

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 17/08/2025.



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

LAÍS FERNANDA FERREIRA FERRAZ

**ADMINISTRAÇÃO DE *Lactobacillus paracasei* 28.4 NO
TRATAMENTO DA PERIODONTITE: desenvolvimento *in vitro*
de formulação probiótica usando *gellan gum* e ensaio clínico
randomizado placebo-controlado**

2023

LAÍS FERNANDA FERREIRA FERRAZ

ADMINISTRAÇÃO DE *Lactobacillus paracasei* 28.4 NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE: desenvolvimento *in vitro* de formulação probiótica usando *gellan gum* e ensaio clínico randomizado placebo-controlado

Tese 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 DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria

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).

Ferraz, Laís Fernanda Ferreira

Administração de *Lactobacillus paracasei* 28.4 no tratamento da periodontite: desenvolvimento in vitro de formulação probiótica usando gellan gum e ensaio clínico randomizado placebo-controlado / Laís Fernanda Ferreira Ferraz. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.

82 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientador: Mauro Pedrine Santamaria.

1. Probióticos. 2. *Lactobacillus*. 3. Doenças periodontais. 4. Periodontite. 5. Desbridamento periodontal. I. Santamaria, Mauro Pedrine, 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

Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)/Universidade do Kentucky (UK)

Instituto de Ciência e Tecnologia/Faculdade de Odontologia

Campus de São José dos Campos/Lexington

Profa. Assoc. Andréa Carvalho De Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Ass. Emanuel da Silva Rovai

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Felipe de Camargo Ribeiro

Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Escola Paulista de Medicina

Laboratório Especial de Micologia

Profa. Dra. Mabelle de Freitas Monteiro

Universidade Paulista (UNIP)

Clínica Odontológica (Periodontia)

Campus de Indianópolis

São José dos Campos, 17 de agosto de 2023.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Carlos e Elen**, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para que eu recebesse sempre o melhor. Por apoiarem minhas escolhas e serem exemplos de dedicação e bom trabalho. Por confiarem em mim e permitirem tamanha dedicação aos estudos.*

A vocês o meu eterno reconhecimento, amor e gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, presença e proteção constante.

À minha irmã, Larissa, por me entender como ninguém e ser fonte dos melhores conselhos. Por me amparar em qualquer circunstância com suas conversas, cuidados e escuta genuína.

Ao meu noivo, Pedro, por todo o amor, respeito e confiança compartilhados ao longo desses anos. Por me incentivar constantemente e me lembrar que as escolhas não precisam ser eternas. Por permanecer em todas as nossas versões e caminhos.

Às minhas avós, Darci e Rosa (in memoriam), pelos inúmeros ensinamentos e por entenderem minha ausência nos aniversários e almoços em família. Honro suas existências e as levo comigo por onde vou.

À querida Cida, que cuidou de mim como uma mãe e continua com esse zelo mesmo à distância. Por ser admirável exemplo de resiliência e fé.

À amiga e quase irmã, Victória, por toda a amizade, histórias infinitas e suporte. Por ter sido fundamental em todas as minhas fases de Unesp. Sentirei saudades de dividir a casa e a vida com você. Que o sucesso te acompanhe por onde você for!

Às amigas Amanda, Beatriz, Manuela, Cássia e Ana Bonafé, por toda a amizade, experiências compartilhadas e ajudas incansáveis. Sem vocês nada disso seria possível! Cada uma tem um significado especial na minha jornada, muito além das nossas salinhas da pós-graduação.

À amiga Evelyn, por todos os ensinamentos, aventuras e companheirismo. Por abraçar comigo esse trabalho e se doar tanto aos nossos “ursinhos”. Sem você esse projeto não teria saído do papel!

Às amigas Ana Beatriz e Giovanna, pelos anos de amizade, apoio e lares compartilhados. Por tornarem a minha permanência em São José mais leve e valiosa.

