viáveis, pois estes poderiam eliminar problemas de prazo de validade e reduzir os riscos de translocação e infecção microbiana (Tavernit, Guglielmetti, 2011).

O termo paraprobiótico ou probiótico fantasma é definido como células microbianas não viáveis (intactas ou fragmentadas) que, quando administrados (oralmente ou topicamente) em quantidades adequadas, conferem um benefício ao consumidor humano ou animal (Tavernit, Guglielmetti, 2011). Embora o número de pesquisas sobre o uso de microrganismos não viáveis seja menor que o de probióticos, seus resultados demonstram efeito positivo na redução do colesterol,

controle de processos alérgicos, modulação da resposta inflamatória, e redução de dor visceral em estudos *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vitro* de Aiba et al. (2017) foram utilizadas cepas de *L. johnsonii*, inativadas por calor, as quais inibiram o crescimento de *Helicobacter pylori*. Isso promove grande interesse da comunidade científica para o desenvolvimento de produtos mais estáveis, seguros, de fácil manipulação e maior validade quando comparado aos probióticos, que apresentam desenvolvimento e comercialização mais difíceis devido à necessidade de manutenção dos microrganismos viáveis (Adams, 2010).

Sugawara et al. (2016) realizaram um estudo randomizado, duplo-cego para avaliar o efeito dos *Lactobacillus gasseri* CP2305 não viáveis na regulação das funções intestinais em humanos. Um grupo (n = 60) recebeu a bebida paraprobiótica CP2305, e o outro grupo (n = 60) recebeu a bebida placebo, diariamente durante três semanas. Por meio de um questionário direcionado, análise das amostras fecais, e atividade do sistema nervoso autônomo, os autores concluíram que o consumo de CP2305 não viáveis contribui para controle do ambiente intestinal e manutenção da qualidade de vida.

Neste contexto, novos estudos podem ser de grande valor para estruturar os futuros pilares da terapia com probióticos e paraprobióticos para a prevenção, tratamento e o controle da doença periodontal.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de *Lactobacillus reuteri* viável e inativado em doença periodontal induzida em ratos.

2.2. Específica

Avaliar e comparar os efeitos probióticos e paraprobióticos do *L. reuteri* em ratos com DP induzida, por meio da avaliação de:

- a) perda e suporte ósseo alveolar radiográfico;
- b) número de trabéculas, espessura e separação trabecular, porcentagem de volume ósseo e porosidade total na região do primeiro molar inferior, por meio de microtomografia computadorizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos/SP, registrado sob n° 10/2017 (ANEXO A), em conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, adotada pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca n° 11.794 de 10/08/2008.

Foram utilizados 32 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com aproximadamente noventa dias de idade, que foram mantidos no Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos e alimentados com ração e água *ad libitum*.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- a) grupo Controle: com saúde periodontal e administração oral de placebo (n = 8);
- b) grupo LIP: periodontite induzida por ligadura e administração oral de placebo (n = 8);
- c) grupo LIP/PARAPRO: periodontite induzida pela ligadura e administração oral de paraprobiótico (n = 8); e
- d) grupo LIP/PRO: periodontite induzida pela ligadura e administração oral de probiótico (n = 8).

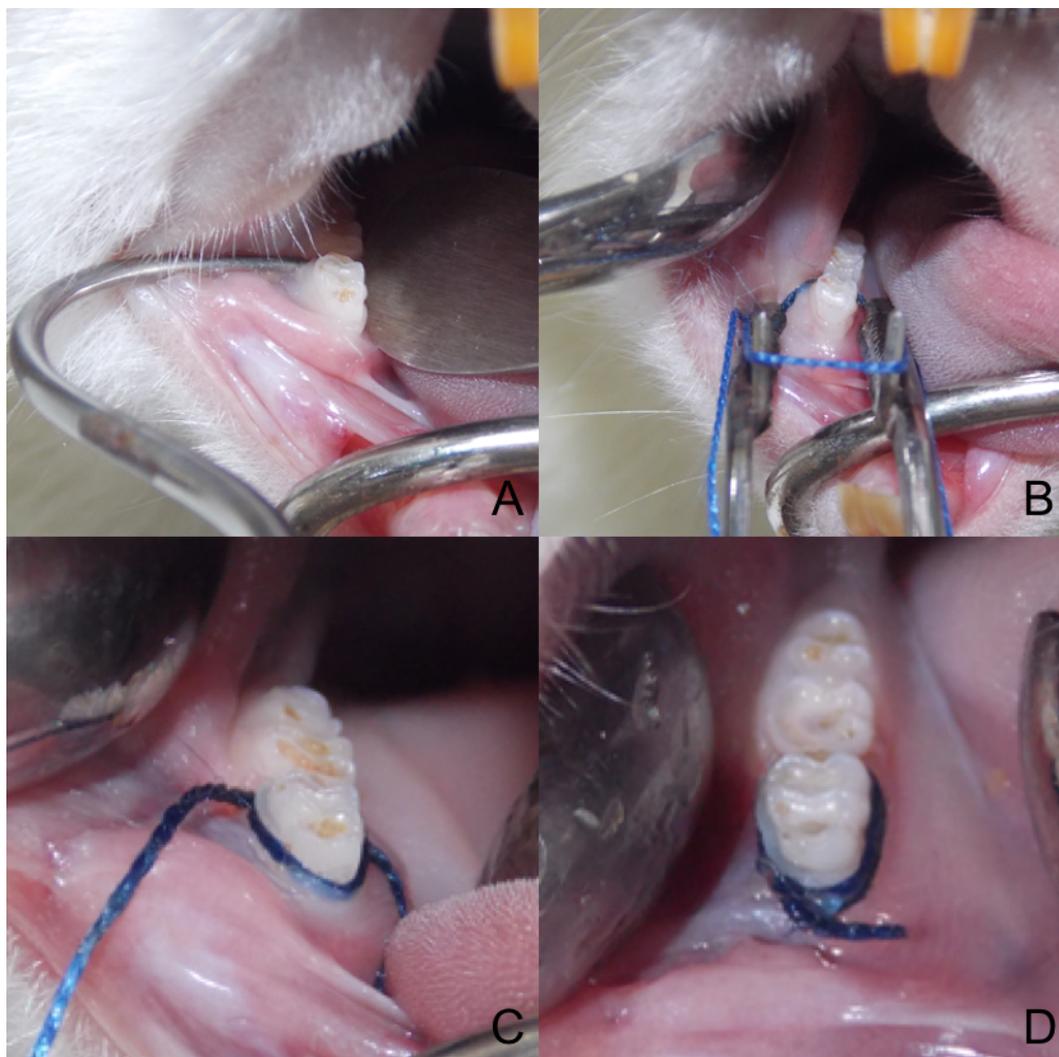
A medicação foi administrada via oral, por meio de uma seringa de insulina, dose de 300 µl = $1,5 \times 10^9$ UFC, por 30 dias antes da instalação da ligadura, e mais

14 dias após a ligadura (total 44 dias de medicação) (Messora et al., 2013). O grupo LIP/PRO recebeu o bacilo viável, enquanto o grupo LIP/PARAPRO recebeu o bacilo inativado pelo calor. Os grupos Controle e LIP receberam água destilada.

3.3 Indução da doença periodontal

Os animais, previamente pesados, foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (Sespo, Paulínia, SP, Brasil) (75-95 mg/Kg) e Xilazina (Sespo, Paulínia, SP, Brasil) (5 mg/Kg) por via intramuscular. Para indução da doença periodontal, foi realizado a inserção de duas voltas de fio de algodão 3-0 (Ethicon, Johnson & Johnson) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos e direitos dos animais. Os ratos anestesiados foram imobilizados em mesa apropriada, na qual permaneceram com a boca aberta. A amarra das pontas do fio permaneceu na superfície mesial do dente (Figura 1). A ligadura foi mantida durante 14 dias. Nos animais do grupo controle não foi induzida doença periodontal, entretanto eles foram anestesiados e manipulados da mesma maneira que os demais.

Figura 1 - Etapas da inserção da ligadura para indução da doença periodontal



Legenda: a) afastamento do ponto de contato com o auxílio de um explorador nº 5; b) inserção do fio de algodão 3-0 utilizando pinça adaptada; c) visualização do fio ao redor do primeiro molar inferior, pronto para a amarria; d) ligadura inserida ao redor do primeiro molar inferior.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Fonte probiótico e paraprobiótico

Neste estudo foi utilizado *L.reuteri* Prodentis® (ATCC PTA 5289 associado à DSM 17938). Para ativação desse micro-organismo, um comprimido da preparação comercial Periobalance Sunstar (Central Road, Schaumburge, Illinois, EUA) foi diluído em água destilada estéril (um comprimido para 10 mL de água, por

aproximadamente 10 minutos em Vórtex). A solução foi semeada pela técnica de esgotamento em Ágar de Man Rogosa-Sharpe (MRS) e também em caldo MRS, em câmara de CO₂ a 37 °C por 3 dias. Colônias isoladas foram confirmadas pela coloração de Gram a partir do ágar, e a cultura em caldo foi centrifugada duas vezes (4700 rpm por 5 minutos). Os sedimentos foram ressuspensos em água destilada e foram realizadas suspensões do micro-organismo, padronizadas em espectrofotômetro com 570nm de comprimento de onda e densidade óptica de $2,3 \pm 0,2$ correspondendo a $2,5 \times 10^9$ UFC/mL.

