



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

TAINÁ DA SILVA TRICOLY

**EFEITOS DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SUBSP. LACTIS*
HN019VIVO E INATIVADO NA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL EM RATOS**

2023

TAINÁ DA SILVA TRICOLY

**EFEITOS DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SUBSP. LACTIS* HN019 VIVO E
INATIVADO NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

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 MESTRA, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Imaginologia e terapias em odontologia.

Orientadora: Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardimi

Coorientadora: Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. 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).

Tricolý, Taina da Silva

Efeitos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 vivo e inativado na periodontite experimental em ratos / Taina da Silva Tricolý. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardimi

Coorientadora: Ana Lia Anbinder

1. Periodontite. 2. Doença periodontal. 3. Probióticos. 4. Blactis. 5. Intestino delgado. I. Jardimi, Maria Aparecida Neves, orient. II. Anbinder, Ana Lia, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Maria Aparecida Neves Jardim (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Nídia Cristina Castro dos Santos

Universidade Universus Veritas Guarulhos

UNG

Guarulhos

São José dos Campos, 22 de março de 2023.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais e familiares, principalmente ao meu avô
Armando (inmemoriam) e ao meu irmão Filipe (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, em especial à equipe do laboratório CEBAPE que viabilizou a realização deste e de muitos outros trabalhos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB).

Aos meus pais, Fernanda e Valdecir, por todo o incentivo, amor e suporte. Por não medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos e chegar aonde estou hoje. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus familiares, Marina, Roseli, Maurício, Beatriz, Ivone, Rosana, Carla, Thiago, Pedro, Rafaela, Rosângela, Raul e Maria Luiza por vibrarem e me incentivaram a cada conquista.

Ao meu namorado, Vitor, por todo apoio, paciência e incentivo em todos os momentos.

À professora Maria Aparecida Neves Jardini, por ser muito mais do que uma orientadora. Você é uma pessoa maravilhosa em quem me espelho diariamente. Agradeço por toda a paciência e carinho. É lindo ver sua paixão pela profissão que exerce.

À Professora Ana Lia Anbinder e suas alunas, por me ensinarem e me ajudarem durante o trajeto do trabalho.

Às minhas amigas Victória, Mariana, Nicole, Itza e Beatriz que acompanharam e me deram apoio e força durante esse período. Agradeço em especial à Itza por toda a ajuda e à Victoria pelo companheirismo e muito aprendizado.

Às minhas amigas Marina e Mariana, com quem sou grata pela amizade e sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus amigos Luccas e Pedro por todos os bons momentos vividos durante esse período.

Aos meus amigos Pedrão, Bruno, Raphael e Fernando por acompanharem essa caminhada, sempre torcendo por mim.

À Camila Lopes, companheira de muito trabalho, obrigada sempre estar disposta a ajudar. À Marcinha e Valéria, pela atenção e cuidado e por todo o suporte na clínica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado, através do financiamento 001 no período de agosto de 2022 a março de 2023.

"Nossos pensamentos e imaginação são os únicos limites reais para nossas possibilidades". Orison Swett Marden

RESUMO

Tricolly TS. Efeitos de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* HN019 vivo e inativado na periodontite experimental em ratos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

A periodontite é uma doença crônica e complexa, abrangendo mais de uma forma de tratamento combinados. Os probióticos têm ganhado espaço em casos de terapias adjuvantes e mostrado resultados promissores quando utilizados em casos de periodontite. O objetivo do estudo foi avaliar a ação do probiótico *Bifidobacterium lactis* vivo e inativado na periodontite induzida por ligadura em ratos. Foram utilizados 32 ratos machos, nos seguintes grupos: GC/controle animais sem periodontite que receberam apenas caldo Man Rogosa-Sharpe (MRS); GP/periodontite experimental e caldo MRS; GP/PROB periodontite experimental + probiótico vivo e o grupo GP/POSB periodontite experimental + posbiótico. Após 45 dias, os animais foram eutanasiados. As hemimandíbulas foram analisadas por microtomografia computadorizada e histomorfometria de perda óssea alveolar. O intestino delgado foi analisado por histomorfometria de altura de vilos e profundidade de criptas intestinais. Os dados foram submetidos à análise estatística apropriada, ao nível de 5%. Os parâmetros de volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), separação das trabéculas (Tb.Sp) e porosidade total (PO total) foram diferentes entre o GC e os demais grupos, GP, GP/POSB e GP/PROB. O GC apresentou maiores valores para BV/TV. Para PO total e Tb.Sp o GC apresentou menores valores. No parâmetro de Tb.n o GP.PROB apresentou maiores valores. Para espessura trabecular (Tb.Th) houve diferença estatística entre o GC e GP e entre GC e GP/PROB, sendo que GC apresentou valores maiores em ambos os casos. Para a perda óssea da furca houve diferença estatística entre o GC e os demais grupos, sendo que GC apresentou menores valores de perda óssea. Em relação ao intestino delgado, não houve diferença estatística entre os grupos. Concluímos que tanto o probiótico vivo como o inativado não foram capazes de atuar na inibição da perda óssea na área de furca bem como não foram capazes de agir como modulador da resposta inflamatória no intestino.

Palavras-chave: periodontite; doença periodontal; probióticos; B.lactis; posbióticos; intestino delgado.

ABSTRACT

Tricolly TS. *Effects of Bifidobacterium animalis subsp. Lactis HN019 live and inactivated in experimental periodontitis in rats [dissertation]*. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

Periodontitis is a chronic and complex disease, encompassing more than one form of combined treatment. Probiotics have gained space in cases of adjuvant therapies and have shown promising results when used in cases of periodontitis. The aim of the study was to evaluate the action of the live and inactivated probiotic *Bifidobacterium lactis* on ligature-induced periodontitis in rats. 32 male rats were used in the following groups: CG/control animals without periodontitis that received only Man Rogosa-Sharpe broth (MRS); GP/experimental periodontitis and MRS broth; GP/PROB experimental periodontitis + live probiotic and GP/POSB experimental periodontitis + postbiotic group. After 45 days, the animals were euthanized. The hemimandibles were analyzed by computed microtomography and histomorphometry of alveolar bone loss. The small intestine was analyzed by histomorphometry of villus height and intestinal crypt depth. Data were subjected to appropriate statistical analysis at the 5% level. The parameters of bone volume (BV/TV), number of trabeculae (Tb.N), trabeculae separation (Tb.Sp) and total porosity (total PO) were different between the CG and the other groups, GP, GP/POSB and GP/PROB. The CG showed higher values for BV/TV. For total PO and Tb.Sp, the CG showed lower values. In the Tb.n parameter, GP.PROB presented higher values. For trabecular thickness (Tb.Th) there was a statistical difference between GC and GP and between GC and GP/PROB, with GC showing higher values in both cases. For bone loss in the furcation, there was a statistical difference between the CG and the other groups, with the CG having lower values of bone loss. Regarding the small intestine, there was no statistical difference between the groups. We conclude that both the live and inactivated probiotics were not able to inhibit bone loss in the furcation area, nor were they able to act as a modulator of the inflammatory response in the intestine.

Keywords: periodontitis; periodontal disease; probiotics; *B.lactis*; posbiotics; small intestine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.lactis	Bifidobacterium lactis
BV/TV	Fração de volume ósseo
CD	Profundidade de cripta
GC	Grupo Controle
GP	Grupo Periodontite
GP/POSB	Grupo Periodontite com Posbiótico
GP/PROB	Grupo Periodontite com Probiótico
MRS	Ágar de Man Rogosa-Sharpe
Tb. N	Número de trabéculas
P.O tot	Porosidade total
Tb.Sp	Separação de trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular
VH	Altura das vilosidades

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3 PROPOSIÇÃO	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Aspectos éticos	20
4.2 Amostra.....	20
4.3 Experimento.....	20
4.4 Preparação probiótica e pósbiotica.....	21
4.5 Indução da periodontite	22
4.6 Período experimental	23
4.7 Peso dos animais	24
4.8 Eutanásia.....	24
4.9 Análises.....	25
4.9.1 Microtomografia computadorizada.....	25
4.9.2 Análises histomorfométricas de perda óssea	27
4.9.3 Análise histomorfométrica do intestino delgado.....	29
4.9.4 Análise estatística	30
5 RESULTADO	32
5.1 Peso dos animais	32
5.2 Análise de microtomografia computadorizada.....	32
5.3 Análise de histomorfometria de perda óssea	33
5.4 Análise de histomorfometria do intestino delgado	34
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO.....	50

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença crônica, multifatorial, resultante do desequilíbrio entre hospedeiro e microbiota oral, e que é considerada um dos problemas de saúde mais prevalentes em todo o mundo (Dye, 2012). Sua consequência é a perda de tecidos moles e duros que suportam os dentes, podendo levar a perda do próprio dente. O tratamento é extremamente complexo, e está diretamente relacionado com a colaboração do paciente, a condição de sua saúde sistêmica, uso de medicamentos, hábitos deletérios entre outros fatores.

Os probióticos vem sendo considerados e utilizados como terapias alternativas em inúmeras áreas da saúde e, podem ser definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002).

Os mecanismos de ação dos probióticos na cavidade oral ainda não foram totalmente elucidados, contudo aparentam envolver antagonização de compostos microbianos, modificação de pH, influência no sistema imunológico através de mecanismos moleculares e redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Alok et al., 2017; Twetman et al., 2009).

A princípio, os probióticos foram utilizados para modular a microbiota do trato gastrointestinal, por isso, a maioria dos mecanismos de ação propostos em doenças bucais é derivada de estudos gastrointestinais (Islam et al., 2016). Estudos in vivo mostraram que os probióticos podem se aderir às células orais (Messora et al., 2013; Messora et al., 2016; Oliveira et al., 2016) podendo aumentar a expressão de várias proteínas de tight junction (Invernici et al., 2018; Tavertini, Guglielmetti, 2011). Os probióticos também demonstraram interferir na diversidade do biofilme por coagregação com outros microrganismos, impedindo sua adesão ou modulando a resposta de bacteriocinas. (Miyazawa et al., 2011).

Os probióticos mais utilizados atualmente são principalmente dos gêneros *Lactobacillus* ou de espécies de *Bifidobacterium* (Alok et al., 2017). Espécies do gênero *Bifidobacterium* são organismos comumente encontrados na cavidade bucal e sua contagem na cavidade oral já foi associada a saúde periodontal e ao progresso

no tratamento da periodontite (Oliveira et al., 2017). A ingestão de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (*B. lactis*) já apontou redução dos índices gengivais e de placa e redução dos níveis de interleucina no fluido crevicular gengival (Invernici et al., 2018).

B. lactis tem sido alvo de diversos estudos em animais conduzidos por Oliveira et al. (2016, 2017), onde a periodontite é induzida experimentalmente e o probiótico administrado por diversas vias. Esses estudos tiveram como resultado redução de perda ossea alveolar e da perda de inserção além de propriedades imunomodulatórias e antimicrobianas nos grupos que receberam o probiótico.