Aos amigos que conheci na pós-graduação, em especial aos que compartilhei momentos nesse período de doutorado: Letícia, Clarissa, Eduardo, Tainá, Nátaly, Nicole, Mariana, Victória Oliveira, Bianca, Camila Lopes e Camila Moretto, por toda a convivência e boas risadas.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. César Rogério Pucci e da vice-diretora Profa. Symone Cristina Teixeira.

Aos programas de Pós-graduação em Biopatologia Bucal e Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, juntamente com todo o corpo docente e funcionários envolvidos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria, por me receber no seu grupo de pesquisa e permitir a realização desse e de outros estudos. Por toda orientação e ensinamentos diversos que colaboraram para a concretização dessa jornada de cinco anos e meio de muito trabalho e superações.

À Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT-Unesp e apostar no sucesso das nossas “gominhas”. Por compartilhar conhecimento e recursos para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Felipe de Camargo Ribeiro, por dividir tanto conhecimento e ideias mirabolantes para a construção desta metodologia. Por ter formado uma parceria fundamental num período tão louco envolvendo pandemia, gominhas e reality show.

À Profa. Dra. Andréa Carvalho de Marco, por me acompanhar nas bancas desde o mestrado e ser exemplo de docência e gentileza. Sou grata por todos os ensinamentos durante a minha formação e período de estágio docência.

Ao Prof. Dr. Emanuel da Silva Rovai, pelos aprendizados e incentivos. Nossas conversas foram importantes para que eu mergulhasse em novos desafios e oportunidades.

À Profa. Dra. Mabelle de Freitas Monteiro, pela disponibilidade e participação em mais um marco da minha trajetória acadêmica. Por ser inspiração para mim e tantas outras mulheres na Ciência!

Aos docentes Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim, Prof. Dr. José Benedito Oliveira Amorim, Prof. Dr. Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes e Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira por contribuírem para a minha formação e serem grandes exemplos dentro da profissão.

À psicóloga, Mariana, por seu papel essencial para que eu não desistisse pelo caminho. Por ter me apresentado o conceito de que “quando nós mudamos, o mundo também muda”.

*Às técnicas e amigas **Valéria e Marcinha** e à secretária **Jacque**, por acompanharem de perto essa caminhada, ajudando em tantos momentos difíceis e tornando os dias mais leves e felizes.*

*Aos **funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos**, pelo apoio e colaboração nas atividades diárias em diversos setores como triagem, esterilização, portaria e limpeza.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da **Bolsa de Doutorado**, tão importante nesse período.*

*A **todos os pacientes** a quem tive o privilégio de atender durante o doutorado. Em especial, àqueles que aceitaram participar desse estudo e contribuíram para o meu desenvolvimento profissional, intelectual e pessoal.*

“Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes.”