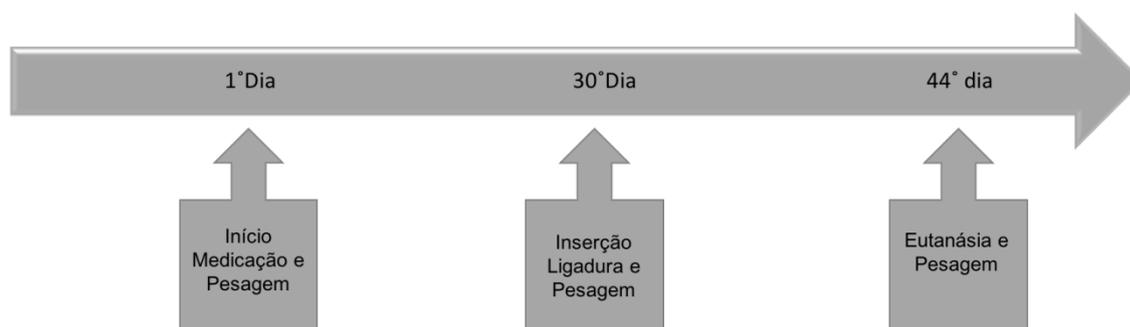
Para a preparação paraprobótica, uma fração da suspensão padronizada de *L. reuteri* viável foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos e reservada para posterior utilização. A preparação paraprobótica foi semeada em ágar MRS para confirmar a ausência de células vivas.

3.5 Peso

Os animais foram pesados em 3 momentos: 1) no primeiro dia da medicação (dia 1); 2) no dia da inserção da ligadura (dia 30) e 3) no dia da eutanásia (dia 44) (Figura 2). Os valores dos pesos foram tabulados e convertidos para porcentagem de ganho de peso. De acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Variação peso (\%)} = (\text{Peso Dia 44} - \text{Peso Dia 1}) \times 100 / \text{Peso Dia 1}$$

Figura 2 – Linha do tempo da experimentação animal



Fonte: Elaborado pelo autor.

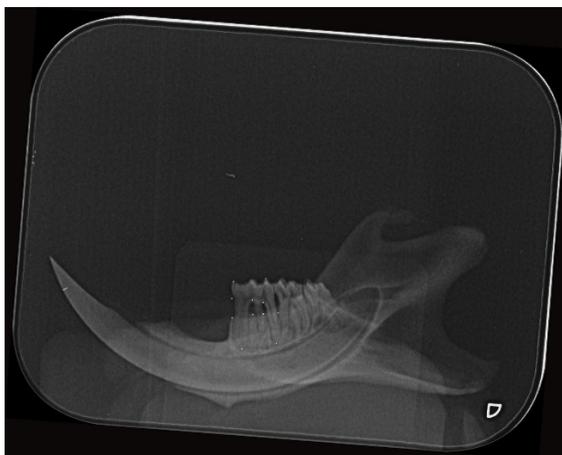
3.6 Eutanásia

Transcorridos 44 dias do tratamento, os animais foram anestesiados por via intramuscular com dose excessiva da mistura de ketamina e xilazina. Após aprofundarem-se na anestesia, os animais foram eutanasiados por decapitação e foram removidas as hemimandíbulas direita e esquerda. As hemimandíbulas foram armazenadas em uma solução de formol a 10% tamponado.

3.7 Análise radiográfica

As peças, após limpas, foram radiografadas utilizando o sistema de raio-X digital de alta frequência FOCUS (Intrumentarium Dental, Palodex Group Oy – Tuusula, Finlândia), com placa de fósforo e o digitalizador de placas de fósforo VistaScan Mini Plus (Durr Dental - Bietigheim-Bissingen, Alemanha) com tempo de exposição 0,200 segundos, distância objeto-foco de 30 cm e incidência do raio-X por lingual. As peças foram posicionadas na placa de fósforo com o auxílio de cera utilidade, de maneira que as cúspides e raízes vestibulares e linguais deveriam estar sobrepostas na imagem radiográfica (Figura 4A). As radiografias foram padronizadas com o plano oclusal dos molares paralelo ao plano horizontal (Figura 3).

Figura 3 – Padronização do posicionamento das imagens radiográficas



Legenda: Padronização das imagens radiográficas com o plano oclusal dos molares paralelo ao plano horizontal.

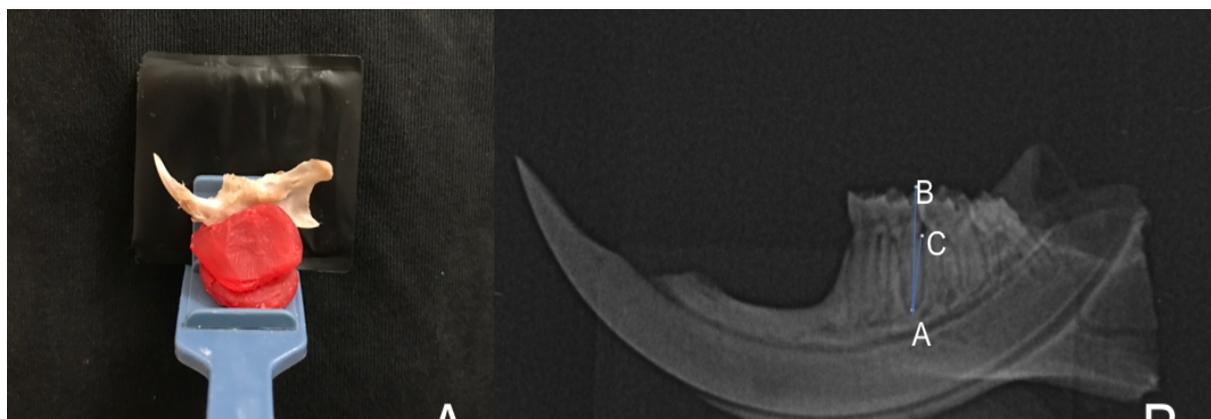
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7.1 Suporte ósseo

A análise da porcentagem de suporte ósseo (Klausen et al., 1989) foi calculada a partir das medidas lineares entre ápice da raiz distal e ponta da cúspide distal (segmento AB), entre o ápice da raiz distal e o fundo do defeito/crista óssea (segmento AC), e o ângulo entre esses dois segmentos (ângulo CÂB) (Figura 4B). O ponto C correspondia ao fundo do defeito/crista óssea em região equidistante entre o primeiro e segundo molar. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa de imagem dental CliniView (Instrumentarium Dental, Palodex Group Oy – Tuusula, Finlândia) de acordo com a fórmula abaixo (Anbinder et al., 2006):

$$\text{Suporte ósseo (\%)} = (\text{AC} \cos(\text{C}\hat{\text{A}}\text{B}) \times 100) / \text{AB}$$

Figura 4 – Radiografia para avaliação do suporte ósseo



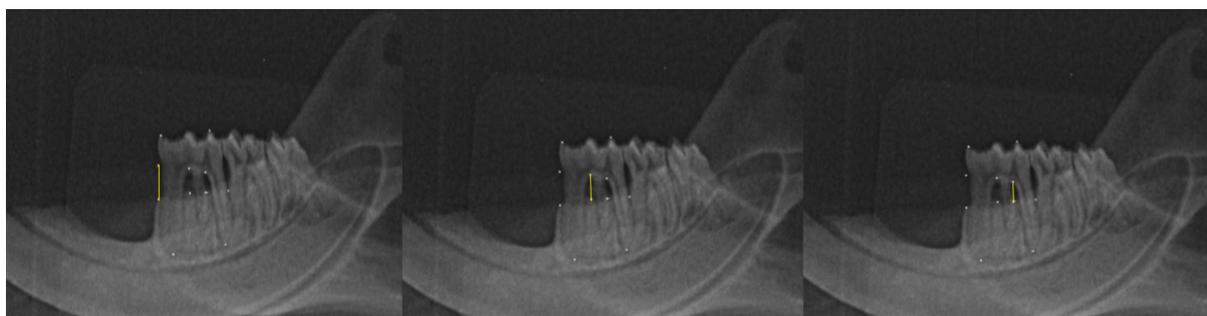
Legenda: a) posicionamento da peça no posicionador radiográfico, de tal maneira que o primeiro molar inferior ficasse o mais paralelo possível com a placa de fósforo; b) radiografia com a marcação dos segmentos AB, AC e o ângulo formado entre esses segmentos (CÂB).