As pesquisas com probióticos também tem investigado a melhor forma de administração e o melhor veículo, pois isso pode afetar não apenas a viabilidade dos probióticos, o processamento e armazenamento, mas também suas propriedades funcionais (Sanders, Marco, 2010; Oliveira et al., 2022).

Células probióticas inativadas ou frações celulares, conhecidas na literatura como paraprobióticos/probióticos-fantasma/lisados celulares ou posbióticos, também tem sido alvo de pesquisas e têm mostrado benefícios à saúde do hospedeiro (Tavertini, Guglielmetti, 2011). Os posbióticos foram definidos como “preparação de microrganismos inanimados e/ou seus componentes que conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (Miyazawa et al., 2011) ou ainda como "substâncias derivadas depois que microrganismos não estão mais vivos, sendo caracterizados como células inanimadas intactas" (Vinderola et al., 2022). O uso de microrganismos não viáveis tem demonstrado efeito positivo na redução do colesterol, controle de processos alérgicos, modulação da resposta inflamatória e redução da dor visceral em diversos estudos in vivo e in vitro (Chuang, 2007; Sartor, 2008; Adams, 2010).

Contudo, o uso desses micro-organismos inativados no tratamento da periodontite experimental, tem sido demonstrado por estudos in vitro, e in vivo (Moraes et al., 2019; Chen et al., 2020, Santos et al., 2020). Os estudos em humanos e em animais com posbióticos (Moraes et al., 2020; Maekawa et al., 2014; Taguchi et al., 2015; Han et al., 2020), demonstraram baixos níveis de evidências de que seu uso acrescenta algum benefício no tratamento da doença periodontal. Essas fracas evidências podem ser explicadas pela grande diferença entre as metodologias aplicadas, seja na forma de administração do posbiótico ou então pelo modelo de indução de

doenças variadas e, até mesmo pelas diferentes cepas de posbióticos que são utilizadas.

Até onde vai nosso conhecimento não existiam estudos comparando os efeitos de *B.lactis* viável e inativado na periodontite experimental prévios a este. Os posbióticos não apresentam até o presente momento relatos de efeitos colaterais no seu uso, podendo ser uma vantagem ao uso dos probióticos. (Moraes et al., 2022).

Outra vantagem no uso das cepas inativadas é a sua produção e armazenamento que apresentam maior estabilidade do que no caso das cepas ativas (Salminen et al., 2020). Desta forma, a administração de componentes celulares ou metabólitos derivados de probióticos por um método de inativação vem ganhando interesse.

Os veículos de administração podem variar dentre adicionar na água para ingestão, pastilhas para ingestão, administração com leite, irrigações subgengivais e gavagem oral (Oliveira et al., 2022). A gavagem oral consiste em introduzir, através de uma agulha de gavagem, o líquido, no nosso caso o probiótico e posbiótico cultivado em um caldo (MRS) diretamente no esôfago do animal, certificando-se de que o volume total não foi perdido de alguma maneira. A escolha pela gavagem oral deu-se a fim de compreender melhor como, de forma sistêmica, o probiótico e o posbiótico podem influenciar, bem como na região do intestino delgado.

Neste contexto, novos estudos podem ser de grande valor para futuras terapias com probióticos e posbióticos na prevenção, tratamento e controle da doença periodontal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A doença periodontal é caracterizada pela inflamação dos tecidos que circundam os dentes, que compreende os tecidos gengivais, osso alveolar e ligamento periodontal. Essa inflamação é desencadeada por um conjunto de fatores, porém é indispensável a presença de biofilme na região para que ela ocorra (Dye et al., 2012). A destruição desses tecidos acarreta na perda óssea, consequente perda de elementos dentais. Não apenas isso, mas a periodontite está diretamente relacionada com outras problemas sistêmicos e ambientais, como diabetes e tabagismo. A periodontite também tem sido sugerida como fator de risco para doença coronariana, renal crônica, aterosclerose e, até mesmo partos prematuros (Stamatova et al., 2009). O tratamento preconizado envolve a higiene da cavidade oral, bem como instrumentação subgengival a fim de romper e desconstruir o biofilme na estrutura dental.

Contudo, pacientes mais complexos, como pacientes diabéticos descompensados, fumantes ou com baixo índice de higiene, bem como todos combinados, muitas vezes não respondem de forma adequada ao tratamento, necessitando de uma abordagem mais com terapias adjuvantes.

Dessa forma, as terapias adjuvantes que estão sendo buscadas e discutidas, visam melhoras em resultados e no tratamento, acarretando melhora na qualidade de vida do indivíduo. Os antibióticos são muito disseminados e comprovados como terapias adjuvantes, de uso sistêmico na tentativa de fornecer benefícios adicionais quando combinados com intervenção manual, de raspagem e alisamento radicular (Bonito et al., 2005; Santos et al., 2016). Por mais que os antibióticos sejam conceituados como um adjuvante em alguns casos no tratamento das doenças periodontais, os profissionais devem tomar cuidado quanto ao uso exagerado e sem controle e quanto aos efeitos negativos que podem apresentar no corpo humano (Pretzl et al., 2019).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO 2015; Brown, Valiere, 2004) e são terapias adjuvantes que vêm sendo propostas baseadas nos mecanismos de ação que estão sendo

elucidados, mas parecem se apoiar na modulação da resposta do sistema imunológico do hospedeiro, atenuação da expressão de interleucinas induzida por patógenos periodontais em células epiteliais orais e redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. (Stamatova, Meurman, 2009; Sliepen et al., 2009; Twetman et al., 2009).

Os mecanismos de ação dos probióticos estão relacionados com a competição por nutrientes, liberação de moléculas antimicrobianas e aumento dos componentes saudáveis da microbiota do hospedeiro. (Adams et al., 2010). São divididos principalmente entre os *Lactobacillus* e os *Bifidobacterium*. (Alok et al., 2017). Espécies do gênero *Bifidobacterium* são comuns na cavidade oral e já foram utilizados em alguns estudos pré-clínicos combinados com periodontite experimental (Oliveira et al., 2016; Oliveira et al., 2022; Ricoldi et al., 2017; Messori et al., 2013).

Estudo clínico controlado randomizado com a cepa HN019 de *B. lactis* apresentou melhora na imunidade celular em adultos e idosos saudáveis e, recentemente, foi avaliada em conjunto com raspagem e alisamento radicular (RAR), em pacientes com periodontite crônica (Invernici et al., 2018), cujos resultados apresentaram ganho de inserção clínica, melhora no sangramento à sondagem e nos índices de placa, além de maior redução das bolsas periodontais profundas.

Por mais que diversos trabalhos contemplem o uso dos probióticos nas mais variadas formas de administração e das mais variadas cepas existentes, atualmente a Academia Americana de Periodontia e a Federação Europeia de Periodontia (Sanz et al., 2020) não recomenda o uso dos mesmos como uma terapia adjuvante ao tratamento da doença periodontal. Isso se dá pela grande variedade de resultados e conclusões que a literatura apresenta quando se trata do uso de probióticos. Ainda existe uma necessidade de comprovações de mecanismos de ação e formas como o uso dessa terapia pode influenciar na melhora – ou não, de parâmetros periodontais.

Os posbióticos referem-se a micro organismos inativados ou mortos, e conceitos já afirmam que a viabilidade bacteriana não é necessária para atingir todos os efeitos dos probióticos (Adams, 2010; Vinderola et al., 2022). Os posbióticos são mais estáveis e seguros para alimentos e aplicações farmacêuticas do que os probióticos vivos, e de uma maneira geral a perda de viabilidade desses microrganismos se devem pela alteração de sua estrutura através de aplicação de calor (Almada et al., 2016; Barros et al., 2020). As pesquisas com o uso de posbióticos

ainda são escassas, porém alguns resultados como diminuição da produção de citocinas, aumento das imunoglobulinas salivares e diminuição da perda óssea foram encontrados. (Maekawa et al., 2014; Taguchi et al., 2015; Han et al., 2015; Park et al., 2021).

Os efeitos dos posbióticos são diferentes dependendo da cepa utilizada, agindo contra diferentes patógenos (Chen et al., 2020). Em 2020 um trabalho utilizando *L. reuteri* vivo e inativado por calor contra *F. nucleatum* e *A. Actinomycetemcomitans* in vitro demonstrou a redução de ambos os microrganismos quando utilizado a cepa inativada, contudo no caso da cepa ativa apenas *A. Actinomycetemcomitans* apresentou redução no crescimento. O mesmo grupo de pesquisa validou esses resultados utilizando *G. mellonella*. (Santos et al., 2020).

As formas de inativação dos posbióticos podem varias, dentre elas sonicação e alta pressão, que causa danos à estrutura celular (Ananta, Knorr 2009; Shin et al., 2010); radiação, que causa desnaturação das proteínas e danos aos ácidos nucleicos (Van Hoffen et al., 2010); e a mais comum atraves do calor que pode ser por pasteurização ou esterilização, que causa danos à membrana celular, desnaturação de proteínas e inativação de enzimas (Kamiya et al., 2015; Ben Othman, Sakamoto, 2020).

Os posbióticos aparentam ser úteis na prevenção de tratamento por infecções por SARS-CoV-2, pois sua estrutura e atividade metabólica do microbioma intestinal podem estar relacionados à alguns biomarcadores que preveem o curso da gravidade da infecção por coronavírus (Gou et al., 2020).

No trato gastrointestinal, probióticos específicos são capazes de estimular a produção de mucinas, que formam uma camada que impede a adesão de patógenos e diminui a permeabilidade da barreira epitelial, diminuindo a imune estimulação induzida por bactérias. O seu papel na manutenção da homeostase oral vem ganhando destaque ao longo dos anos (Pujia et al., 2017). Em vários estudos, foi demonstrado que a administração adjunta de probióticos pode melhorar a saúde oral, como no tratamento de cáries dentárias, halitose e doença periodontal (Beighton et al., 2005; Meurman et al., 2005; Krasse et al., 2006; Hatakka et al., 2007; Bustamante et al., 2019).

O trato gastrointestinal permite absorção de água e nutrientes, e cada região tem características individuais. O intestino delgado é coberto por vilosidades e

microvilosidades, para aumentar a superfície de absorção. O duodeno, menor região do intestino delgado continua fazendo o trabalho do estômago, adicionando sucos digestivos ao bolo alimentar para que no jejuno seja reabsorvido água e nutrientes mais importantes, como aminoácidos e açúcares. No íleo, região final do intestino delgado é onde acontece a absorção de vitaminas, como a B12 (Farré et al., 2020).