— Ernest Hemingway

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE TABELAS..... | 11 |
| RESUMO..... | 12 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 PROPOSIÇÃO..... | 20 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 21 |
| 3.1 PARTE A - Desenvolvimento da formulação probiótica para administração no tratamento de doenças periodontais: estudo <i>in vitro</i> | 22 |
| 3.1.1 Preparo da suspensão padronizada de <i>L. paracasei</i> 28.4..... | 22 |
| 3.1.2 Preparo da formulação probiótica em <i>gellan gum</i> | 22 |
| 3.1.3 Viabilidade de <i>L. paracasei</i> 28.4 a partir da formulação..... | 25 |
| 3.1.4 Recuperação de <i>L. paracasei</i> 28.4 da formulação de <i>gellan gum</i> após armazenamento..... | 25 |
| 3.1.5 Análise do sistema de liberação de <i>L. paracasei</i> 28.4 em PBS | 26 |
| 3.1.6 Sistema de liberação de <i>L. paracasei</i> 28.4 em saliva artificial | 28 |
| 3.1.7 Preparo da formulação placebo..... | 28 |
| 3.1.8 Armazenamento das formulações de <i>gellan gum</i> | 29 |
| 3.1.9 Análise estatística (parte A) | 29 |
| 3.2 PARTE B - Administração de <i>Lactobacillus paracasei</i> 28.4 como terapia adjuvante no tratamento da periodontite: estudo clínico randomizado placebo-controlado de superioridade..... | 30 |
| 3.2.1 Desenho do estudo | 30 |
| 3.2.2 População-alvo e tamanho da amostra..... | 30 |
| 3.2.3 Critérios de inclusão..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.4 Critérios de não inclusão e exclusão | 32 |
| 3.2.5 Grupos de tratamento | 32 |
| 3.2.6 Randomização, ocultamento e cegamento..... | 33 |
| 3.2.7 Procedimentos clínicos | 34 |
| 3.2.7.1 Terapia inicial..... | 34 |
| 3.2.7.2 Terapia periodontal não cirúrgica..... | 35 |
| 3.2.8 Avaliações clínicas | 36 |
| 3.2.9 Adesão à terapia e consumo das formulações | 38 |
| 3.2.10 Percepção do paciente e monitoramento de efeitos adversos | 39 |
| 3.2.11 Análise estatística | 39 |
| 4 RESULTADO..... | 41 |
| 4.1 Resultado <i>in vitro</i> (Parte A) | 41 |
| 4.2 Resultado clínico (Parte B) | 48 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 58 |
| 6 CONCLUSÃO | 68 |
| REFERÊNCIAS..... | 69 |
| APÊNDICES | 79 |
| ANEXO | 79 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Divisão metodológica e desenhos do presente estudo | 21 |
| Figura 2 – Formulações testadas durante adaptação da metodologia | 23 |
| Figura 3 – Formas de silicone utilizadas para verter a solução | 24 |
| Figura 4 – Teste de viabilidade de <i>L. paracasei</i> 28.4 a partir da formulação ... | 26 |
| Figura 5 – Teste de análise da liberação de <i>L. paracasei</i> 28.4 (60 minutos) | 27 |
| Figura 6 – Terapia inicial e raspagem supragengival | 34 |
| Figura 7 – Terapia inicial: antes, durante e depois | 35 |
| Figura 8 – Ultrassom utilizado na terapia periodontal não cirúrgica | 36 |
| Figura 9 – Diferença entre as formulações de <i>gellan gum</i> | 41 |
| Figura 10 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL), recuperadas imediatamente após o preparo da formulação de <i>gellan gum</i> | 42 |
| Figura 11 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL), recuperadas diariamente após armazenamento em refrigeração | 43 |
| Figura 12 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL), recuperadas semanalmente após armazenamento em refrigeração | 44 |
| Figura 13 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL) liberadas das três amostras testadas durante período de 60 minutos em PBS ... | 46 |
| Figura 14 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL) liberadas das três amostras testadas durante período de 60 minutos em saliva.. | 47 |
| Figura 15 – Fluxograma segundo o CONSORT 2010 | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Dados demográficos iniciais dos pacientes (n=40)..... | 49 |
| Tabela 2 - Dados clínicos de boca toda (<i>baseline</i> , 3 e 6 meses) | 51 |
| Tabela 3 - Estratificação das bolsas periodontais com PS \geq 4mm e PS \geq 5mm no <i>baseline</i> | 52 |
| Tabela 4 - Estratificação das bolsas periodontais moderadas (PS =5-6mm) e profundas (PS \geq 7mm) no <i>baseline</i> | 53 |
| Tabela 5 – Adesão e consumo das formulações pelos pacientes..... | 55 |
| Tabela 6 – Percepção de sintomas e efeitos adversos..... | 56 |