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7.2 Perda óssea

A perda óssea foi calculada a partir das medidas lineares no plano vertical em três regiões do primeiro molar: crista mesial, furca mesial e furca distal. Foi mensurada a distância, na vertical, entre a junção amelocementária e o topo da crista óssea mesial (Figura 5A), entre a maior concavidade da furca mesial e o osso alveolar (Figura 5B), e entre a maior concavidade da furca distal e o osso alveolar (Figura 5C), respectivamente. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa de imagem dental CliniView (Instrumentarium Dental).

Figura 5 – Análise da perda óssea



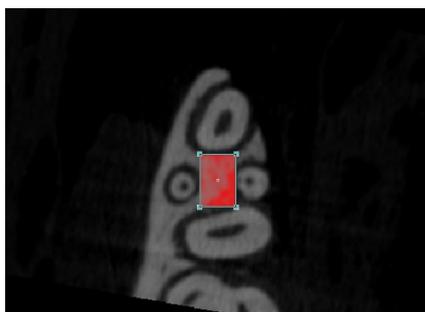
Legenda: a) perda óssea na mesial; b) perda óssea na furca mesial; c) perda óssea na furca distal.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.8 Análise por microtomografia computadorizada (Micro-CT)

Após a fixação em formol a 10% tamponado por 24 horas, as hemimandíbulas direitas foram lavadas por 48 horas em água corrente e armazenadas em álcool 70%, a fim de serem submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada (Faculdade de Odontologia – UNESP – Araraquara). As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 17,48 μm de espessura (50Kv e 500 μA), com filtro de cobre e alumínio e passo de rotação de 0,0120 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software Nrecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CT Analyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida a área de interesse para avaliação tridimensional. O software CTAnalyzer analisa e mede a imagem de acordo com as escalas de cinza (*threshold*). Foi padronizada uma região de interesse (ROI) tridimensional, definida pelo paralelepípedo limitado entre as raízes mesial, distal, vestibular e lingual do primeiro molar, além da furca do (limite coronário) e mais 160 tomogramas sentido ápice

radicular (limite apical) (Figura 6). Foram obtidos os seguintes parâmetros de microarquitetura: porcentagem de volume ósseo (BV/TV %), número de trabéculas ósseas (Tb.N – 1/mm), espessura (Tb.Th – mm) e separação trabecular (Tb.Sp – mm), e porosidade óssea total (PO.tot %).

Figura 6 – Região de interesse (ROI) avaliada



Legenda: A ROI está em vermelho, limitada pelas raízes do primeiro molar. O limite superior é a furca, e o limite inferior corresponde ao tomograma 160.

Fonte: elaborado pelo autor;

3.9 Análise estatística

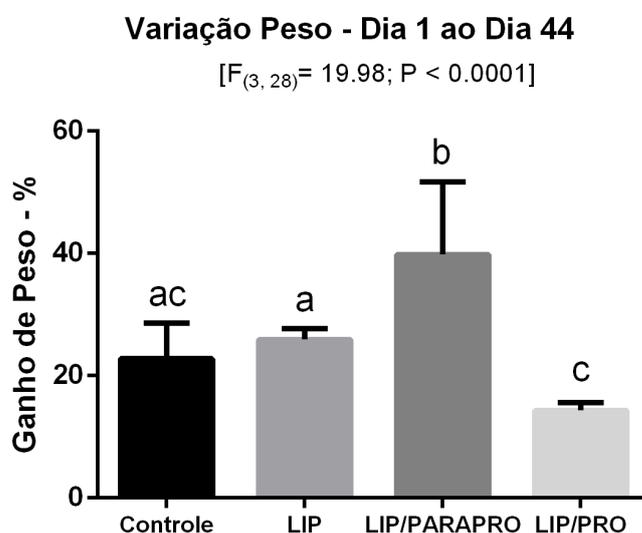
Os dados obtidos foram analisados segundo a análise de variância (ANOVA). Em todos os testes foi utilizado o programa Graphpad Prism versão 7 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, EUA), com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Peso dos animais

Após análise estatística da porcentagem de ganho de peso entre o dia 44 (eutanásia) e o dia 1 (início de tratamento), verificou-se diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,0001$, ANOVA, figura 7). O tratamento com paraprobiótico levou à maior porcentagem de ganho de peso, diferindo dos demais grupos. Por outro lado, o grupo LIP/PRO apresentou uma diminuição no ganho de peso quando comparado ao grupo LIP e ao grupo LIP/PARAPRO, sendo semelhante ao grupo controle.

Figura 7 - Gráfico da variação do peso

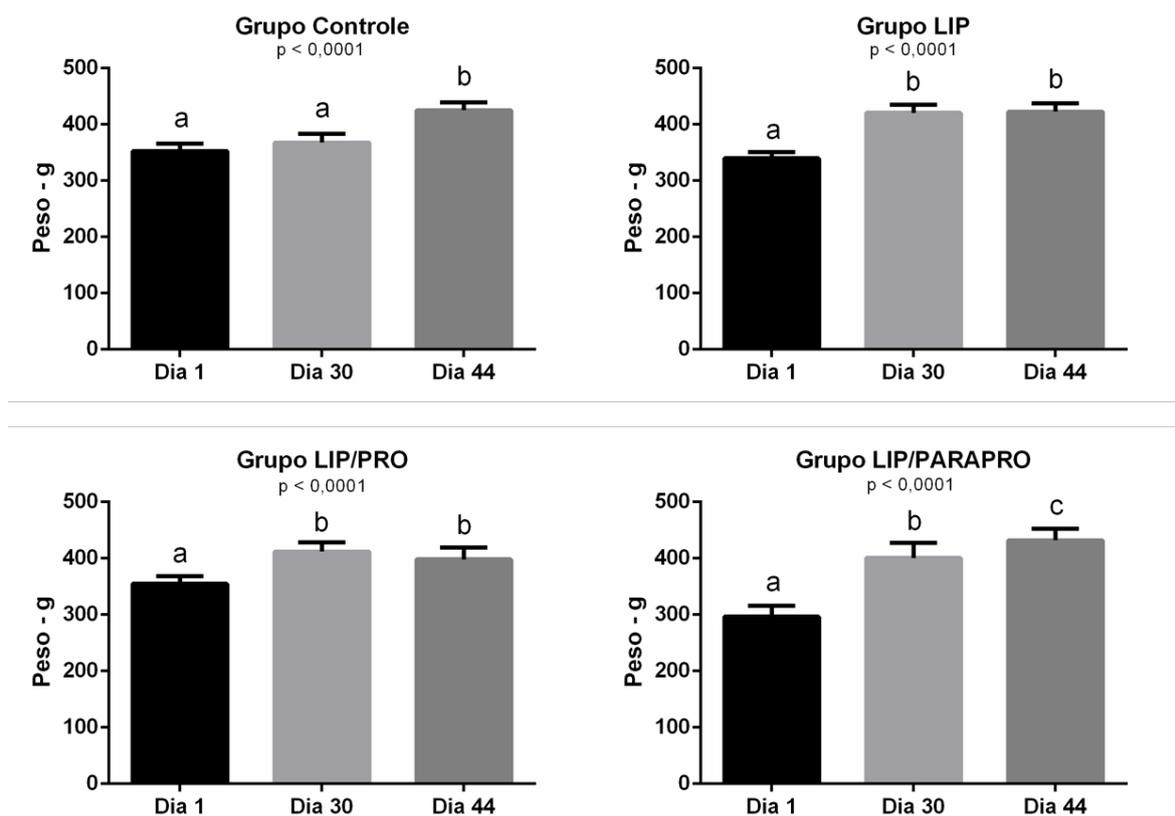


Legenda: Gráfico de médias e desvios-padrão dos valores de porcentagem de ganho de peso. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após análise estatística da variação de peso intragrupos para avaliar o efeito da medicação e ligadura sobre ganho de peso animal, verificou-se no grupo LIP e LIP/PRO, após a ligadura, os animais não apresentaram ganho de peso contínuo

como observado no grupo controle. Porém, o tratamento com paraprobiótico levou ao ganho de peso após a ligadura semelhante ao grupo controle, diferindo dos demais grupos que receberam a ligadura ($p < 0,05$, t test, figura 8).

Figura 8 – Ganho de peso intragrupos



Legenda: Gráfico da variação de peso intragrupos. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.