A microbiota intestinal é composta por mais de 250 espécies diferentes de bactérias, fungos e vírus (Rinninella et al., 2019) formando a maior microbiota o corpo humano que pode ser rapidamente alterada e afetada quando medicamentos, dietas e outros fatores ambientais entram no sistema do hospedeiro (Wilson et al., 2020). Um desequilíbrio na composição das comunidades microbianas intestinais, ou seja, disbiose intestinal, pode ser associada com doenças como obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (Patterson et al., 2016).

3 PROPOSIÇÃO

Esse projeto teve como objetivo avaliar a ação in vivo de *Bifidobacterium lactis* HN019 em ratos adultos com periodontite induzida por meio de ligadura, utilizando a cepa viva e a cepa inativada através do calor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais experimentais ICT- UNESP-SJC sob o número 06/2022 e está de acordo com ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiment). Todos os procedimentos propostos seguiram as normas vigentes do Conselho Nacional de Controle Animal (CONCEA).

4.2 Amostra

Baseado em Festing et al. (2017), o tamanho da amostra de 8 animais por grupo foi determinado a partir do estudo de Oliveira et al. (2017), para fornecer 80% de poder para reconhecer diferenças significativas entre os grupos com intervalo de confiança de 95%, considerando as médias e desvios padrão da porcentagem de volume ósseo na área de furca (volume ósseo [BV])

4.3 Experimento

Foram utilizados 32 ratos Wistar machos adultos (*Rattus norvegicus*, *albinus*), com 3 meses de idade, pesando 200 a 350g provenientes do biotério Central de Botucatu da UNESP, São Paulo, Brasil. Os ratos foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas com temperaturas entre 22°C e 24°C e alimentados com dieta sólida selecionada e água ad libitum.

Os animais foram aclimatados por quatorze dias antes do início do estudo e foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

-Grupo controle – GC (n = 8): Animais sem periodontite que receberam Caldo MRS.

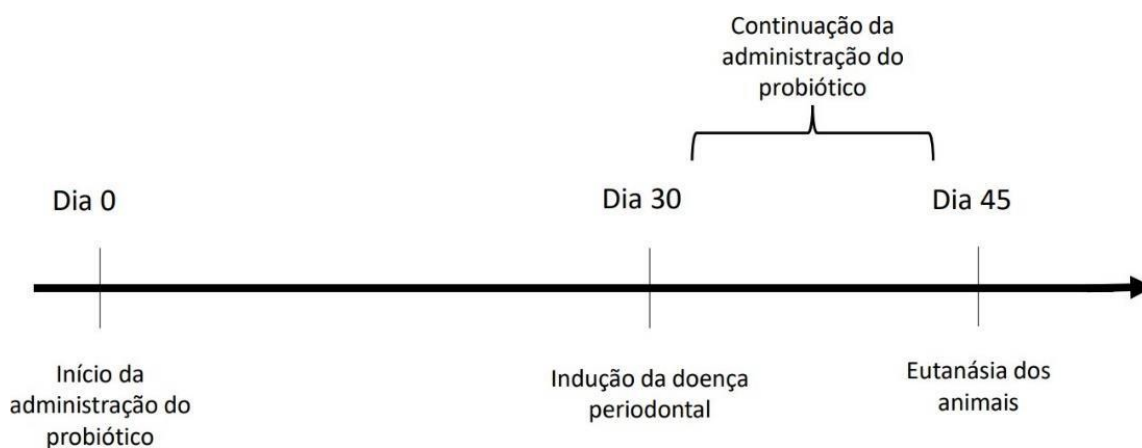
-Grupo Periodontite experimental – GP (n = 8): Animais com periodontite induzida por ligadura que receberam Caldo MRS.

-Grupo periodontite experimental + probiótico – GP/PROB (n = 8): Animais com periodontite induzida por ligadura que receberam administração oral de *B. lactis* (HN019) vivo.

-Grupo periodontite experimental + pósbióticos – GP/POSB (n = 8): Animais com periodontite induzida por ligadura que receberam administração oral de *B. lactis* (HN019) inativado.

Para os grupos GC e GP, 300 µL de caldo MRS foram administrados por via oral. Para o grupo GP/PRO, $1,2 \times 10^9$ UFC/300 µL (Moraes et al., 2020) de *B. lactis* foram administrados, enquanto para o grupo GP/POSB, a mesma quantidade de *B. lactis* inativado pelo calor foi usada. O tratamento foi administrado por 30 dias antes da indução da periodontite e continuado por 15 dias até a eutanásia (Messora et al., 2013, 2016). Como representado na figura 1.

Figura 1 – Linha do tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Preparação probiótica e pósbiótica

Para este estudo, utilizou-se o probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* HN019 (Ache, Brasil) sendo o conteúdo de uma cápsula colocado para crescer no caldo MRS estéril em anaerobiose em 37°C durante 24h. Em seguida foi cultivado em Ágar De Man Rogosa-Sharpe (MRS) incubadas a 37°C durante 72h. Colônias características foram isoladas e a confirmação morfológica foi realizada após coloração de Gram. Foram realizadas suspensões do microrganismo em caldo MRS, que foram padronizadas em espectrofotômetro com 625NM de comprimento (Oliveira et al., 2016).

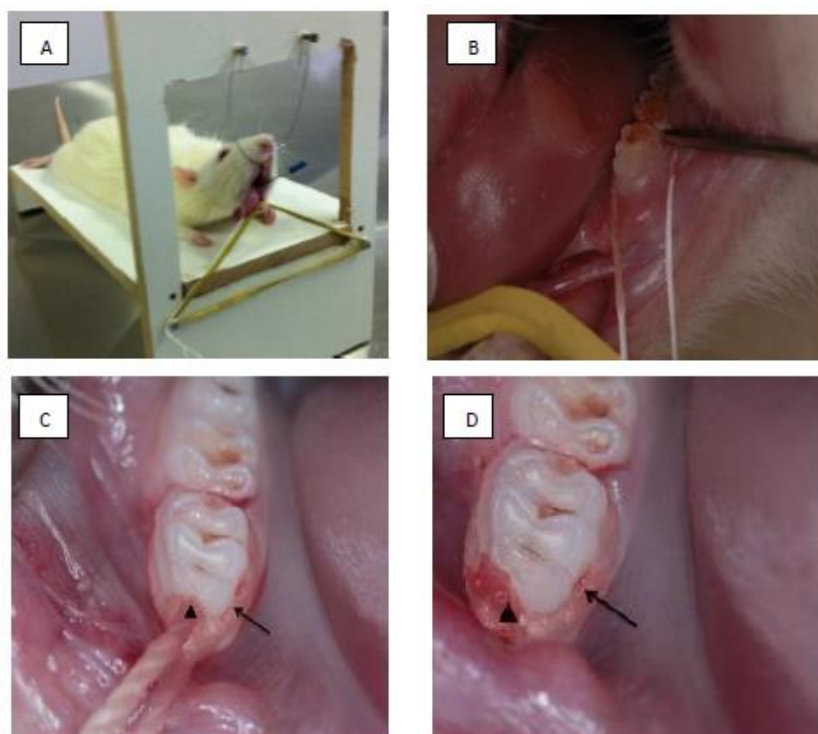
Para a preparação posbiótica essa suspensão final padronizada foi autoclavada a 1270 °C por 15 min e posteriormente foi semeada em ágar MRS para garantir que não restavam células viáveis (Moraes et al., 2020).

4.5 Indução da periodontite

Para a indução da periodontite experimental, os animais foram anestesiados com solução de 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de anestésico à base de cetamina de 100 mg/Kg (Dopalen), via intramuscular. Os animais foram imobilizados em dispositivo apropriado para manter a boca aberta e, em seguida, uma volta de fio 100% algodão foi inserida em torno dos primeiros molares inferiores dos animais. O nó do fio permaneceu na superfície mesial do dente (Figura 2). A ligadura foi mantida até a eutanásia (Klausen et al., 1991; Messora et al., 2013, 2016; Oliveira et al., 2022).

Os animais do grupo controle foram apenas anestesiados e manipulados para simular o estresse cirúrgico. Após o procedimento, os animais foram monitorados e mantidos em ambiente com temperatura controlada (360 –370 °C) até acordarem completamente. Por ser um procedimento que gera dor leve, a analgesia foi realizada com administração oral de dipirona 25mg/kg uma vez ao dia durante 3 dias.

Figura 2 – Confeção d ligadura



Legenda: Passo a passo da elaboração da ligadura. A- Suporte para posicionamento do animal B- introdução do fio na proximal do dente, com auxílio de um espaçador. C- Nó realizado na face mesial do dente. D- Fio cortado e a ligadura em posição. ▲ nó da ligadura na região mesial, (→) ligadura em íntimo contato com o sulco gengival. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Período experimental

Todos os 32 animais durante 30 dias seguidos, receberam durante o período da manhã através de gavagem o probiótico vivo, inativado ou caldo MRS, referente a cada grupo. O procedimento da gavagem foi realizado por dois pesquisadores, sendo que um imobilizava o animal e o outro ficava responsável por manusear a seringa. No dia 30 do experimento, os três grupos (GP, GP/PROB e GP/POSB) foram submetidos a indução da periodontite através da colocação da ligadura. Durante os 15 dias seguintes à colocação da ligadura, a aplicação da gavagem continuou, até o dia 45, quando foi realizada a eutanásia. Em todos os parâmetros analisados foi confirmado o sucesso da indução da periodontite por meio da ligadura. Todos os animais foram pesados no início do experimento, imediatamente antes da inserção da ligadura e no

dia da eutanásia.

4.7 Peso dos animais

Os animais foram pesados em três momentos: 1) Baseline: no primeiro dia da administração do probiótico e posbiótico; 2) Dia 30: No dia da inserção da ligadura; 3) Dia 45: no dia da eutanásia. Os valores foram tabulados e analisados nos resultados.

4.8 Eutanásia

No dia 45, os 32 animais foram eutanasiados sendo anestesiados com dose tripla de cloridrato de xilazina 2% (10mg/kg) e cetamina 10% (100mg/kg), ocasionando depressão do sistema nervoso central, que foi confirmada pelo teste de sensibilidade à dor, realizando uma pressão nas patas do animal com uma pinça ou com os próprios dedos e, em seguida foram decapitados. Foram retiradas as duas hemi-mandíbulas e três partes do intestino delgado, duodeno, jejuno e íleo.

As hemi-mandíbulas foram colocadas em formol 10% em recipientes separados e identificados referente ao animal e ao grupo. Após 48h o formol foi substituído por ácido fórmico 10% nas mandíbulas direitas, para que fosse realizada adescalcificação e posterior análise histomorfométrica. As mandíbulas esquerdas, após 48h, foram colocadas em álcool 70%, para a posterior realização da Microtomografia CT.