Ferraz LFF. Administração de *Lactobacillus paracasei* 28.4 como terapia adjuvante no tratamento da periodontite: desenvolvimento *in vitro* de formulação probiótica usando *gellan gum* e ensaio clínico randomizado placebo-controlado [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória do periodonto associada ao acúmulo de biofilme dental, com consequente disbiose da microbiota oral e alteração da resposta imuno-inflamatória. O controle da periodontite realizado por meio do tratamento periodontal não-cirúrgico altera o ambiente subgingival e pode ser associado a terapias adjuntas. O uso de probióticos como terapia adjuvante a esse tratamento parece favorecer a modificação do biofilme bacteriano e resposta imuno-inflamatória. Entretanto, os probióticos empregados até o momento não são próprios da cavidade oral e, por isso, a busca por cepas originadas da microbiota oral tem ganhado espaço na tentativa de favorecer a aderência e colonização permanente dessas bactérias. Recentemente, a cepa de *Lactobacillus paracasei* 28.4 foi isolada da cavidade oral, exibindo atividades antimicrobianas promissoras sobre o controle de patógenos orais. O presente estudo teve como objetivos o desenvolvimento de uma formulação probiótica de *L. paracasei* 28.4 incorporado em *gellan gum* para uso humano, bem como a avaliação dos efeitos clínicos da administração desta formulação como adjuvante no tratamento periodontal. Para tal, o trabalho foi dividido em 2 etapas, contemplando uma etapa laboratorial (parte A), para desenvolvimento da formulação probiótica; e um ensaio clínico randomizado (parte B, n=40), envolvendo um protocolo de tratamento periodontal não cirúrgico associado à terapia adjunta probiótica ou placebo. Os resultados da parte A permitiram encontrar a melhor forma de apresentação e armazenamento da formulação de *gellan gum*. Na parte B, aos 3 e 6 meses de acompanhamento, os dois grupos apresentaram melhoras significativas dos parâmetros periodontais (índice de sangramento, índice gengival, profundidade de sondagem e ganho de nível de inserção) em relação ao *baseline*, sem diferença estatística na comparação intergrupo. Como conclusão, uma formulação probiótica segura e possível de ser aplicada na prática clínica foi obtida; no entanto, sua administração não promoveu efeitos clínicos adicionais ao tratamento de pacientes com periodontite generalizada estágios III/IV e graus B/C.

Palavras-chave: Probióticos. *Lactobacillus*. Doenças periodontais. Periodontite. Desbridamento periodontal.

Ferraz LFF. Administration of Lactobacillus paracasei 28.4 as adjuvant therapy in the treatment of periodontitis: in vitro development of the probiotic formulation using gellan gum and placebo-controlled randomized clinical trial [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

ABSTRACT

Periodontitis is an inflammatory disease of the periodontium associated with the accumulation of dental biofilm, with consequent dysbiosis of the oral microbiota and alteration of the immune-inflammatory response. The control of periodontitis carried out through non-surgical periodontal treatment alters the subgingival environment and can be associated with adjunctive therapies. The use of probiotics as an adjuvant therapy in the periodontal treatment seems to favor the modification of the bacterial biofilm and modulation of the immune-inflammatory response. However, the probiotics used so far are not specific to the oral cavity and, therefore, the search for strains originating from the oral microbiota has gained space to favor the adherence and permanent colonization of these bacteria. Recently, strain of Lactobacillus paracasei 28.4 was isolated from the oral cavity itself, showing promising antimicrobial activities in the control of oral pathogens. The present study aimed to develop and characterize a probiotic formulation of L. paracasei 28.4 incorporated into gellan gum for human use, as well as to evaluate the clinical effects of administering this formulation as an adjuvant in the treatment of periodontitis. To this end, the study was divided into 2 stages, comprising a laboratory stage (part A), for the development of the probiotic, and a randomized clinical trial (part B, n=40) contemplating a non-surgical periodontal treatment protocol associated with adjunctive probiotic therapy or placebo. The results from part A made it possible to find the best way to present and store the gellan gum formulation. In part B, at 3 and 6 months of follow-up, both groups showed significant improvements in periodontal parameters (bleeding index, gingival index, probing depth and attachment level gain) in relation to baseline, with no statistical difference in the intergroup comparison. In conclusion, a safe probiotic formulation that can be applied in clinical practice was obtained; however, its administration did not promote additional clinical effects in the treatment of patients with stage III/IV and grades B/C generalized periodontitis.