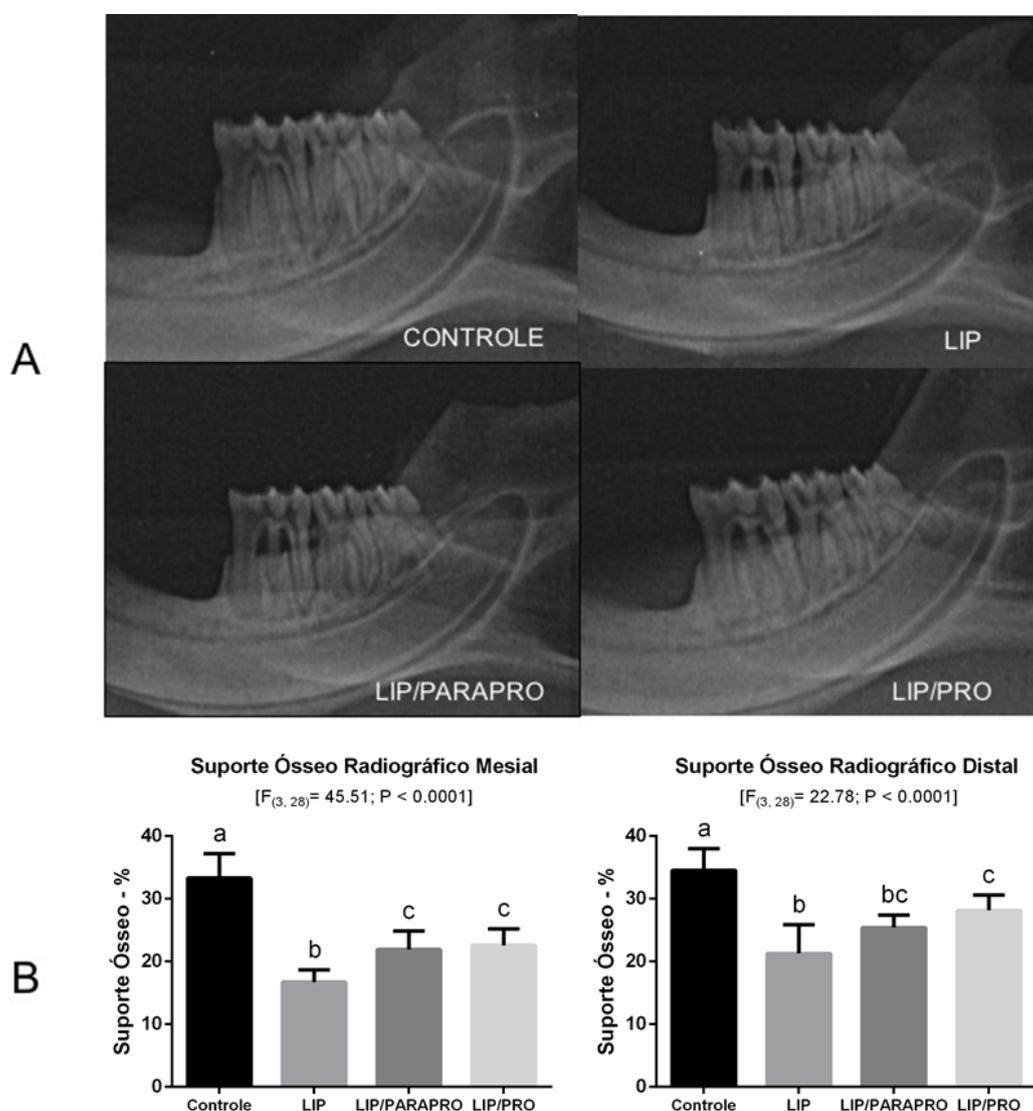
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Suporte ósseo

Após análise do suporte ósseo, observou-se que o método de ligadura foi eficaz na indução da doença periodontal, uma vez que houve diferença estatística entre os grupos Controle e os que receberam ligadura (LIP; LIP/PARAPRO; LIP/PRO) (ANOVA; $p < 0,0001$). As análises de suporte ósseo, mesial e distal, mostraram diferença significativa entre os grupos com doença periodontal sem

tratamento (LIP) e os grupos que receberam tratamento (LIP/PARAPRO; LIP/PRO). (Figura 9A e 9B). Os grupos que receberam tratamento (LIP/PARAPRO; LIP/PRO) apresentaram porcentagem de suporte ósseo mesial e distal similares e maiores que o grupo LIP, de maneira significativa estatisticamente, exceto na comparação entre LIP/PARAPRO e LIP, com relação ao suporte distal.

Figura 9 – Análise do suporte ósseo



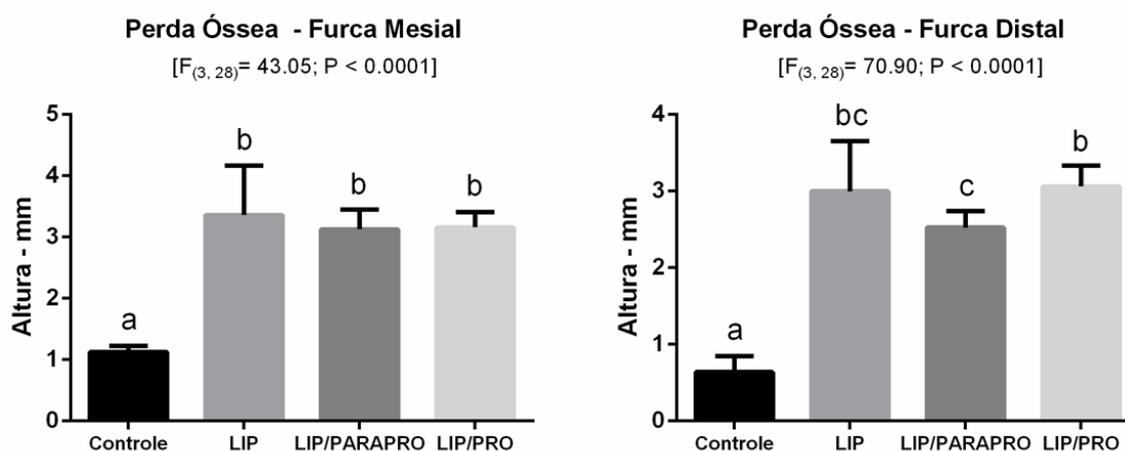
Legenda: a) radiografias de um animal representativo de cada grupo. Observa-se que há maior suporte ósseo no grupo Controle comparado aos com ligadura (LIP; LIP/PARAPRO; LIP/PRO); b) gráfico de médias e desvios-padrão de porcentagem de suporte ósseo radiográfico mesial e distal. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Perda óssea

Novamente, foi demonstrado que o método de ligadura é eficaz na indução da doença periodontal, com diferença estatística significativa (ANOVA; $p < 0,0001$) entre os grupos controle e os que receberam ligadura (LIP; LIP/PARAPRO; LIP/PRO). Por outro lado, não houve diferença estatística na perda óssea na região de furca mesial entre os grupos com doença periodontal independente do tratamento (LIP; LIP/PARAPRO; LIP/PRO). Já na região de furca distal houve diferença estatística significativa entre o grupo LIP/PARAPRO e LIP/PRO, tendo, este, maior perda óssea, embora ambos não difiram do grupo LIP (Figura 10).

Figura 10 – Gráfico de perda óssea na furca mesial e distal



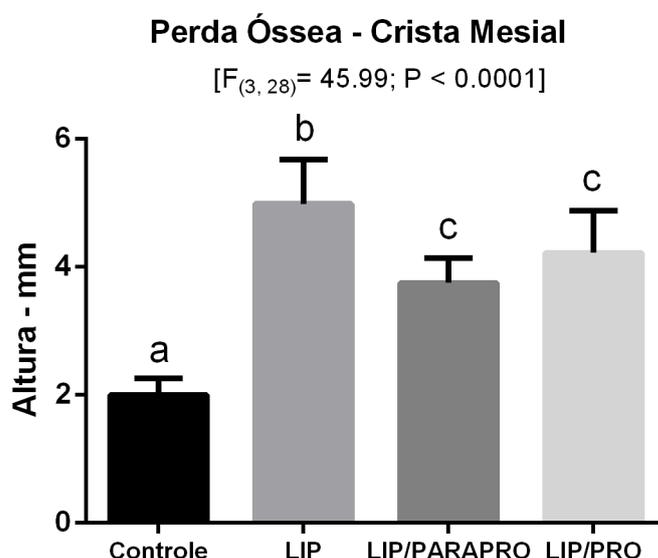
Legenda: Gráfico de médias e desvios-padrão das medidas lineares de perda óssea na furca mesial e distal. A ligadura foi efetiva na indução da periodontite e o *L. reuteri* inativado (LIP/PARAPRO) e viável (LIP/PRO) não apresentaram efeito positivo na prevenção de reabsorção óssea em periodontite quando comparado ao grupo com periodontite sem tratamento (LIP).

Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na avaliação da perda óssea na crista mesial houve diferença estatística entre o grupo com doença periodontal sem tratamento (LIP) e os grupos tratados, evidenciando a influência do *L. reuteri* na inibição da reabsorção óssea induzida pela periodontite nesta região (Figura 11).

Figura 11 – Gráfico de perda óssea na crista mesial



Legenda: Gráfico de médias e desvios-padrão das medidas lineares de perda óssea na crista mesial. A ligadura foi efetiva na indução da periodontite e *L. reuteri* diminuiu a perda óssea comparada ao grupo com periodontite sem tratamento (LIP).

Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Porcentagem de volume ósseo, espessura trabecular, número de trabéculas, separação trabecular e porosidade óssea total

Em todas as avaliações microtomográficas em região de furca do primeiro molar, a ligadura mostrou-se eficaz na indução da doença periodontal (LIP) com diferença estatística quando comparados ao grupo controle (ANOVA; $p < 0,0001$).

L. reuteri inativado mostrou efeito positivo na preservação do volume ósseo, havendo diferença estatística entre o grupo tratado com paraprobiótico (LIP/PARAPRO) e o grupo com doença periodontal sem tratamento (LIP). Os animais tratados com o *L. reuteri* viável (LIP/PRO) não apresentaram diferença estatística em relação aos demais grupos com ligadura (LIP, LIP/PARAPRO) (Figura 12A).

Quanto à espessura trabecular, houve diferença entre o grupo controle e os demais. Entre os grupos com doença periodontal, o grupo LIP/PRO apresentou

maior espessura trabecular que o grupo LIP, sem no entanto, diferença estatística com o grupo que recebeu paraprobiótico (Figura 12B).

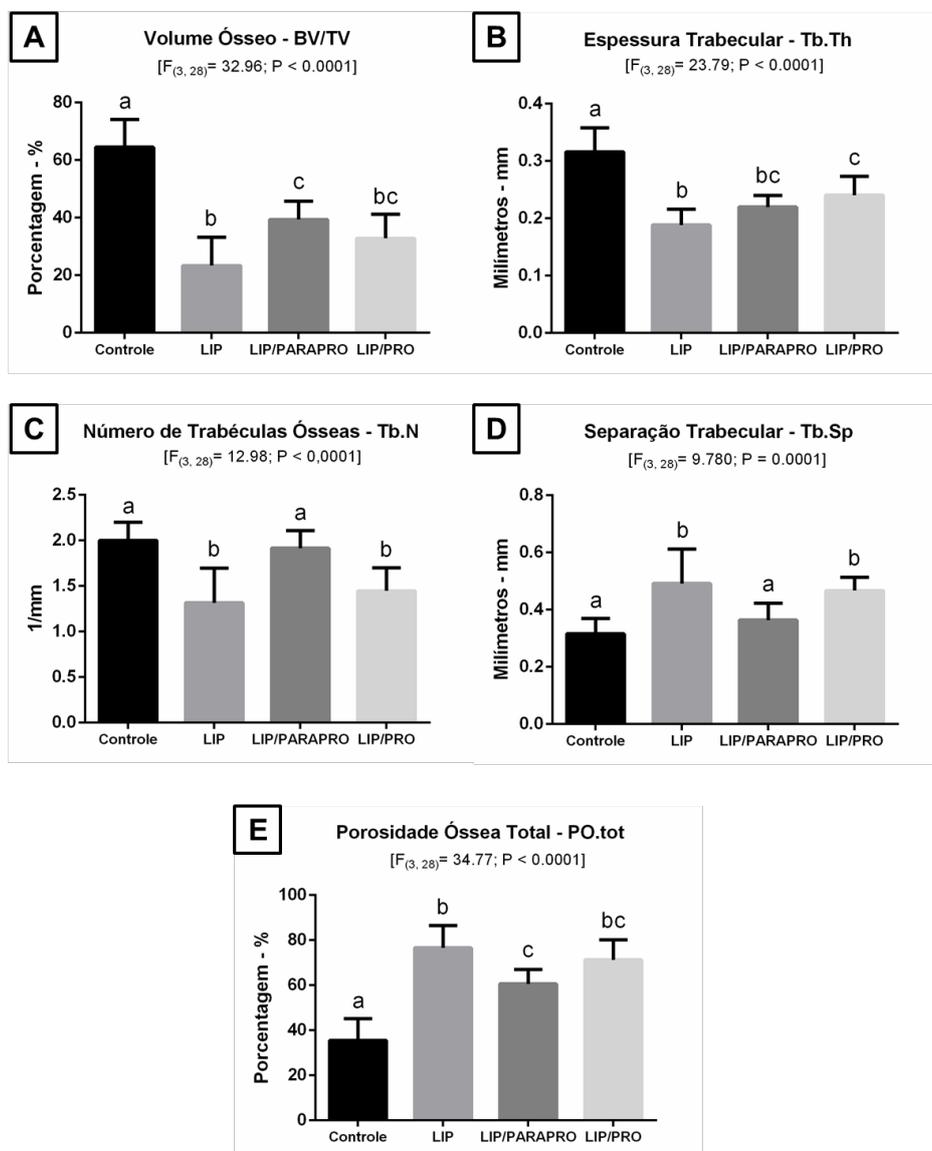
O tratamento com *L. reuteri* inativado (LIP/PARAPRO) também mostrou efeito positivo na preservação do número de trabéculas ósseas, apresentando diferença estatística (ANOVA; $p < 0,0001$) quando comparado aos grupos LIP e LIP/PRO (Figura 12C).

Na análise da separação trabecular, também foi observado efeito positivo do *L. reuteri* inativado, onde o grupo LIP/PARAPRO foi diferente estatisticamente em relação ao grupo LIP. Os animais tratados com o *L. reuteri* viável (LIP/PRO) obtiveram menor separação trabecular do que o grupo LIP, porém, sem diferença estatística em relação a eles (Figura 12D).

A instalação de ligadura nos animais aumentou a porosidade óssea total independente do tratamento quando comparado ao grupo controle. Porém, o grupo LIP/PARAPRO apresentou menor porosidade e foi diferente estatisticamente (ANOVA; $p < 0,0001$) do grupo LIP (Figura 12E). No entanto, não houve diferença entre os grupos que receberam *L. reuteri* viável e inativado pelo calor.

Na Figura 13 é possível visualizar as imagens feitas por microtomografia, e comparar a microestrutura óssea em diferentes cortes (axial, coronal e sagital) entre os quatro grupos, sendo visível a menor perda óssea nos grupos LIP/PARAPRO e LIP/PRO, quando comparado ao grupo LIP.