As partes dos intestinos foram colocadas em cassetes identificados e colocados em grandes potes de vidro com formol 10%, separados por grupos. Após 48h, o formol 10% foi substituído por álcool 70% em todos os recipientes. A carcaça e os órgãos não utilizados foram descartados em lixo branco leitoso identificados para material de risco biológico/material infectante, sendo dispensados em ambiente apropriado para coleta.

4.9 Análises

4.9.1 Microtomografia computadorizada

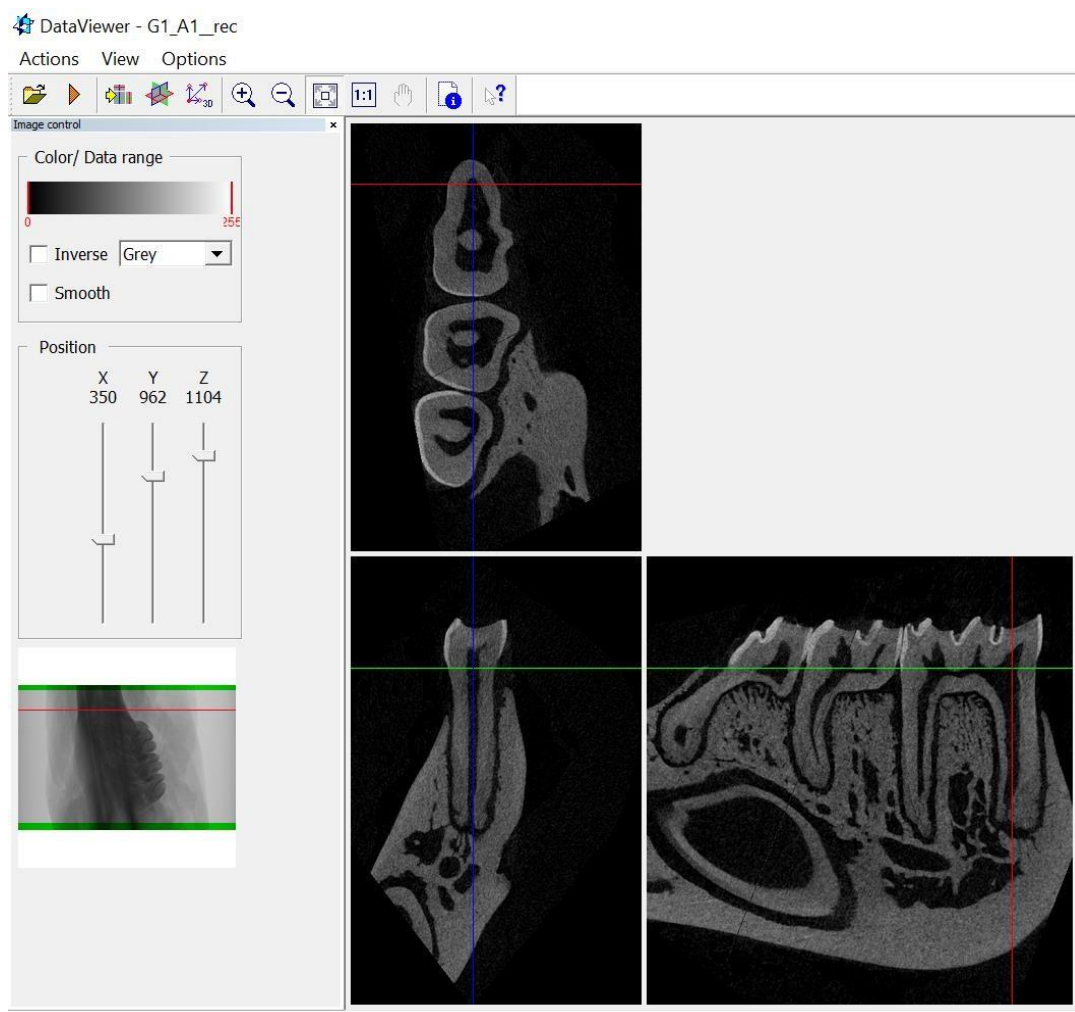
Após a decapitação, as hemimandíbulas foram removidas, catalogadas e armazenadas em solução de paraformaldeído a 10% tamponado, permanecendo nesta solução por 48 horas e em seguida transferidos para álcool 70% para a realização da microtomografia. Foram escaneadas em um micro tomógrafo SkyScan 1176 da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, e posteriormente, foi realizada a reconstrução das peças no programa NRecon.

Após a reconstrução, através do programa CTAnalyzer, a região de interesse em cada peça foi selecionada e realizada a análise das propriedades do tecido ósseo. As imagens da tomografia microcomputadorizada foram utilizadas para análise das alterações no osso alveolar na região da furca e foram avaliadas segundo Moraes et al. (2020), sendo analisados os seguintes parâmetros de microarquitetura:

- fração de volume ósseo (BV/TV),
- número de trabéculas (Tb. N)
- separação trabecular (Tb. Sp)
- espessura trabecular (Tb. Th)
- porosidade total (PO-tot).

Para esta análise, primeiramente as imagens já reconstituídas pelo programa NRecon passaram pelo programa DataViewer. Nesse passo, as imagens foram orientadas de forma clara, em três cortes diferentes, evidenciando a região de interesse para o estudo, o primeiro molar inferior, na região de furca (Figura 3).

Figura 3 – Processamento das imagens



Legenda: Imagem ilustrativa do posicionamento das imagens no programa DataView Fonte: Elaborado pelo autor.

Depois que todas as imagens foram orientadas de forma correta, foram colocadas no programa CTan para que a área de interesse fosse devidamente selecionada. A cada 10 tomogramas foi padronizada uma região de interesse (ROI) tridimensional, definida pelo polígono limitado entre as raízes mesial, distal, vestibular e lingual do primeiro molar além da furca (limite coronário) e mais 160 tomogramas no sentido do ápice. (Figura 4).

Figura 4 – Imagem ilustrativa da delimitação da área de interesse (ROI)



Legenda: Imagem ilustrativa da delimitação das áreas de interesse percorrendo o trajeto até próximo à apical.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9.2 Análises histomorfométricas de perda óssea

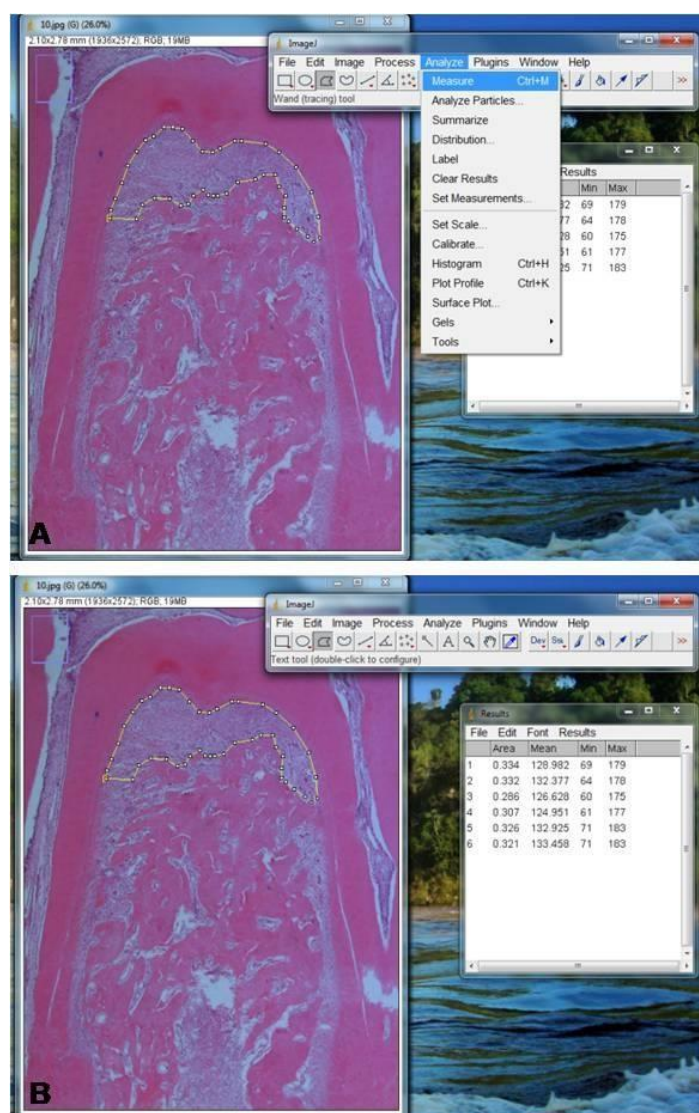
Para a avaliação histológica, as hemimandíbulas foram descalcificadas em solução de ácido fórmico e incluídas em parafina. Seções de cinco micrômetros de espessura foram cortadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). A perda óssea alveolar na área de furca foi analisada conforme descrito Ferreira et al. (2018).

As imagens dos cortes histológicos selecionados foram capturadas em aumento de 50x, utilizando o microscópio Axioplan 2 e o programa Axiovision Rel 4.7. Antes do início das medidas as imagens foram renomeadas para o devido cegamento do examinador. As imagens foram analisadas pelo programa Image J 1.49v, obtido

por domínio público, <http://imagej.nih.gov/ij>.

A área da perda óssea medida (mm²) equivale ao espaço ocupado pelo ligamento periodontal e perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior. Foram medidos 10 cortes semi sequenciais dessa região em cada espécime e posteriormente, calculado a média para cada espécime. Com a ferramenta “Polygon selections” a área de perda óssea em mm² foi demarcada, e mensurada em “Analyse”, “Measure”. (Figura 5).

Figura 5 – Imagem ilustrativa das medidas de área de furca



Legenda: Mensuração da área de furca. A: Demarcação da região avaliada. B: Resultado observado em cada imagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

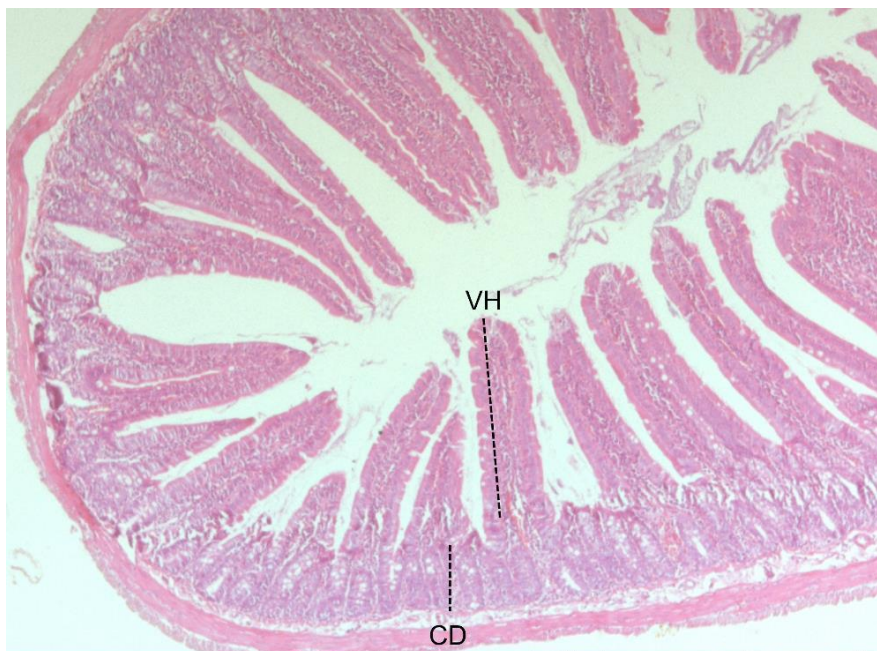
4.9.3 Análise histomorfométrica do intestino delgado

Duodeno, jejuno, e íleo foram coletados e fixados em formalina neutra a 10% por 48 horas. As amostras foram processadas rotineiramente e incluídas em parafina. Cortes semi-seriados, com 6µm de espessura, foram obtidos. Os cortes foram corados com H&E para análise por microscopia de luz.