Keywords: Probiotics. Lactobacillus. Periodontal diseases. Periodontitis. Periodontal debridement.

6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações desse estudo, a formulação probiótica proposta foi desenvolvida com sucesso, sendo possível de ser usada na prática clínica e armazenada pelos pacientes, sem apresentar associação a efeitos adversos significativos locais ou sistêmicos. Clinicamente, a administração dessa formulação como terapia adjuvante ao tratamento periodontal não promoveu efeitos adicionais em pacientes com Periodontite Generalizada Estágios III e IV e Graus B e C. Análises microbiológicas e imunológicas são necessárias para investigar os efeitos da terapia probiótica na microbiota periodontal e na modulação da resposta imune do hospedeiro.

REFERÊNCIAS*

Abalymov A, Lengert E, Van der Meeren L, Saveleva M, Ivanova A, Douglas TEL, et al. The influence of Ca/Mg ratio on autogelation of hydrogel biomaterials with bioceramic compounds. *Biomater Adv.* 2022;133:112632. doi: 10.1016/j.msec.2021.112632. PMID: 35034815.

Aimetti M. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Esthet Dent.* 2014;9(2):251-67. PMID: 24765632.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975;25(4):229–35. PMID: 1058834.

Araujo CF, Andere NMRB, Castro Dos Santos NC, Mathias-Santamaria IF, Reis AA, de Oliveira LD, et al. Two different antibiotic protocols as adjuncts to one-stage full-mouth ultrasonic debridement to treat generalized aggressive periodontitis: A pilot randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2019. doi: 10.1002/JPER.18-0399. PMID: 31257591.

Ardila CM, Granada MI, Guzman IC. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2010;45(4):557–63. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01274.x. PMID: 20546113.

de Barros PP, Scorzoni L, Ribeiro F de C, Fugisaki LR de O, Fuchs BB, Mylonakis E, et al. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces in vitro hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microb Pathog.* 2018;117:80–7. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.019. PMID: 29432910.

Bechara Andere NMR, dos Santos NCC, Araujo CF, Mathias IF, Rossato A, de Marco AC, et al. Evaluation of the local effect of nonsurgical periodontal treatment with and without systemic antibiotic and photodynamic therapy in generalized aggressive periodontitis. A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;24:115–20. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.09.002.

Bishop FL, Jacobson EE, Shaw JR, Kaptchuk TJ. Scientific tools, fake treatments, or triggers for psychological healing: how clinical trial participants conceptualise placebos. *Soc Sci Med.* 2012;74(5):767-74. doi: 10.1016/j.socscimed.2011.11.020. PMID: 22285289.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Blaser M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. *Nature*. 2011;476(7361):393–4. doi: 10.1038/476393a. PMID: 21866137.
- Broekaert IJ, Walker WA. Probiotics and chronic disease. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(3):270–4. doi: 10.1097/00004836-200603000-00021.
- Casarin RC V, Peloso Ribeiro E Del, Sallum EA, Nociti FHJ, Goncalves RB, Casati MZ. The combination of amoxicillin and metronidazole improves clinical and microbiologic results of one-stage, full-mouth, ultrasonic debridement in aggressive periodontitis treatment. *J Periodontol*. 2012;83(8):988–98. doi: 10.1902/jop.2012.110513. PMID: 22288485.
- Castro dos Santos NC, Andere NMRB, Araujo CF, Marco AC, Kantarci A, Van Dyke TE, et al. Omega-3 PUFA and aspirin as adjuncts to periodontal debridement in patients with periodontitis and type 2 diabetes mellitus: Randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2020. doi: 10.1002/jper.19-0613. PMID: 32103495.
- Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol*. 2011;149(3):185-93. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005. PMID: 21803436.
- Chan A, Tetzlaff JM, Altman DG, Laupacis A, Gøtzsche PC, Krleža-Jerić K, et al. SPIRIT 2013 Statement: Defining standard protocol items for clinical trials. *Ann Intern Med*. 2013;158:200-7. doi:10.7326/0003-4819-158-3-201302050-00583. PMID: 23295957.
- Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol*. 2018. Jun; Suppl 20:S68–S77 . doi: 10.1111/jcpe.12940. PMID: 29926499.
- Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®) , *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYN BIO(®) against pathogens. *J Appl Microbiol*. 2014;117(2):518–27. doi: 10.1111/jam.12544. PMID: 24836638.