Figura 12 – Gráficos dos dados analisados por microtomografia

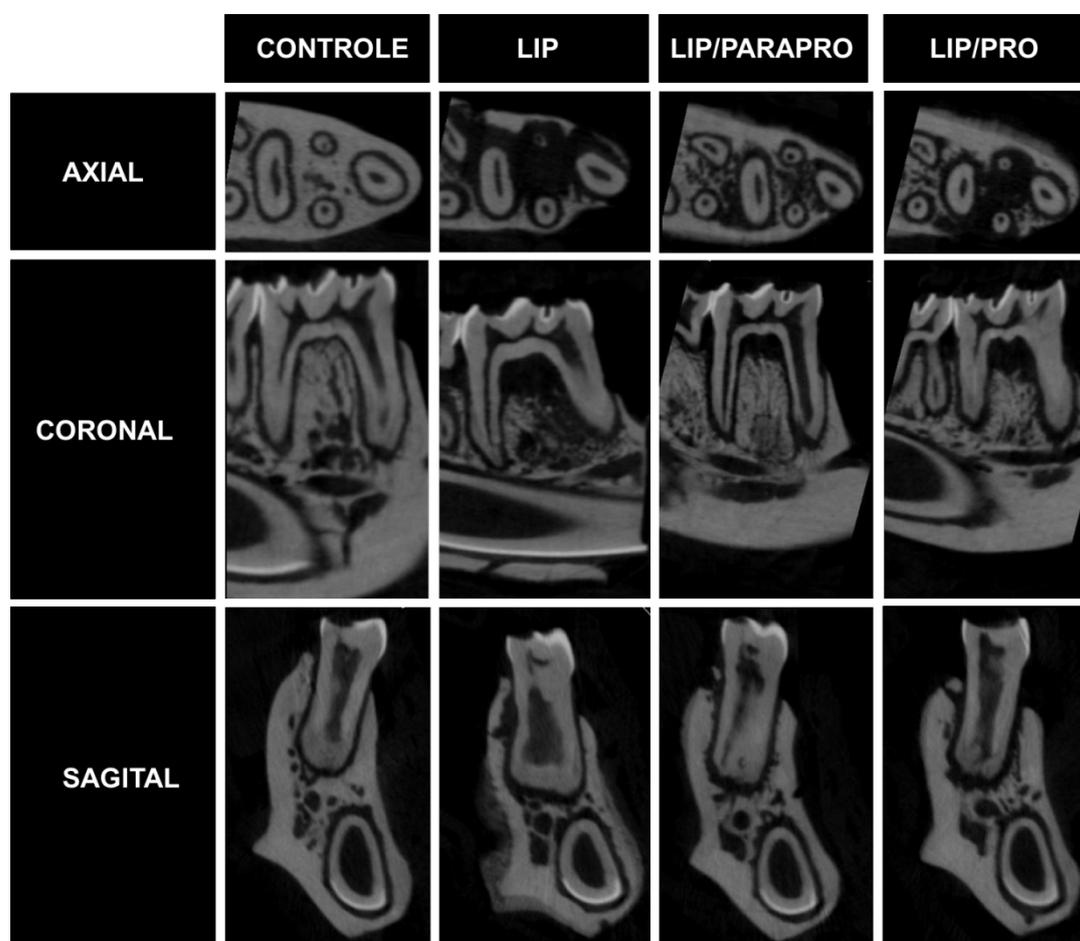


Legenda: a) gráfico de médias e desvios-padrão da porcentagem de volume ósseo na região de furca do primeiro molar inferior: *L. reuteri* inativado (LIP/PARAPRO) e *L. reuteri* viável (LIP/PRO) apresentaram efeitos semelhantes, mas apenas LIP/PARAPRO mostrou diferença estatística quando comparado ao grupo com periodontite sem tratamento (LIP); b) gráfico de médias e desvios-padrão da espessura trabecular: grupos LIP/PRO e LIP/PARAPRO apresentaram efeitos semelhantes, mas apenas o probiótico viável causou diferença significativa com relação ao grupo LIP; c) gráfico de médias e desvios-padrão do número de trabéculas ósseas na região de furca do primeiro molar inferior: grupo LIP/PARAPRO apresentou maior número de trabéculas em relação aos demais grupos que receberam ligadura; d) gráfico de médias e desvios-padrão da separação trabecular na região de furca do primeiro molar inferior: grupo LIP/PARAPRO apresentou menor separação trabecular os demais grupo com ligadura; e) gráfico de médias e desvios-padrão da porosidade óssea total em região de furca do primeiro molar inferior: LIP/PARAPRO e LIP/PRO apresentaram resultados semelhantes, mas apenas o grupo LIP/PARAPRO obteve menor porosidade, de maneira significativa, com relação ao grupo LIP.

Letras iguais indicam ausência de diferença estatística.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Cortes da microtomografia



Legenda: Comparação da microestrutura óssea nos cortes axial, coronal e sagital. Os grupos tratados apresentaram menor perda óssea quando comparado ao grupo LIP.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A doença periodontal é uma doença que representa, mundialmente, um problema de saúde pública. A perda óssea alveolar é uma característica da progressão da doença periodontal e sua prevenção é um desafio no tratamento (Hienz et al., 2015). Novas terapias, como os probióticos, que são tradicionalmente utilizados no campo da medicina, estão sendo usados na tentativa de tratamento e controle da doença periodontal (Dhingra et al., 2012). Apesar de crescente número de trabalhos com probióticos, poucos estudos tem sido feitos em torno de sua forma inativada.

Este método de indução de doença periodontal por ligadura, e administração de probióticos, como do gênero *Bacillus* e *Bifidobacterium*, por via oral para modulação da resposta do hospedeiro tem sido amplamente utilizado e tem mostrado bons resultados (Messora et al., 2013, 2016; Ricoldi et al., 2017). Neste estudo, iniciamos a terapia com os probióticos e paraprobióticos 30 dias antes da indução da doença periodontal, com o intuito de avaliarmos o efeito preventivo da terapia no desenvolvimento da doença.

As vias de administração do medicamento variam na literatura, podendo ser administrado por gavagem (Gatej et al., 2018) ou até mesmo aplicado de forma tópica (Oliveira et al., 2017). Escolhemos administrar o medicamento por via oral, através de uma seringa de insulina, para que a solução ($1,5 \times 10^9$ UFC em 300 μ l) entrasse em contato diretamente com a cavidade oral dos animais, para avaliação dos efeitos locais e sistêmicos.

Inicialmente, avaliamos a influência da presença/ausência de ligadura e do tratamento com *L. reuteri* viável e inativado, no peso dos animais. Em nossos resultados, encontramos um aumento no peso, de forma contínua, do grupo tratado com paraprobiótico, quando comparado aos outros grupos com ligadura. Alguns estudos avaliaram efeitos de vários *Lactobacillus* no peso de animais e humanos, e mostraram que estes efeitos podem variar de acordo com as espécies de microorganismos (Million et al., 2012; Drissi et al., 2014). Interessantemente, no estudo de Million et al. (2011), onde avaliaram a microbiota intestinal humana, observaram-se elevados níveis de *L. reuteri* em pacientes com obesidade. Diferente do que foi

encontrado na literatura, em nosso estudo, o grupo LIP/PRO teve diminuição de peso comparado ao grupo controle, porém não foi significativa estatisticamente. Este resultado pode estar relacionado à cepa utilizada. Algumas espécies são associadas ao ganho de peso, enquanto outras, à perda de peso. É possível, também, que os micro-organismos em sua forma inativada sofram menos alterações com as condições de pH do estômago (Adams et al., 2010) o que pode explicar o efeito sobre a mucosa gastrointestinal, que levou ao ganho de peso dos animais.

L. reuteri vem sendo avaliado em diversos trabalhos, com bons resultados, como: melhora nos parâmetros clínicos em pacientes com mucosite peri-implantar (Fernández et al., 2015), redução da gengivite e placa bacteriana em pacientes com gengivite moderada a severa (Krasse et al., 2006), efeito antimicrobiano e inibição de placa (Vivekananda et al., 2010), diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias (Ma et al., 2004; Twetman et al., 2009). Neste estudo, escolhemos como fonte para/probiótica o *L. reuteri* Prodentis® (ATCC PTA 5289 associado à DSM 17938, que tem sido a cepa mais utilizada nos estudos clínicos. Além desta, várias cepas consideradas seguras vêm sendo testadas em outros estudos, como *Lactococcus lactis*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus* (Hatakka et al., 2007) e *L. gasseri* (Sugawara et al., 2016).

Sabe-se que os probióticos modificam a microbiota intestinal, e vários mecanismos pelos quais ocorre esta modificação têm sido propostos, incluindo competição por substratos, produção de compostos tóxicos que inibem patógenos e competição por sítios de ligação (Angelakis et al., 2017). Sugere-se que o efeito de uma espécie probiótica na flora intestinal é provavelmente determinada pela produção de bacteriocinas (Angelakis et al., 2013), que são peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias (Cotter et al., 2005). No estudo de Messori et al. (2013), os autores observaram que a periodontite induzida por ligadura causou efeitos no intestino, diminuindo a altura das vilosidades intestinais e a profundidade da cripta. Já no grupo com periodontite induzida e tratamento com probiótico (*Bacillus subtilis*), observaram um efeito protetor na estrutura intestinal, tendo maior altura das vilosidades quando comparado ao grupo não tratado. Em estudos em que foi utilizado *L. reuteri* em frangos (Mountzouris et al., 2007), cabras (Chiofalo et al., 2004) e leitões (Chang et al., 2001), ocorreu um aumento de peso significativo. Já no estudo de Gatej et al. (2018), realizado em ratos, não houve aumento de peso

significante dos animais quando o probiótico foi administrado por via oral, porém houve aumento quando administrado por gavagem. Até onde vai nosso conhecimento, não há na literatura estudos sobre a influência de paraprobióticos na variação de peso de animais. O estudo de Sugawara et al. (2016) mostrou que o consumo do paraprobiótico de *L. gasseri* contribuiu no controle da microflora intestinal. Isto sugere que a forma inativada do micro-organismo também contribua para melhor absorção de nutrientes, fazendo com que haja aumento no ganho de peso.

Por ser um método de rápida execução e baixo custo, o recurso mais utilizado para a determinação do suporte ósseo e perda óssea alveolar causada pela doença periodontal, são as radiografias intra-orais. Entretanto, existe uma limitação, já que fornece uma imagem bidimensional e não tridimensional, podendo ocorrer sobreposição de estruturas. Uma variável importante nas análises radiográficas é a definição dos pontos de referências a serem considerados na avaliação do suporte e perda óssea (Klausen et al., 1989). O osso alveolar interproximal é uma estrutura tridimensional, e sua imagem radiográfica é influenciada pela angulação da peça em relação ao feixe de radiação. Esta variável pode resultar em uma imagem infiel à situação real. De forma a diminuir esta variável, as peças foram radiografadas utilizando-se posicionadores. Neste estudo, a padronização das radiografias e seleção dos pontos anatômicos de referência foi realizada por um único observador treinado.