As imagens dos cortes histológicos selecionados foram capturadas em aumento de 50x, utilizando o microscópio Axioplan 2 e o programa Axiovision Rel 4.7. Antes do início das medidas as imagens foram renomeadas para o devido cegamento do examinador. As imagens foram analisadas pelo programa Image J 1.49v, obtido por domínio público, <http://imagej.nih.gov/ij>. (ImageJ 1.31p. National Institutes of Health, Bethesda, MD, US).

As medições foram realizadas de acordo com o método utilizado por Messoria et al. (2013), a altura das vilosidades (VH) foi estimada medindo-se a distância vertical da ponta das vilosidades ao nível da junção vilosidade-cripta para 10 vilosidades por seção; a profundidade da cripta (CD) foi estimada medindo-se a distância vertical da junção vilo-cripta até o limite inferior da cripta para 10 criptas correspondentes por seção. Os valores de VH e CD para duodeno, jejuno e íleo de cada animal foram representados pelos valores médios dos três cortes histológicos (Figura 6).

Figura 6 - Imagem ilustrativa das medidas de vilosidades e de profundidade de criptas – Secção do Duodeno



Legenda: Secção do intestino com demarcação da medida utilizadas para vilosidades (VH) e para criptas (CD).
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.9.4 Análise estatística

Os resultados obtidos pelo experimento foram tabulados e submetidos a análise estatística. Foi empregado o teste Shapiro-Wilk para investigar a distribuição normal e então, testes comparativos foram realizados. Os dados BV/TV e P.O total, apresentaram normalidade e se foram submetidos ao teste ANOVA para análise de variância, seguido pelo teste Tukey. Os dados dos parametros: número de trabéculas (Nº TB); separação das trabéculas (SP.TB); espessura das trabéculas (TH.TB) não apresentaram normalidade e foram submetidos ao teste não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltiplas de Dunn. A área em mm² de perda óssea na região de furca também foi analisada pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltiplas de Dunn Para o intestino, os testes realizados foram os de normalidade e realizado o teste ANOVA e Tukey para

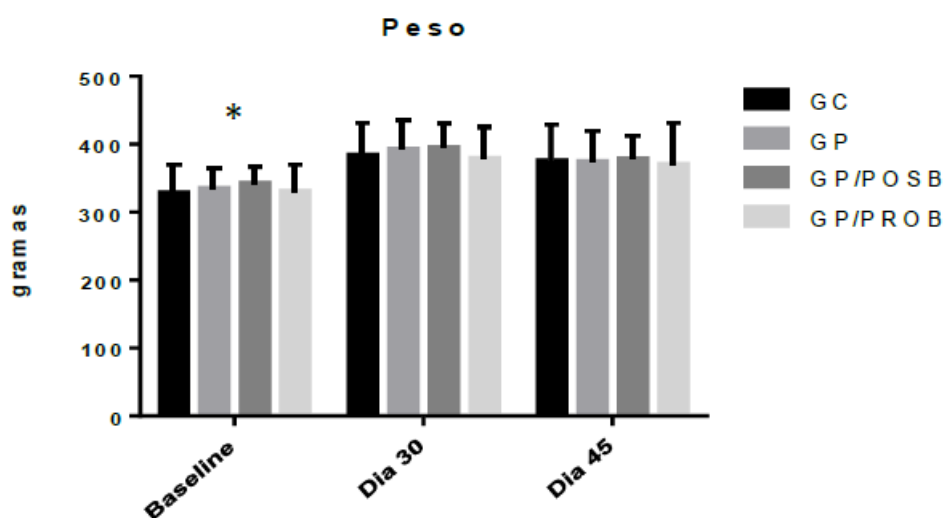
Duodeno e Íleo. Para o Jejuno foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que não houve normalidade dos dados. Para a análise dos dados de peso dos animais foi realizado o teste ANOVA de dois fatores e Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância adotado para todas as comparações foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADO

5.1 Peso dos animais

Após a análise estatística de porcentagem de ganho de peso entre os dias do experimento (0, 30 e 45), verificou-se diferença estatística entre os grupos (Figura 7). A variação de tempo entre os dias 0 e 30 e os dias 0 e 45 apresentou diferença estatística, sendo que o dia 0 apresentou menores valores de peso quando comparado com as outras datas de análise.

Figura 7 - Representação gráfica da variação de peso



Legenda: Gráficos de médias e desvios-padrão dos valores de variação de peso dos animais em relação ao passar do tempo do experimento. * $p < 0,05$. O símbolo * representa a data com diferença estatística.

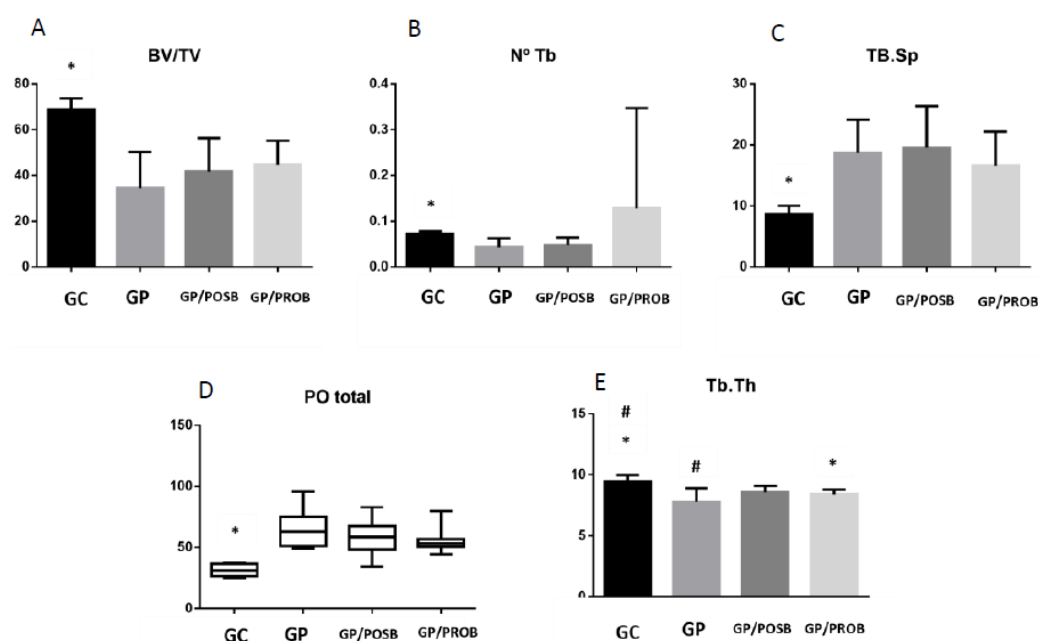
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Análise de microtomografia computadorizada

Na análise de microCT avaliamos cinco parâmetros: BV/TV, Tb.N; Tb.Sp; PO total e Tb.Th. Para os parâmetros de BV/TV, número de trabéculas, separação das trabéculas e porosidade total houve diferença estatística entre o GC e os demais grupos, GP, GP/POSB e GP/PROB. Para o parâmetro de BV/TV o grupo controle apresentou valores maiores quando comparado com os outros grupos. Para os parâmetros de Tb.N, Tb.Sp e PO total o grupo controle apresentou valores menores quando comparado com os outros grupos. Ou seja, o volume ósseo foi maior no grupo controle e, número de trabéculas ósseas, a separação das trabéculas ósseas e a porosidade total do osso foram menores no grupo controle.

No parâmetro de espessura de trabéculas houve diferença estatística entre o GC e os grupos GP e o GC e GP/PROB, sendo que o GC apresentou maiores valores. (Figura 8)

Figura 8 - Representação gráfica das análises de Microtomografia Computadorizada



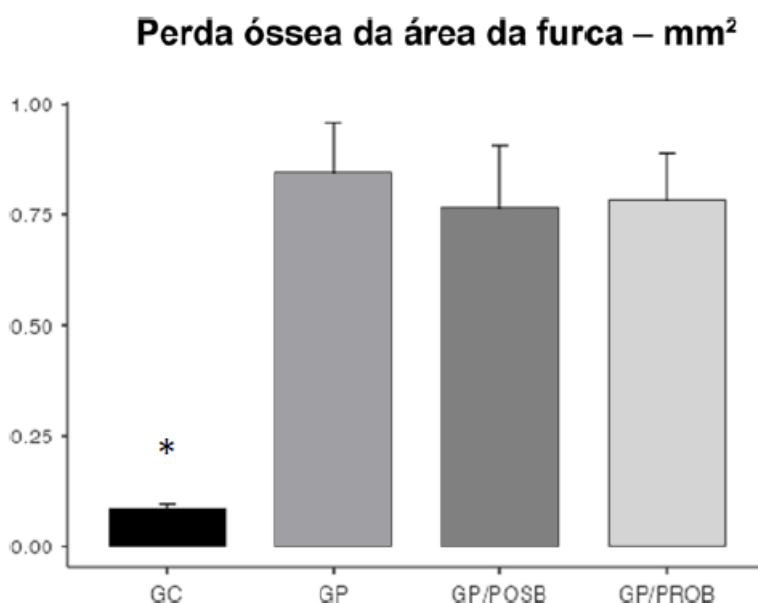
Legenda: Gráficos de médias e desvios-padrão dos valores de BV/TV (A), Tb.N (B), Tb. Sp (C), Tb.Th (E), e box-plot de Po.Total, (D). * $p < 0,05$. Os símbolos * e # representam os grupos com diferença estatística quando comparados com o grupo controle;

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Análise de histomorfometria de perda óssea

Os valores referentes a análise histomorfométricas na área de furca para a perda óssea no GC apresentou menor perda óssea estatisticamente significativamente, em relação aos grupos testados GP, GP/PROB e GP/POSB, os quais não apresentaram diferença estatística entre eles (Figura 9).