Coutinho DF, Sant S V., Shin H, Oliveira JT, Gomes ME, Neves NM, et al. Modified Gellan Gum hydrogels with tunable physical and mechanical properties. *Biomaterials*. 2010;31(29):7494–502. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.035. PMID: 20663552.

D'Arrigo G, Navarro G, Di Meo C, Matricardi P, Torchilin V. Gellan gum nanohydrogel containing anti-inflammatory and anti-cancer drugs: A multi-drug delivery system for a combination therapy in cancer treatment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;87(1):208–16. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.11.001.

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. PMID: 21777405.

Douglas TEL, Schietse J, Zima A, Gorodzha S, Parakhonskiy BV, KhaleNkow D, et al. Novel self-gelling injectable hydrogel/alpha-tricalcium phosphate composites for bone regeneration: Physiochemical and microcomputer tomographical characterization. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(3):822-8. doi: 10.1002/jbm.a.36277. PMID: 29057619.

Feres M, Retamal-Valdes B, Faveri M, Duarte P, Shibli J, Soares GMS, et al. Proposal of a clinical endpoint for periodontal trials: the treat-to-target approach. *J Int Acad Periodontol*. 2020;22(2):41–53. PMID: 32224549.

Gatej SM, Marino V, Bright R, Fitzsimmons TR, Gully N, Zilm P, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2018;45(2):204-212. doi:10.1111/jcpe.12838.

Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*. 2012;4(1):149-63. doi: 10.3390/pharmaceutics4010149. PMID: 24300185.

Gupta S. Intention-to-treat concept: A review. *Perspect Clin Res*. 2011;2(3):109. doi: 10.4103/2229-3485.83221.

Hansen JN. Nisin as a model food preservative. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1994;34(1):69-93. doi:10.1080/10408399409527650.

Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: Evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;14(5):326–30. doi: 10.1034/j.1399-302X.1999.140510.x.

Hasslof P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli--an in vitro study. *BMC Oral Health*. 2010;10:18. doi: 10.1186/1472-6831-10-18. PMID: 20598145.

Herbel SR, Vahjen W, Wieler LH, Guenther S. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut Pathog*. 2013;5(1):27. doi: 10.1186/1757-4749-5-27. PMID: 24063519.

Huang J, Zhu S, Li C, Zhang C, Ji Y. Cost-effective optimization of gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* using corn steep liquor. *Prep Biochem Biotechnol*. 2020;50(2):191-7. doi:10.1080/10826068.2019.1692215.

Kantarci A, Van Dyke TE. Resolution of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*. 2005;76 Suppl 1:2168–74. doi: 10.1902/jop.2005.76.11-S.2168. PMID: 29539044.

Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, 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. PMID: 25261053.

Keestra JAJ, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res*. 2015;50(6):689–706. doi: 10.1111/jre.12252. PMID: 25522248.

Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(6):354-361. doi:10.1111/j.1399-302X.2005.00239.x

Kuru BE, Laleman I, Yalınzoğlu T, Kuru L, Teughels W. The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial . *J Periodontol*. 2017;88(11):1115–23. doi: 10.1902/jop.2017.170213.

Laleman I, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. A dual-strain *Lactobacilli reuteri* probiotic improves the treatment of residual pockets: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2020;47(1):43–53. doi: 10.1111/jcpe.13198.

Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol.* 2018;89:S9–16. doi: 10.1002/JPER.16-0517. PMID: 29926938.

Lin CC, Anseth KS. PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. *Pharm Res.* 2009;26(3):631-43. doi:10.1007/s11095-008-9801-2.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man: Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986;13(5):431–40. doi: 10.1111/j.1600-051X.1986.tb01487.x. PMID: 3487557.

Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand.* 1963;21(6):533–51. doi: 10.3109/00016356309011240. PMID: 14121956.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965;36(3):177–87. doi: 10.1902/jop.1965.36.3.177. PMID: 14296927.

Lopez-Heredia MA, Łapa A, Reczyńska K, Pietryga K, Balcaen L, Mendes AC, et al. Mineralization of gellan gum hydrogels with calcium and magnesium carbonates by alternate soaking in solutions of calcium/magnesium and carbonate ion solutions. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(8):1825-34. doi: 10.1002/term.2675. PMID: 29701014.

Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, Hirata H, Sakamoto M, Benno Y, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: A double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009;36(6):506–13. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01392.x.

Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: Contributions to oral health. *Oral Dis.* 2007;13(5):443–51. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01386.x.

Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ.* 2010;340. doi: 10.1136/bmj.c869. PMID: 20332511.

Morales A, Carvajal P, Silva N, Hernandez M, Godoy C, Rodriguez G, et al. Clinical effects of *Lactobacillus rhamnosus* in non-surgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled trial with 1-year follow-up. *J Periodontol*. 2016;87(8):944-52. doi:10.1902/jop.2016.150665.

Mundula T, Ricci F, Barbetta B, Baccini M, Amedei A. Effect of probiotics on oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*. 2019;11(10). doi: 10.3390/nu11102449. PMID: 26944407.

Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol*. 2018;89:S17–27. doi: 10.1002/JPER.17-0095.

Muthukumar T, Song JE, Khang G. Biological role of gellan gum in improving scaffold drug delivery, cell adhesion properties for tissue engineering applications. *Molecules*. 2019;24(24):4514. doi:10.3390/molecules24244514.

Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res*. 2001;35(6):412–20. doi: 10.1159/000047484. PMID: 11799281.

Navarro-Rodriguez T, Silva FM, Barbuti RC, Mattar R, Moraes-Filho JP, de Oliveira MN, et al. Association of a probiotic to a *Helicobacter pylori* eradication regimen does not increase efficacy or decreases the adverse effects of the treatment: A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *BMC Gastroenterol*. 2013;13(1). doi: 10.1186/1471-230X-13-56. PMID: 23530767.

Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, et al. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol*. 2004;95(2):219–23. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.006.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997;14(1):216–48. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00199.x. PMID: 9567973.

Pangsomboon K, Kaewnopparat S, Pitakpornpreecha T, Srichana T. Antibacterial activity of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* HL32 against *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol*. 2006;51(9):784-793. doi:10.1016/j.archoralbio.2006.03.008

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 2:S162–70. doi: 10.1111/jcpe.12946. PMID: 29926490.

Rabelo CC, Feres M, Goncalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Tu Y-K, et al. Systemic antibiotics in the treatment of aggressive periodontitis. A systematic review and a Bayesian Network meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2015;42(7):647–57. doi: 10.1111/jcpe.12427. PMID: 26087839.

Ramos TCS, Boas MLV, Nunes CMM, Ferreira CL, Pannuti CM, Santamaria MP, et al. Effect of systemic antibiotic and probiotic therapies as adjuvant treatments of subgingival instrumentation for periodontitis: a randomized controlled clinical study. *J Appl Oral Sci*. 2022;30:e20210583. doi: 10.1590/1678-7757-2021-0583. PMID: 35319669.

Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol*. 2014;85(1):160–9. doi: 10.1902/jop.2013.130142. PMID: 23688097.

Ramseier CA, Anerud A, Dulac M, Lulic M, Cullinan MP, Seymour GJ, et al. Natural history of periodontitis: Disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol*. 2017;44(12):1182–91. doi: 10.1111/jcpe.12782.

Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(4):658–72. doi: 10.1128/cmr.16.4.658-672.2003. PMID: 14557292.

Reid G. Probiotics and prebiotics – Progress and challenges. *Int. Dairy J*. 2008;18(10-11):969-75.

Ribeiro F de C, Junqueira JC, dos Santos JD, de Barros PP, Rossoni RD, Shukla S, et al. Development of probiotic formulations for oral candidiasis prevention: Gellan Gum as a Carrier to Deliver *Lactobacillus paracasei* 28.4. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(6). doi: 10.1128/AAC.02323-19. PMID: 32253208.

- Rossoni RD, Velloso MDS, de Barros PP, de Alvarenga JA, Santos JD Dos, Santos Prado ACC Dos, et al. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microb Pathog*. 2018;123:361–7. doi: 10.1016/j.micpath.2018.07.032. PMID: 30053602.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J Appl Microbiol*. 2008;105(1):1-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x. PMID: 18266696.
- Schätzle M, Loe H, Bürgin W, Ånerud Å, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis: I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2003;30(10):887–901. doi: 10.1034/j.1600-051X.2003.00414.x.
- Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008;35(10):897-905. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01306.x
- Shukla S, Shukla A. Tunable antibiotic delivery from gellan hydrogels. *J Mater Chem B*. 2018;6(40):6444–58. doi: 10.1039/C8TB00980E. PMID: 32254652.
- Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964;22(1):121–35. doi: 10.3109/00016356408993968. PMID: 14158464.
- Slawik S, Staufenbiel I, Schilke R, Nicksch S, Weinspach K, Stiesch M, et al. Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65(7):857–63. doi: 10.1038/ejcn.2011.45. PMID: 21448219.
- Soares LG, Carvalho EB, Tinoco EMB. Clinical effect of *Lactobacillus* on the treatment of severe periodontitis and halitosis: A double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2019;32(1):9-13.
- Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol*. 2001;90(2):172-179. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01229.x

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.

Tannock GW. A special fondness for lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(6):3189-94. doi: 10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004. PMID: 15184111; PMCID: PMC427720.

Teanpaisan R, Piwat S, Dahlén G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 2011;53(4):452-9. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03132.x. PMID: 21801186.

Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2013;40(11):1025–35. doi: 10.1111/jcpe.12155. PMID: 24164569.

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. PMID: 21323712.

Teughels W, Newman MG, Coucke W, Haffajee AD, Van Der Mei HC, Haake SK, et al. Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. *J Dent Res*. 2007;86(11):1078–82. doi: 10.1177/154405910708601111. PMID: 17959900.

Theodoro LH, Cláudio MM, Nuernberg MAA, Miessi DMJ, Batista JA, Duque C, et al. Effects of *Lactobacillus reuteri* as an adjunct to the treatment of periodontitis in smokers: randomised clinical trial. *Benef Microbes*. 2019;10(4):375-84. doi:10.3920/BM2018.0150

Tonetti MS, Eickholz P, Loos BG, Papapanou P, van der Velden U, Armitage G, et al. Principles in prevention of periodontal diseases: Consensus report of group 1 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2015;42 Suppl 1:S5-11. doi: 10.1111/jcpe.12368. PMID: 25639948.

Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018a;45:S149–61. doi: 10.1111/jcpe.12945.

Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Periodontol*. 2018;89(1):S46–73. doi: 10.1002/JPER.17-0576. PMID: 29926936.

Wennstrom JL, Tomasi C, Bertelle A, Dellasega E. Full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant scaling and root planing as an initial approach in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32(8):851–9. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00776.x. PMID: 15998268.

Yli-Knuutila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(2):129–31. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00258.x.

Yucel Falco C, Sotres J, Rascón A, Risbo J, Cárdenas M. Design of a potentially prebiotic and responsive encapsulation material for probiotic bacteria based on chitosan and sulfated β -glucan. *J Colloid Interface Sci*. 2017; 1;487:97-106. doi: 10.1016/j.jcis.2016.10.019. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27756004.

Zhu L, Ao J, Li P. A novel in situ gel base of deacetylase gellan gum for sustained ophthalmic drug delivery of ketotifen: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3943. doi: 10.2147/DDDT.S87368.