A ligadura foi eficaz na indução de doença periodontal, visto que houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos com ligadura. Em nosso estudo, encontramos maior suporte ósseo mesial no grupo LIP/PARAPRO e no grupo LIP/PRO quando comparados ao grupo somente com ligadura (LIP). Por outro lado, o uso do probiótico viável, apesar de semelhante ao inativado na manutenção do suporte ósseo radiográfico distal, foi o único estatisticamente diferente do grupo LIP. Nossos resultados relacionados ao probiótico corroboram os da literatura (Kobayashi et al., 2017; Gatej et al., 2018). Na literatura, não há trabalhos que relatem os efeitos de paraprobióticos sobre a perda óssea, porém os efeitos do *L. reuteri* inativado foram semelhantes aos da forma viável na inibição da perda óssea mesial, mas apenas o bacilo inativado alcançou diferença estatística significativa com relação ao grupo LIP. O uso de *L. reuteri* em indivíduos com periodontite

causou a diminuição da liberação de mediadores inflamatórios (Fernández et al., 2015; Vivekananda et al., 2010). Adams et al. (2010) sugerem que o paraprobiótico também possua efeito sobre a modulação da resposta inflamatória. Baseado nos resultados encontrados no presente estudo podemos sugerir que os probióticos e paraprobióticos diminuem a inflamação, diminuindo, assim, a reabsorção e perda óssea.

Para análise de morfologia óssea, a microtomografia computadorizada tem sido uma ferramenta importante. Diversos estudos encontraram resultados semelhantes quanto à preservação de volume ósseo, quando utilizados os probióticos (Messora et al., 2016; Oliveira et al., 2017; Ricoldi et al., 2017). Nos diversos parâmetros de análise de microarquitetura óssea na furca, o uso do probiótico e de sua forma inativada foi semelhante, embora a significância estatística na comparação com o grupo com doença e sem tratamento tenha sido mais evidente no grupo LIP/PARAPRO. No estudo de Ricoldi et al. (2017) o uso de probiótico *Bifidobacterium lactis* ajudou na manutenção do número de trabéculas e na separação trabecular. Em nosso estudo, o grupo LIP/PARAPRO teve uma maior preservação do número de trabéculas e redução da separação trabecular, quando comparado com os grupos LIP e LIP/PRO.

Os estudos que avaliam os efeitos dos probióticos são muito heterogêneos, provavelmente devido a diferentes doses, espécies bacterianas, duração do tratamento e vias de administração utilizadas. Estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando probióticos e paraprobióticos (Baharav et al., 2004; Vinderola et al., 2005; Chuang et al., 2007) obtiveram resultados positivos quanto ao papel na modulação da resposta imune do hospedeiro. Já no estudo de Ma et al. (2004), *L. reuteri* demonstrou efeito imunomodulador apenas quando administrado sua forma viável. Isto demonstra a dificuldade em se estabelecer um padrão geral de ação de ambas as formas. Em nosso trabalho, obtivemos resultados diferentes de alguns estudos clínicos em humanos, visto que em algumas análises, o grupo que recebeu probiótico viável não apresentou diferença significativa com relação ao controle sem tratamento (LIP), e isto pode ser devido ao tratamento periodontal realizado em conjunto com o tratamento probiótico nos estudos clínicos, enquanto administramos apenas o probiótico. Embora possuam propriedades conhecidas, diferentes cepas podem colonizar o hospedeiro de diversas formas, gerando diferentes respostas biológicas.

O efeito dos micro-organismos vivos pode ter participação também de sua forma inativada, visto que as soluções probióticas podem conter diferentes quantidades de micro-organismos inativos, sendo de difícil conhecimento. Em uma cultura de micro-organismos inativados é fácil a identificação caso haja células vivas, porém, o inverso dificilmente é identificável. Portanto, a quantidade de células inativas pode chegar a ser maior que a de células vivas, prejudicando a avaliação correta de qualquer resposta positiva do hospedeiro (Adams et al., 2010).

Os estudos utilizando paraprobióticos ainda são escassos, porém, podemos afirmar que seu uso possui diversas vantagens. Além de também modificarem a resposta biológica do hospedeiro, seu uso se torna mais seguro pelo reduzido risco de causar resposta patológica, são mais fáceis de armazenar e sua validade em produtos é maior que a dos probióticos. Além disso, em nosso estudo, encontramos também efeitos benéficos reduzindo a perda óssea e melhorando a microarquitetura óssea, podendo ser um bom adjuvante em tratamento de doença periodontal.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que, nas condições experimentais utilizadas, tanto o probiótico como o paraprobiótico apresentam efeitos positivos na redução da perda óssea resultante da periodontite induzida em ratos, embora a significância estatística na comparação com o grupo com doença e sem tratamento tenha sido mais evidente no grupo LIP/PARAPRO.

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. PubMed PMID:20403231.
- Aiba Y, Ishikawa H, Tokunaga M, Komatsu Y. Anti-Helicobacter pylori activity of non-living, heat-killed form of lactobacilli including Lactobacillus johnsonii No.1088. *FEMS Microbiol Lett.* 2017;364(11). doi: 10.1093/femsle/fnx102. PubMed PMID: 28505287.
- Anbinder AL, Prado MA, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, da Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Braz Dent J.* 2006;17(3):201-7. PubMed PMID:17262125.
- Angelakis E, Merhej V, Raoult D. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(10):889-99. doi:10.1016/S1473-3099(13)70179-8. PubMed PMID: 24070562.
- Angelakis E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microb Pathog.* 2017;106:162-70. doi: 10.1016/j.micpath.2016.11.002. PubMed PMID: 27836763.
- Araújo MG, Sukekava F. Epidemiologia da doença periodontal na América Latina. *Rev Periodontia.* 2007;17(2):7-13.
- Baharav E, Mor F, Halpern M, Weinberger A. Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats. *J Nutr.* 2004;134(8):1964-9. doi: 10.1093/jn/134.8.1964. PubMed PMID: 15284384.
- Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang MLK. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr.* 2006;83:1256-64. doi:10.1093/ajcn/83.6.1256. PubMed PMID:16762934.
- Bron PA, van Baarlen P, Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10:66-78. doi: 10.1038/nrmicro2690. PubMed PMID:22101918.
- Bustamante M, Oomah BD, Mosi-Roa Y, Rubilar M, Burgos-Diaz C. Probiotics as an adjunct therapy for the treatment of halitosis, dental caries and periodontitis. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2019. [Epub ahead of print] doi: 10.1007/s12602-019-9521-4. PubMed PMID: 30729452.
- Chang YH, Kim JK, Kim HJ, Kim WY, Kim YB, Park YH. Selection of a potential probiotic Lactobacillus strain and subsequent in vivo studies. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2001;80(2):193-9. PubMed PMID: 11759052.

* 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 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Chiofalo V, Liotta L, Chiofalo B. Effects of the administration of Lactobacilli on body growth and on the metabolic profile in growing Maltese goat kids. *Reprod Nutr Dev*. 2004;44(5):449-57. PubMed PMID: 15636163.

Chuang L, Wu KG, Pai C, Hsieh PS, Tsai JJ, Yen JH, et al. Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. *J Agric Food Chem*. 2007;55(26):11080-6. doi: 10.1021/jf071786o. PubMed PMID: 18038979.

Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Blay GL. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by lactobacillus reuteri against intestinal bacteria. *BMC Microbiology*. 2007;7:101. doi 10.1186/1471-2180-7-101.

Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(10):777-88. doi: 10.1038/nrmicro1273. PubMed PMID:16205711.

Devine DA, Marsh PD. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *J Oral Microbiol*. 2009;1:1-11. doi: 10.3402/jom.v1i0.1949.

Dhingra K. Methodological issues in randomized trials assessing probiotics for periodontal treatment. *J Periodontal Res*. 2012;47(1):15-26. doi: 10.1111 / j.1600-0765.2011.01399.x. PubMed PMID: 21777405.

Drissi F, Merhej V, Angelakis E, El Kaoutari A, Carrière F, Henrissat B, et al. Comparative genomics analysis of Lactobacillus species associated with weight gain or weight protection. *Nutr Diabetes*. 2014;24;4e109. doi: 10.1038/nutd.2014.6. PubMed PMID: 24567124.