Figura 9 - Representação gráfica da perda óssea na região de furca



Legenda: Gráfico de média e desvio-padrão do valor de perda óssea da área de furca. O símbolo * representa o grupo com diferença estatística. *p<0,05.
Fonte: Elaborada pelo autor.

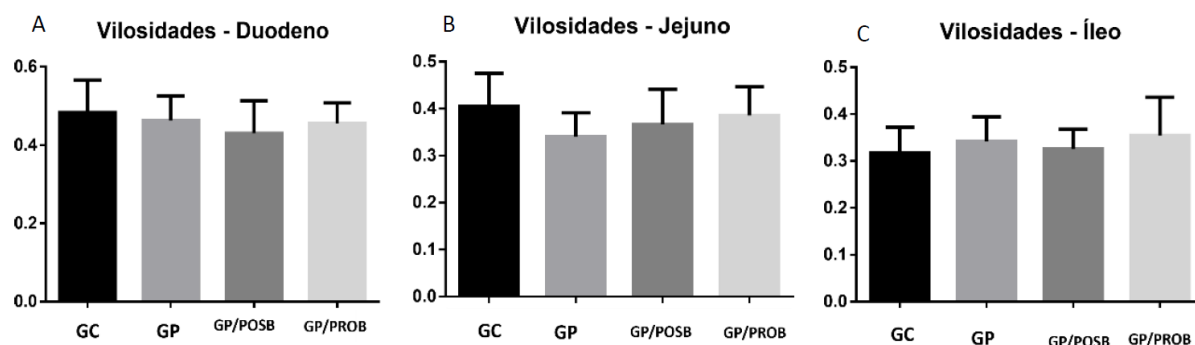
5.4 Análise de histomorfometria do intestino delgado

As análises de histomorfométricas do intestino delgado foram feitas, para a altura de vilosidades (VH) e para a profundidade das criptas (CD). Foram analisadas separadamente para as secções do duodeno, do jejuno e do íleo, e também agrupadas, como intestino delgado.

Para os valores referentes ao tamanho das vilosidades das três secções do

intestino os resultados não apresentaram diferença estatística entre os grupos. (Figura 10)

Figura 10 - Representação gráfica de altura de vilosidades

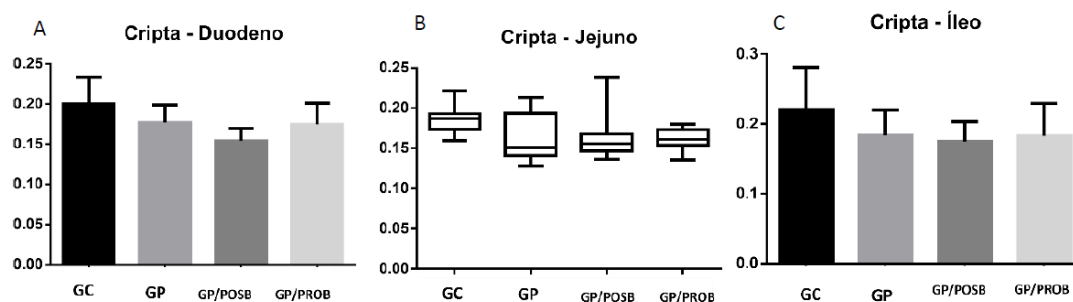


Legenda Gráficos de média e desvio-padrão dos valores referentes à altura de vilosidades no intestino delgado por secção: Duodeno (A), Jejunum (B) e Íleo (C). O símbolo * representa o grupo com diferença estatística. * $p < 0,05$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os valores referentes à profundidade das criptas (CD) das três secções do intestino delgado, no íleo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No duodeno, houve diferença estatística entre os grupos GP e GP/POSB, sendo que nesse caso os maiores valores de profundidade de cripta foram do grupo com doença periodontal (GP). Para a secção do Jejunum, houve diferença entre os grupos, porém o teste de Dunn não mostrou a diferença a diferença. (Figura 11)

Figura 11 - Representação gráfica da profundidade de criptas

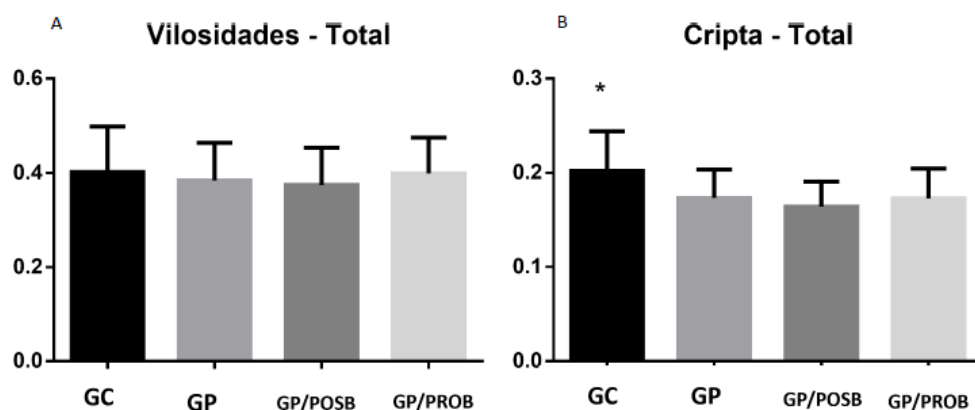


Legenda: Gráficos de média e desvio-padrão dos valores referentes à profundidade de criptas no intestino delgado por secção: Duodeno (A), Jejunum (B) e Íleo (C). O símbolo * representa o grupo com diferença estatística. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em uma segunda análise, os valores das três secções foram agrupados e realizado o teste estatístico para as vilosidades (VH) e para as criptas (CD). Em relação as vilosidades, não houve diferença estatística entre os grupos, enquanto para as criptas o GC apresentou diferença estatisticamente significativa com os grupos testados GP, GP/PROB e GP/POSB, obtendo maiores valores de profundidade de cripta no grupo controle. (Figura 12).

Figura 12: Representação gráfica do intestino delgado



Legenda: Gráficos de média e desvio-padrão dos valores referentes à altura de vilosidades e profundidade de criptas no intestino delgado, sendo em A – vilosidades e em B – Criptas. O símbolo * representa o grupo com diferença estatística. * $p < 0,05$

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

As doenças bucais são um grande problema de saúde pública da maioria dos países no mundo (OMS). A doença periodontal, sexta doença mais prevalente do mundo (Genco et al., 2020), inflamatória e crônica danifica os tecidos de suporte dos dentes e é a maior contribuinte para a mobilidade e posterior perda dentária. A correta e constante higiene da cavidade oral é a melhor prevenção e controle para o surgimento e agravamento das doenças periodontais (Sanz et al., 2020). Os microrganismos presentes nas doenças periodontais, também produzem reações sistêmicas no organismo do hospedeiro (Duque et al., 2020).

Atualmente muito fala-se em abordagens preventivas para as doenças periodontais, pela impossibilidade de cura e pela alta dificuldade de estabilização da doença, principalmente em casos mais graves, como pacientes fumantes e diabéticos. (Genco et al., 2013).

O tratamento padrão ouro ainda é a instrumentação subgengival, porém pacientes com formas mais graves da doença, com fatores modificadores atenuados ou ainda pacientes com doença mais avançada não respondem tão bem ao tratamento, estabelecendo a necessidade de outras intervenções, como as terapias adjuvantes (Teughels et al., 2020).

Estudos já demonstraram que cepas probióticas vivas ou ainda pequenas frações desses mesmos microrganismos podem apresentar diferentes reações imunes e, também cepas probióticas inativadas estimulam respostas imunes do hospedeiro. Além disso, estudos já demonstraram que a viabilidade bacteriana não é um requisito essencial para conferir benefícios à saúde, por isso a utilização de cepas inativadas, os paraprobióticos ou posbióticos, estão cada vez mais disseminadas (Cuevas-González et al., 2020).

Ainda não existe, pelo menos ao nosso conhecimento, estudos com cepa inativada do *Bifidobacterium lactis*, porém outros probióticos, como *Lactobacillus.reuteri* já foi utilizado em estudos pré-clínicos comparando cepas ativas e inativas por calor (Moraes et al., 2020). Os resultados foram promissores para o uso do pósobótico, o que nos levou a utilizar o *B. lactis* inativado.

Nesse contexto, buscamos compreender os efeitos do *B.lactis* ativo e

inativado como um adjuvante na periodontite experimental, buscando entender seu poder de ação na diminuição da destruição óssea na região de furca.

A forma mais comum de inativação de uma cepa probiótica é através do calor, por pasteurização ou esterilização. No caso do presente estudo, utilizamos o método de esterilização, que resulta em danos e ruptura de filamentos de DNA, membranas, inativação de enzimas e perda de nutrientes (Almada et al., 2016; Ou et al., 2011). Como forma de comprovação da inativação, após a esterilização o probiótico foi semeado em uma placa de ágar e verificado após 3 dias para comprovação de que nenhuma colônia cresceria. Dessa mesma forma, Moares em 2020 realizou a esterilização do *L.reuteri* e utilizou a cepa inativada no tratamento da periodontite experimental, analisando parâmetros de perda óssea através de análises histomorfométricas e de microCT.

O método da ligadura não apresentou danos ao crescimento dos animais, o que pode ser confirmado pelo peso dos grupos com o passar do tempo. Os animais ganharam peso desde o primeiro dia de experimento, não sendo afetados pelo uso da ligadura.

Oliveira (2016) demonstrou que a utilização de *B.lactis* ativo na periodontite experimental em ratos resultou em uma diferença na perda óssea em região de furca quando comparado grupos com doença e grupos com doença e intervenção do probiótico. Contudo, a metodologia utilizada difere do presente trabalho, pois foi utilizada a administração do probiótico através de irrigação subgengival na região da ligadura. No nosso estudo a forma de administração foi por gavagem 1 vez ao dia. Essa diferença na forma de administração do probiótico pode explicar os resultados divergentes que encontramos, já que no presente estudo a perda óssea na região da furca não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com periodontite experimental, com e sem tratamento.

Embora a cepa ativa do *B.lactis* tenha se mostrado efetiva na diminuição da perda óssea na região de furca em outros estudos pré-clínicos (Oliveira et al., 2016, 2017; Ricoldi et al., 2017; Cardoso et al., 2020) no presente estudo, parâmetros avaliados por microCT não apresentaram melhora quando utilizado o probiótico. A espessura de trabéculas ósseas avaliada foi o único parâmetro que demonstrou diferença entre o grupo controle GC e o grupo GP/PROB, em que o *B.lactis* ativo foi administrado, apresentando uma espessura maior de trabéculas quando comparado

com o controle. Os outros parâmetros avaliados, como BV/TV, Tb.N, Tb.Sp., e P.O total não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Já em outro estudo de 2020 com o *B.lactis* (Cardoso et al., 2020), o parâmetro de porosidade total apresentou melhores resultados no grupo com administração de probiótico do que no grupo de periodontite sem intervenção. Porém, nesse estudo a administração do probiótico foi combinada com intervenção de raspagem e alisamento radicular, além de que o probiótico foi administrado de forma oral com leite, pontos que diferem da nossa metodologia.

Bactérias da cavidade oral podem se locomover através da circulação sistêmica e atingir todas as regiões do corpo do hospedeiro, incluindo o intestino. Estudos já demonstraram que periodontite induzida por ligadura, leva a disseminação bacteriana para fígado e baço (Tsukasaki et al., 2018) e *Streptococcus* spp já foram detectadas no intestino, comprovando essa locomoção cavidade oral-intestino (Schmidt et al., 2019).

O consumo de probióticos afeta o ambiente microbiano do intestino delgado e, isso sugere que os probióticos tendem a ter um impacto nessa região (Darrien et al., 2015). Contudo, a ação desses probióticos tende a ser passageira, pois são transitórios na região (Zhang et al., 2016). Judskin et al em 2020 defendeu que podemos entender que os probióticos tendem a corrigir possíveis disbioses intestinais e melhorar problemas de absorção de nutrientes, porém mais pesquisas precisam compreender melhor a eficácia deles em regiões do intestino delgado.

Recentemente, Kitamoto, Kamada (2022) reafirmaram que mecanismos detalhados da relação entre a periodontite e a microbiota intestinal ainda precisam ser mais bem compreendidos, porém a detecção precoce de doenças periodontais pode ajudar a identificar pacientes com síndrome inflamatória intestinal.

Compreendendo os mecanismos pelos quais a cavidade oral, a doença periodontal e o intestino estão interligados, buscamos elucidar se a ingestão de probióticos e posbióticos influenciaria de alguma forma nas vilosidades e consequente absorção realizada pelo intestino delgado. Entretanto, com os resultados obtidos pela análise de histomorfometria constatamos que não houve diferença estatística significativa entre as alturas de vilosidades entre os quatro grupos avaliados. Para a profundidade de criptas, apenas para o jejuno o resultado apresentou diferença significativa, porém não detectado pelo programa utilizado. Quando agregamos as

secções como um único intestino delgado, o resultado demonstrou uma diferença para a região das criptas quando comparados o GC com os outros grupos com doença, sem diferença entre as intervenções realizadas. Um estudo realizado em 2013 demonstrou que, a administração de probiótico em ratos com periodontite experimental apresentou uma proteção do intestino quando comparado com animais que não receberam o probiótico (Messora et al., 2013). Entretanto, a metodologia aplicada corresponde a adição do probiótico *Bacillus subtilis* CH201 na água diária dos animais. Duas diferenças significantes na metodologia que podem influenciar nos achados quando comparados com o presente trabalho.

Nesse trabalho utilizamos o *B.lactis* em duas formas, vivo e inativado, na periodontite experimental sem intervenção de raspagem e alisamento radicular. A utilização da cepa inativada foi uma abordagem pioneira na área, na tentativa de compreender como a cepa se comportaria. Os mecanismos pelos quais os probióticos agem ainda estão sendo elucidados e, por esse motivo qualquer mudança pode influenciar os resultados. Nosso trabalho utilizou o método de gavagem para administração ao animal, porém outros estudos (Messora et al., 2013; Oliveira et al., 2016; Ricoldi et al., 2017; Cardoso et al., 2020) utilizaram formas de administração que possibilitaram o contato do probiótico na cavidade oral. Essa diferença pode ser importante para auxiliar o probiótico na ação local, na região da ligadura. Outro ponto a ser levado em consideração é o veículo de administração, que no presente estudo foi o caldo MRS em que o microrganismo cresceu, porém, um estudo atual (Oliveira et al., 2022) apontou que quando administrado com leite em comparação com água, os resultados são mais satisfatórios.

Além disso, outras metodologias divergentes são encontradas na literatura, quanto ao período de administração, a dose, a frequência e a forma (Invernici et al., 2018; Cardoso et al., 2020; Oliveira et al., 2017) que podem influenciar nos achados finais, como por exemplo outras formas de administração como oral ou ainda irrigação local, e até mesmo a combinação de intervenção como raspagem e alisamento radicular, a fim de buscar novos resultados.

7 CONCLUSÃO

Podemos concluir que tanto o probiótico vivo como o inativado não foram capazes de atuar na inibição da perda óssea na área de furca e nem de agir como modulador da resposta inflamatória no intestino.

REFERÊNCIAS

Adams CA. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev.* 2010 Jun;23(1):37-46. doi: 10.1017/S0954422410000090. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20403231.

Allam-Ndoul B, Castonguay-Paradis S, Veilleux A. Gut Microbiota and intestinal trans-epithelial permeability. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 3;21(17):6402. doi: 10.3390/ijms21176402. PMID: 32899147; PMCID: PMC7503654.

Alok A, Singh ID, Singh S, Kishore M, Jha PC, Iqbal MA. Probiotics: A new era of biotherapy. *Adv Biomed Res.* 2017 Mar 7;6:31. doi: 10.4103/2277-9175.192625. PMID: 28401078; PMCID: PMC5360003.

Amaretti A, di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Jan;97(2):809-17. doi: 10.1007/s00253-012-4241-7. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22790540.

Ananta E, Knorr D. Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiol.* 2009 Aug;26(5):542-6. doi: 10.1016/j.fm.2009.01.008. Epub 2009 Feb 9. PMID: 19465252.

Barros CP, Guimarães JT, Esmerino EA, Duarte MCKH, Silva MC, Silva R, et al. Paraprobióticos e pós-bióticos: conceitos e potenciais aplicações em produtos lácteos. *Curr. Opin. Food Science.* 2020; 32: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.003>.

Beighton D. A microflora oral complexa de indivíduos e grupos de alto risco e seu papel no processo de cárie. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33:248-55.

Ben Othman M, Sakamoto K. Effect of inactivated *Bifidobacterium longum* intake on obese diabetes model mice (TSOD). *Food Res Int.* 2020 Mar;129:108792. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108792. Epub 2019 Nov 21. PMID: 32036897.

Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(2):160-74. doi: 10.1159/000342079. Epub 2012 Oct 2. PMID: 23037511.

Bonito AJ, Lux L, Lohr KN. Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review. *J Periodontol.* 2005 Aug;76(8):1227-36. doi: 10.1902/jop.2005.76.8.1227. Erratum in: *J Periodontol.* 2006 Feb;77(2):326. Erratum in: *J Periodontol.* 2006 Feb;77(2):326-327. PMID: 16101353.

Cardoso RS, Messora MR, Silva PHF, Oliveira LF, Leite-Panissi C, Salvador S, et al. Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis. *Benef Microbes*. 2020 Feb 19;11(1):33-46. doi: 10.3920/BM2019.0038. Epub 2019 Dec 17. PMID: 32066256.

Chen YT, Hsieh PS, Ho HH, Hsieh SH, Kuo YW, Yang SF, et al. Antibacterial activity of viable and heat-killed probiotic strains against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 2020 Apr;70(4):310-317. doi: 10.1111/lam.13275. Epub 2020 Feb 11. PMID: 31955445.

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 Dec 26;55(26):11080-6. doi: 10.1021/jf071786o. Epub 2007 Nov 27. PMID: 18038979.

Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Res Int*. 2020 Oct;136:109502. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109502. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32846581.

de Campos RSC. Efeitos da administração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos portadores de artrite reumatoide experimental [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2018. doi:10.11606/D.58.2019.tde_30082018-090259

Derrien M, van Hylckama Vlieg JE. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol*. 2015 Jun;23(6):354-66. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.002. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25840765.

Duque AD, Malheiros Z, Stewart B, Romanelli HJ. Strategies for the prevention of periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section III: Prevention. *Braz Oral Res*. 2020 Apr 9;34(suppl 1):e025. doi: 10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0025. PMID: 32294678.

Dye BA. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontol 2000*. 2012 Feb;58(1):10-25. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00413.x. PMID: 22133364.

Farré R, Fiorani M, Abdu Rahiman S, Matteoli G. Intestinal permeability, inflammation and the role of nutrients. *Nutrients*. 2020 Apr 23;12(4):1185. doi: 10.3390/nu12041185. PMID: 32340206; PMCID: PMC7231157.

Ferreira CL, Nunes CMM, Bernardo DV, Pedroso JF, Longo M, et al. Effect of orthodontic force associated with cigarette smoke inhalation in healthy and diseased periodontium. A histometric and immunohistochemistry analysis in rats. *J Periodontal Res*. 2018 Oct;53(5):924-931. doi: 10.1111/jre.12584. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30043971.

Festing MF. On determining sample size in experiments involving laboratory animals. *Lab Anim*. 2018 Aug;52(4):341-350. doi: 10.1177/0023677217738268. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29310487

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation [Internet]. Roma: FAO; 2006 [cited 2022 Feb 10]. Available from: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>

Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*. 1991 Apr;32(4):439-42. doi: 10.1136/gut.32.4 439. PMID: 1902810; PMCID: PMC1379087.

Genco RJ, Borghnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013 Jun;62(1):59-94. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x. PMID: 23574464.

Genco RJ, Sanz M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontol* 2000. 2020 Jun;83(1):7-13. doi: 10.1111/prd 12344. PMID: 32385880.

Geraldo BMC, Batalha MN, Milhan NVM, Rossoni RD, Scorzoni L, Anbinder AL. Heat-killed *Lactobacillus reuteri* and cell-free culture supernatant have similar effects to viable probiotics during interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2020 Apr;55(2):215-220. doi: 10.1111/jre.12704. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31691977.

Gou W, Fu Y, Yue L, Chen G-d, Cai X, Shuai M, et al. Gut microbiota may underlie the predisposition of healthy individuals to COVID-19. *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.04.22.20076091.

Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol* 2000. 2017 Oct;75(1):152-188. doi: 10.1111/prd.12201. PMID: 28758300.

Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):51-61. doi: 10.1902/annals.1998.3.1.51. PMID: 9722690.

Hatakka K, Ahola AJ, Yliö-Knuuttila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, et al. Probióticos reduzem a prevalência de *Candida* oral em idosos – Um estudo controlado randomizado. *J Dent Res* 2007;86:125-30.

Invernici MM, Furlaneto FAC, Salvador SL, Ouwehand AC, Salminen S, Mantziari A, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. *PLoS One*. 2020 Sep 22;15(9):e0238425. doi: 10.1371/journal.pone.0238425. PMID: 32960889; PMCID: PMC7508403.

Invernici MM, Salvador SL, Silva PHF, Soares MSM, Casarin R, Palioto DB, et al. Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2018 Oct;45(10):1198-1210. doi: 10.1111/jcpe.12995. Epub 2018 Sep 24. PMID: 30076613; PMCID: PMC6221043.

Islam SU. Clinical uses of probiotics. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Feb;95(5):e2658. doi: 10.1097/MD.0000000000002658. PMID: 26844491; PMCID: PMC4748908.

Iwasaki K, Maeda K, Hidaka K, Nemoto K, Hirose Y, Deguchi S. Daily intake of heat-killed lactobacillus plantarum I-137 decreases the probing depth in patients undergoing supportive periodontal therapy. *Oral Health Prev Dent*. 2016;14(3):207-14. doi: 10.3290/j.ohpd.a36099. PMID: 27175447.

Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba M Jr, Kostenuik PJ, et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2007 Jul;78(7):1300-8. doi: 10.1902/jop.2007.070073. PMID: 17608585; PMCID: PMC2583091.

Judkins TC, Archer DL, Kramer DC, Solch RJ. Probiotics, nutrition, and the small intestine. *Curr Gastroenterol Rep*. 2020 Jan 13;22(1):2. doi: 10.1007/s11894-019-0740-3. PMID: 31930437.

Kamiya T, Wang L, Forsythe P, Goettsche G, Mao Y, Wang Y, et al. Inhibitory effects of Lactobacillus reuteri on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut*. 2006 Feb;55(2):191-6. doi: 10.1136/gut.2005.070987. Epub 2005 Dec 16. PMID: 16361309; PMCID: PMC1856513.

Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, et al. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutr*. 2013 Jan 2;2013:481651. doi: 10.5402/2013/481651. PMID: 24959545; PMCID: PMC4045285.

Kitamoto S, Kamada N. Periodontal connection with intestinal inflammation: Microbiological and immunological mechanisms. *Periodontol 2000*. 2022 Jun;89(1):142-153. doi: 10.1111/prd.12424. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35244953; PMCID: PMC9018512.

Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*. 1991 Jan;62(1):59-73. doi: 10.1902/jop.1991.62.1.59. PMID: 2002433.

Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004 Apr;39(2):101-6. doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00710.x. PMID: 15009517.

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 Jun;43(6):520-30. doi: 10.1111/jcpe.12545. Epub 2016 May 7. PMID: 26970230.

Matsubara VH, Bandara HM, Ishikawa KH, Mayer MP, Samaranayake LP. The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016 Jul;14(7):643-55. doi: 10.1080/14787210.2016.1194198. Epub 2016 Jun 3. PMID: 27224284.

McCabe LR, Irwin R, Schaefer L, Britton RA. Probiotic use decreases intestinal inflammation and increases bone density in healthy male but not female mice. *J Cell Physiol*. 2013 Aug;228(8):1793-8. doi: 10.1002/jcp.24340. PMID: 23389860; PMCID: PMC4091780.

Messora MR, Oliveira LF, Foureaux RC, Taba M Jr, 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 Dec;84(12):1818-26. doi: 10.1902/jop.2013.120644. Epub 2013 Jan 17. 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 Jun;66:108-19. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.02.014. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26945169.

Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci*. 2005 Jun;113(3):188-96. doi: 10.1111/j.1600-0722.2005.00191.x. PMID: 15953242.

Miyazawa K, He F, Kawase M, Kubota A, Yoda K, Hiramatsu M. Enhancement of immunoregulatory effects of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 by heat treatment and culture medium. *Lett Appl Microbiol*. 2011 Aug;53(2):210-6. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03093.x. Epub 2011 Jul 5. PMID: 21623846.

Moraes RM, Lescura CM, Milhan NVM, Ribeiro JL, Silva FA, Anbinder AL. Live and heat-killed *Lactobacillus reuteri* reduce alveolar bone loss on induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol*. 2020 Nov;119:104894. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104894. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32950917.

Moraes RM, Lima GM, Oliveira FE, Brito AC, 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. Epub 2015 Jul 24. PMID: 26205746.

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 Feb;88(2):197-208. doi: 10.1902/jop.2016.160217. Epub 2016 Sep23. PMID: 27660886.

Oliveira LFF, da Silva GA, Silva PHF, Moreira ALG, Salvador SL, da Cruz AG, et al. Comparison between different delivery vehicles for the probiotic bifidobacterium animalis subsp. lactis hn019 on experimental periodontitis in rats. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2022 Apr;14(2):313-325. doi: 10.1007/s12602-022-09930-8. Epub 2022 Mar 9. PMID: 35260963.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001 Jun 2;357(9270):1777-89. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7. PMID: 11403834.

Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J*. 2016 May;92(1087):286-300. doi: 10.1136/postgradmedj-2015-133285. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26912499.

Pretzl B, Sälzer S, Ehmke B, Schlagenhaut U, Dannewitz B, Dommisch H, et al. Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy-a consensus report. *Clin Oral Investig*. 2019 Jul;23(7):3073- 3085. doi: 10.1007/s00784-018-2727-0. Epub 2018 Oct 29. PMID: 30374830.

Pujia AM, Costacurta M, Fortunato L, Merra G, Cascapera S, Calvani M, et al. The probiotics in dentistry: a narrative review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Mar;21(6):1405-1412. PMID: 28387884.

Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One*. 2017 Jun 29;12(6):e0179946. doi: 10.1371/journal.pone.0179946. PMID: 28662142; PMCID: PMC5491108.

Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan 10;7(1):14. doi: 10.3390/microorganisms7010014. PMID: 30634578; PMCID: PMC6351938

Rode Sde M, Gimenez X, Montoya VC, Gómez M, Blanc SL, Medina M, et al. Daily biofilm control and oral health: consensus on the epidemiological challenge--Latin American Advisory Panel. *Braz Oral Res*. 2012;26 Suppl 1:133-43. doi: 10.1590/s1806-83242012000700020. PMID: 23318756.

Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res*. 1966;1(3):193-204. doi: 10.1111/j.1600-0765.1966.tb01860.x. PMID: 4225530.

Santos TA, Scorzoni L, Correia R, Junqueira JC, Anbinder AL. Interaction between *Lactobacillus reuteri* and periodontopathogenic bacteria using in vitro and in vivo (*G. mellonella*) approaches. *Pathog Dis*. 2020 Nov 11;78(8):ftaa044. doi: 10.1093/femspd/ftaa044. PMID: 32845308.

Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Beglundh T, et al; EFP Workshop Participants and Methodological Consultants. Treatment of stage I-III periodontitis-The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2020 Jul;47 Suppl 22(Suppl 22):4-60. doi: 10.1111/jcpe.13290. Erratum in: *J Clin Periodontol*. 2021 Jan;48(1):163. PMID: 32383274; PMCID: PMC7891343.

Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):577-94. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.059. PMID: 18242222.

Schmidt TS, Hayward MR, Coelho LP, Li SS, Costea PI, Voigt AY, et al. Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract. *Elife*. 2019 Feb 12;8:e42693. doi: 10.7554/eLife.42693. PMID: 30747106; PMCID: PMC6424576.

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 May 1;22 (3):e282-8.

Shimabukuro N, Cataruci ACS, Ishikawa KH, de Oliveira BE, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, et al. *Bifidobacterium* strains present distinct effects on the control of alveolar bone loss in a periodontitis experimental model. *Front Pharmacol*. 2021 Sep 24;12:713595. doi: 10.3389/fphar.2021.713595. PMID: 34630089; PMCID: PMC8497694.

Shin HS, Park SY, Lee DK, Kim SA, An HM, Kim JR, et al. Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. *Arch Pharm Res*. 2010 Sep;33(9):1425-31. doi: 10.1007/s12272-010-0917-7. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20945142.

Silva GA, Moreira ALG, Silva PHF, Salvador SL, Casarin RCV, Vicente RM, et al. The use of probiotics can reduce the severity of experimental periodontitis in rats with metabolic syndrome: An immunoenzymatic and microtomographic study. *J Periodontol*. 2022 Feb;93(2):e1-e12. doi: 10.1002/JPER.21-0285. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34374081.

Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2009;51:141-51. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00305.x. PMID: 19878473.

Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpiński TM. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014

Dec;62(6):495-500. doi: 10.1007/s00005-014-0277-y. Epub 2014 Feb 9. PMID: 24509697; PMCID: PMC4244533.

Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 2011 Aug;6(3):261-74. doi: 10.1007/s12263-011-0218-x. Epub 2011 Apr 16. PMID: 21499799; PMCID: PMC3145061.

Teughels W, Feres M, Oud V, Martin C, Matesanz P, Herrera D. Efeito adjuvante de antimicrobianos sistêmicos na terapia da periodontite. Uma revisão sistemática e meta-análise. *J Clin Periodontol* 2020; 22:257-281.

Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, Nitta T, Pluemsakunthai W, Shukunami C, et al. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun.* 2018 Feb 16;9(1):701. doi: 10.1038/s41467-018-03147-6. PMID: 29453398; PMCID: PMC5816021.

Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksen-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. PMID: 18985460.

van Hoffen E, Korthagen NM, de Kivit S, Schouten B, Bardoel B, Duivelshof A, et al. Exposure of intestinal epithelial cells to UV-killed *Lactobacillus GG* but not *Bifidobacterium breve* enhances the effector immune response in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;152(2):159-68. doi: 10.1159/000265537. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20016198.

Wilson AS, Koller KR, Ramaboli MC, Nesengani LT, Ocvirk S, Chen C, et al. Diet and the human gut microbiome: an international review. *Dig Dis Sci.* 2020 Mar;65(3):723-740. doi: 10.1007/s10620-020-06112-w. PMID: 32060812; PMCID: PMC7117800.

Zhang C, Derrien M, Levenez F, Brazeilles R, Ballal SA, Kim J, et al. Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *ISME J.* 2016 Sep;10(9):2235-45. doi: 10.1038/ismej.2016.13. Epub 2016 Mar 8. PMID: 26953599; PMCID: PMC4989305.

Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics-A step beyond pre- and probiotics. *Nutrients.* 2020 Jul 23;12(8):2189. doi: 10.3390/nu12082189. PMID: 32717965; PMCID: PMC7468815.

ANEXO A — Comitê de Ética



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 06/2022, intitulado:- "Efeitos de *Bifidobacterium animalis subsp.lactis* HN019 vivo e inativado na periodontite experimental em ratos", sob a responsabilidade de **MARIA APARECIDA NEVES JARDINI**, tendo como colaboradores:- **TAINÁ DA SILVA TRICOLY**, **ANA LIA ANBINDER**, **CAMILA LOPES FERREIRA** e **VICTORIA CLARA DA SILVA LIMA** 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 16/05/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	16/05/2022 a 10/12/2024
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de Animais	32
Peso/Idade	250 a 300 grs/ 90 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Compromisso/Relatório(s)	Final:- Envio para a CEUA:- 10/01/2023

São José dos Campos, 16 de maio de 2022


Prof. Dra LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS
VICE – COORDENADORA EM EXERCÍCIOS