El-Ziney MG, Van Den TT, Debevere J, Jakobsen M. Application of reuterin produced by lactobacillus reuteri12002 for meat decontamination and preservation. *J Food Prot*. 1999;62(3):257-61. PMID:10090245.

Eslami M, Yousefi B, Kokhaei P, Hemati M, Nejad ZR, Arabkari V, et al. Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2019. [Epub ahead of print] doi: 10.1002/jcp.28473. PubMed PMID: 30912128.

Fernández AJF, Ali JA, Domingo TA, Marti EC, Ali FA, 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 Periodont Res*. 2015;50:775-85. doi: 10.1111 / jre.12264. PubMed PMID:25712760.

Food and Agriculture Organization of the united nations - FAO; World Health Organization - WHO. Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria [internet]. Córdoba (Argentina:FAO/WHO;2011) [acesso em: 2018 Oct 17]; 1-34. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. ISSN 0254-4725.

Gatej SM, Marino V, Bright R, Fitzsimmons TR, Gully N, Zilm P, et al. PM. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2018;45(2):204-12. doi: 10.1111/jcpe.12838. PubMed PMID: 29121411.

Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):59-94. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x.

Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2016;48:16-25. doi: 10.1016/j.jdent.2016.03.002.

Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontology* 2000. 2006;42:219-58. doi:10.1111 / j.1600-0757.2006.00191.x.PubMed PMID:16930312.

Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuttilla H, Richardson M, Poussa T, Meuman JH, et al. Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly – a randomized controlled trial. *J Dent Res*. 2007;86(2):125-30. doi:10.1177 / 154405910708600204. PubMed PMID: 17251510.

Haukioja A. Probiotics and oral health. *Eur J Dent*. 2010;4:348-55. PubMed PMID: 20613927.

Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *J Immunol Res*. 2015;2015:615486. doi: 10.1155/2015/615486. PubMed PMID: 26065002.

Jayaram P, Anirano C, Raghunathan V. Probiotics in the treatment of periodontal disease: a systematic review. *J Indian Soc Periodontol*. 2016;20(5):488-495. doi: 10.4103/0972-124X.207053.

Jenkins WM, Papapanou PN. Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents. *Periodontol* 2000;26:16-32. PubMed PMID: 11452904.

Kang MS, Oh JS, Lee HC, Lim HS, Lee SW, Yang KH, et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodopathogenic and cariogenic bacteria. *The Journal of Microbiology*. 2011;49:193-9. doi:10.1007 / s12275-011-0252-9. PubMed PMID:21538238.

Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93(11):1045-53. doi: 10.1177/0022034514552491. PubMed PMID: 25261053.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;Jun 22:3:17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38. PubMed PMID: 28805207.

Klausen B, Evans RT, Sfintescu C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. *Scand J Dent Res.* 1989 Dec;97(6):494-9. PubMed PMID:2617150.

Kobayashi R, Kobayashi T, Sakai F, Hosoya T, Yamamoto M, Kurita-Ochiai T. Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective in preventing *Porphyromonas gingivalis*-accelerated periodontal disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):545. doi: 10.1038/s41598-017-00623-9. PubMed PMID: 28373699.

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. PubMed PMID: 16878680.

Ma D, Forsythe P, Bienenstock J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun.* 2004;72(9):5308-14. PubMed PMID: 15322027.

Martin-Cabezas R, Davideau JL, Tenenbaum H, Huck O. Clinical efficacy of probiotics as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2016;43:520-30. doi: 10.1111/jcpe.12545.

McFarland LV, Elmer GW. Biotherapeutic agents: past, present and future. *Microecol. Ther.* 1995;23:46-73.

Messora MR, Oliveira LF, Foureaux RC, Taba M, Zangerônimo MG, Furlaneto FA, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol.* 2013;84(12):1818-26. doi:10.1902 / jop.2013.120644. PubMed PMID:23327675.

Messora MR, Pereira LJ, Foureaux R, Oliveira LF, Sordi CG, Alves AJ, et al. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2016;66:108-19. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.02.014. PubMed PMID: 26945169.

Meurman JH. Probiotics: Do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci.* 2005;113:188-96. doi:10.1111 / j.1600-0722.2005.00191.x. PubMed PMID:15953242.

Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Diseases.* 2007;13:443-51. doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01386.x.

Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond).* 2012;36(6):817-25. doi: 10.1038/ijo.2011.153. PubMed PMID: 21829158.

Million M, Angelakis E, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals.

Microb Pathog. 2012;53(2):100-8. doi: 10.1016/j.micpath.2012.05.007. PubMed PMID: 22634320.

Moraes RM, Lima GMG, Oliveira FE, Brito ACV, Pereira RC, Oliveira LD, et al. Exenatide and sitagliptin decrease interleukin 1 β , matrix metalloproteinase 9, and nitric oxide synthase 2 gene expression but does not reduce alveolar bone loss in rats with periodontitis. J Periodontol. 2015 Nov;86(11):1287-95. doi: 10.1902/jop.2015.150278.

Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G, Fegeros K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, and Pediococcus strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. Poult Sci. 2007;86(2):309-17. PubMed PMID: 17234844.

Mu Q, Tavella VJ, Luo XM. Role of Lactobacillus reuteri in human health and diseases. Front Microbiol. 2018;19:9-757. doi: 10.3389/fmicb.2018.00757. PubMed PMID: 29725324.

Oliveira LF, Salvador SL, Silva PH, Furlaneto FA, Figueiredo L, Casarin R, et al. Benefits of Bifidobacterium animalis subsp. lactis probiotic in experimental periodontitis. J Periodontol. 2017;88(2):197-208. doi: 10.1902/jop.2016.160217. PubMed PMID: 27660886.

Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clin Microbiol Rev 2003;16:658-66. PubMed PMID:14557292.

Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, et al. Effects of probiotic Bifidobacterium animalis subsp. lactis on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. Plos One. 2017;12(6):e0179946. doi: 10.1371/journal.pone.0179946. PubMed PMID: 286622142.

Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. Curr Opin Biotechnol. 2005;16:204-11. doi:10.1016 / j.copbio.2005.02.003. PubMed PMID:15831388.

Seminario-Amez M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E. Probiotics and oral health: a systematic review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2017;22(3):282-8. doi:10.4317/medoral.21494.

Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. Periodontol 2000. 2009;51:141-51. doi: 10.1111 / j.1600-0757.2009.00305.x.

Souza AAD, Bezerra CFR, Lima KC, Melo MCN. Aggregatibacter actinomycetemcomitans e sua relação com a periodontite agressiva – revisão da literatura. R. Periodontia. 2008;18(1):20-5.

Sugawara R, Sawada D, Ishida Y, Aihara K, Aoki Y, Takehara I, et al. Regulatory

effect of paraprobiotic *Lactobacillus gasseri* CP2305 on gut environment and function. *Microb Ecol Health Dis*. 2016;27:302-59. doi: 10.3402/mehd.v27.30259.

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. PubMed PMID:3245697.

Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr*. 2011;6:261–74. doi:10.1007 / s12263-011-0218-x. PubMed PMID:21499799.

Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol*. 2011;38(Suppl. 11):159-77. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01665.x. PubMed PMID:21323712.

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. PubMed PMID: 18985460.

Vinderola G, Matar C, Perdigon G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(9):1075-84. doi: 10.1128/CDLI.12.9.1075-1084.2005. PubMed PMID: 16148174.

Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminar randomized clinical trial. *J Oral Microbiol*. 2010;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5444. PubMed PMID: 21523225.

Whitford EJ, Cummins AG, Butler RN, Prisciandaro LD, Fauser JK, Yazbeck R, et al. Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 on intestinal mucositis induced by the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil (5-FU). *Cancer Biol Ther*. 2009;8:505-11. PubMed PMID: 19305160.

Wilkins T, Sequoia J. Probiotics for gastrointestinal conditions: a summary of the evidence. *Am Fam Physician*. 2017;96(3):170-8. PubMed PMID: 28762696.

Yanine N, Araya I, Brignardello-Petersen R, Carrasco-Labra A, González A, Preciado A, et al. Effects of probiotics in periodontal diseases: a systematic review. *Clin Oral Invest*. 2013;17:1627-34. doi:10.1007/s00784-013-0990-7.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



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



CERTIFICADO CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 10/2017, intitulado:- **"EFEITO DO Lactobacillus reuteri Vivo e Morto, durante a indução de periodontite: Estudo In vivo "** sob a responsabilidade de **ANA LIA ANBINDER**, tendo como colaborador o aluno de Pós-Graduação **CARLOS MATHEUS LESCURA**; e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 09/03/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/03/2018 a 13/05/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato/heterogênico Wistar
Nº de Animais	36, (sendo 32 projeto+10% de perda)
Peso/idade	170-250 g – 90 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 09 de março de 2018



Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora