



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

THAÍS AGUIAR SANTOS

**INTERAÇÃO ENTRE *Lactobacillus reuteri* E BACTÉRIAS
PERIODONTOPATOGÊNICAS: estudo *in vitro* e em modelo de
invertebrado**

2018

THAÍS AGUIAR SANTOS

**INTERAÇÃO ENTRE *Lactobacillus reuteri* E BACTÉRIAS
PERIODONTOPATOGÊNICAS: estudo *in vitro* e em modelo de invertebrado**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Inflamação e reparação tecidual.

Orientadora: Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder

Coorientadora: Profa. Dra. Liliana Scorzoni

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. 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).

Santos, Thaís Aguiar

Interação entre *Lactobacillus reuteri* e bactérias periodontopatogênicas: estudo in vitro e em modelo de invertebrado / Thaís Aguiar Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Ana Lia Anbinder

Coorientadora: Liliana Scorzoni

1. Doenças periodontais. 2. Probióticos. 3. *Fusobacterium nucleatum*. 4. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. 5. *Lactobacillus reuteri*. I. Anbinder, Ana Lia, orient. II. Scorzoni, Liliana, 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

Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Victor Angelo Martins Montalli

Faculdade São Leopoldo Mandic (SLMANDIC)

Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic

Campus de Campinas

São José dos Campos, 26 de novembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Edmara Aparecida de Aguiar Santos** e **Aldo Luciano Fernandes dos Santos**, ao meu irmão, **Rodrigo Aguiar Santos**, e à toda minha família, que nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus sonhos.

Ao meu companheiro de todas as horas, **Rodrigo Silva Campos de Moura**, pelo incentivo constante e apoio incondicional nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Unesp - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, meu obrigado pela acolhida durante esses anos.

À minha orientadora **Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder**, por ser tão disponível e dedicada em tudo que faz. Obrigada por me dar oportunidades e conhecimentos em diversas áreas, desde o incentivo para a iniciação da criação de *Galleria mellonella* da Patologia até a confiança na gestão das compras de materiais. Obrigada pela formação completa que você me deu e por confiar nas minhas capacidades.

À minha **coorientadora Profa. Dra. Liliana Scorzoni**, pela dedicação, paciência e empenho em me ensinar inúmeras técnicas de microbiologia. Obrigada pelos carinhosos incentivos que me fizeram ultrapassar todos os obstáculos.

À **Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira**, por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia e pelo carinho e dedicação em passar o seu conhecimento.

À **Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira**, pelo carinho e pela disponibilidade de utilização do Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células.

Aos **docentes do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal**, pelo apoio, disponibilidade e dedicação em compartilhar conhecimento.

Aos amigos que a Patologia e a Microbiologia me deram, em especial **Cristhian, Jaqueline, Renata, Thais, Janaína, Luciana, Lucas, Pâmela, Damara**, pelo imenso companheirismo que fizeram essa jornada ser menos árdua e mais prazerosa. **Maíra**, meu muito obrigada de coração pela grande amizade, carinho e incentivo durante todo esse tempo. Você me fez sentir em casa na Microbiologia.

Às **alunas de Iniciação Científica**, em especial **Raquel e Aline**, pelo empenho e dedicação na realização dessa pesquisa e pela amizade que a convivência nos deu.

À **CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela concessão de bolsa, e à **FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo**, pelo financiamento desta pesquisa (nº de processo 2016/12559-0).

“Inventar é imaginar o que ninguém pensou; é acreditar no que ninguém jurou; é arriscar o que ninguém ousou; é realizar o que ninguém tentou.”

Santos Dumont

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 <i>Lactobacillus reuteri</i>	19
3.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	20
3.3 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	20
3.4 <i>Streptococcus salivarius</i> e <i>Streptococcus mitis</i>	21
3.5 Atividade antimicrobiana	23
3.6 Estudo em <i>Galleria mellonella</i>	25
3.6.1 Curva de Sobrevivência	25
3.6.2 Densidade hemocitária	27
3.6.3 Recuperação microbiana	28
3.7 Análise Estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Atividade antimicrobiana	29
4.1.1 <i>L. reuteri</i> e preparações X <i>S. mitis</i>	29
4.1.2 <i>L. reuteri</i> e preparações X <i>S. salivarius</i>	30
4.1.3 <i>L. reuteri</i> e preparações X <i>F. nucleatum</i>	32
4.1.4 <i>L. reuteri</i> e preparações X <i>A. actinomycetemcomitans</i>	34
4.2 Curva de sobrevivência	36
4.2.1 Estudo da suscetibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>L. reuteri</i> e a <i>periodontopatógenos</i>	36
4.2.2 Estudo da interação entre <i>L. reuteri</i> e <i>F. nucleatum</i> em <i>G. mellonella</i>	38
4.2.3 Estudo da interação entre <i>L. reuteri</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i> em <i>G.</i> <i>mellonella</i>	40
4.3 Densidade Hemocitária	42
4.3.1 Interação de <i>L. reuteri</i> lpreparações e <i>F. nucleatum</i>	42
4.3.2 Interação de <i>L. reuteri</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i>	44

4.4 Recuperação microbiana.....	46
4.4.1 Interação de <i>L. reuteri</i> e <i>F. nucleatum</i>	46
4.4.2 Interação de <i>L. reuteri</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i>	48
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	59

Santos TA. Interação entre *Lactobacillus reuteri* e bactérias periodontopatogênicas: estudo *in vitro* e em modelo de invertebrado [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

A doença periodontal, afecção crônica inflamatória multifatorial, está entre as principais doenças bucais que afetam a população mundial. Entre as bactérias associadas à periodontite, estão *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Novas terapias adjuntas ao tratamento convencional têm sido propostas para a doença periodontal, entre elas o uso de probióticos. Porém, seu uso não está isento de riscos, e uma alternativa para minimizá-los é inativar os micro-organismos, mantendo suas propriedades benéficas, o que ocorre com os chamados paraprobióticos. Desse modo, são objetivos deste estudo avaliar os efeitos antimicrobianos de *L. reuteri* vivo, inativado pelo calor e seus produtos sobre *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e sobre as bactérias comensais, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius*, além de estudar os efeitos da interação das preparações e periodontopatógenos em modelo de invertebrado. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi avaliada associando-se as bactérias patogênicas ou comensais a *L. reuteri* vivo, inativado ou sobrenadante. Após interação, as bactérias foram cultivadas em meio seletivo para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). No estudo em *Galleria mellonella*, após a infecção com as bactérias patogênicas e as preparações de *L. reuteri*, foi avaliada a curva de sobrevivência e densidade hemocitária. Os dados foram analisados com o teste estatístico apropriado, ao nível de 5%. Após interação bacteriana *in vitro*, *S. salivarius* reduziu o número de UFC de *L. reuteri*, enquanto que não houve interferência das outras bactérias. O probiótico foi mais eficiente em reduzir o crescimento das bactérias periodontopatogênicas e comensais, exceto para *F. nucleatum* onde a preparação do sobrenadante foi melhor. *In vivo*, o sobrenadante foi mais eficiente em aumentar a sobrevivência das lagartas quando infectadas por *F. nucleatum*. Entretanto, quando infectadas por *A. actinomycetemcomitans*, nenhuma das preparações aumentou a sobrevivência. Da mesma maneira, nenhuma das preparações aumentaram o número de hemócitos das lagartas após infecção por *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*, apesar de todas resultarem em redução na contagem de colônias das bactérias periodontopatogênicas. Dessa forma, concluiu-se que tanto o probiótico quanto os produtos dele derivados apresentaram efeitos antimicrobianos e aumentaram a sobrevivência de *G. mellonella* quando infectada por *F. nucleatum*.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Probióticos. *Fusobacterium nucleatum*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Lactobacillus reuteri*.

Santos TA. Interaction of *Lactobacillus reuteri* and periodontopathogenic bacteria: an in vitro study and on invertebrate model [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Periodontal disease, a chronic multifactorial inflammatory disease, is among the major oral diseases that affects the worldwide population. Among the bacteria associated with periodontitis are *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. New therapies have been proposed for periodontal disease as adjunct to conventional treatment, including the use of probiotics. However, their use isn't risk-free and an alternative to that is the inactivation of the microorganisms, maintaining their beneficial properties, which occurs with the paraprobiotics. Thus, the objective of this study is to evaluate the antimicrobial effects of living and heat-killed *L. reuteri*, and its products on *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* and on the commensal bacteria, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus salivarius*, as well as to study the interaction of the preparations and periodontopathogens in an invertebrate model. In vitro antimicrobial activity was evaluated by associating the pathogenic or commensal bacteria to live, heat killed or *L. reuteri* supernatant. After interaction, the bacteria were cultured in a selective medium for colony-forming unit (CFU) count. In the study with *Galleria mellonella*, after infection with pathogenic bacteria and *L. reuteri* preparations, the survival curve and hemocyte density were evaluated. The data were analyzed with the appropriate statistical test at the 5% level. After bacterial interaction in vitro, *S. salivarius* reduced the number of CFU of *L. reuteri*, while there was no interference of the other bacteria. The probiotic was more efficient in reducing the growth of periodontopathogenic and commensal bacteria, except for *F. nucleatum*. In this case, the supernatant presented better results. In vivo, the supernatant was more efficient in increasing the larvae survival when infected by *F. nucleatum*. However, when infected by *A. actinomycetemcomitans*, none of the preparations increased the survival. Likewise, none of the preparations increased the number of hemocytes of the larvae after infection by *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans*, although all resulted in reduction in the CFU of the periodontopathogenic bacteria. Thus, it was concluded that the probiotic and the products derived therefrom presented antimicrobial effects and increased the survival of *G. mellonella* when infected by *F. nucleatum*.

Keywords: Periodontal diseases. Probiotics. *Fusobacterium nucleatum*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Lactobacillus reuteri*.

1 INTRODUÇÃO

Entre as principais afecções bucais que afetam a população mundial, está a doença periodontal (Demmer, Papapanou, 2010), apresentando altas taxas de prevalência (Susin et al., 2014). Estima-se que doença periodontal, em sua forma severa, afeta aproximadamente 10% da população global (Frencken et al., 2017), com altos custos aos setores de saúde pública (Mohd-Dom et al., 2014).

A doença periodontal é uma afecção inflamatória crônica multifatorial, causada principalmente pela interação entre micro-organismos e hospedeiro (Kaur et al., 2018). Fatores de risco como tabagismo (Bahrami et al., 2017; Kubota et al., 2016), aumento de hormônios sexuais na adolescência e gravidez (Bhardwaj, Bhardwaj, 2012) e doenças sistêmicas (Khalighinejad et al., 2016) como a diabetes (Miguel-Infante et al., 2018), aumentam a suscetibilidade às doenças periodontais, que resultam em destruição do periodonto.

Relacionadas à periodontite, estão algumas bactérias anaeróbias Gram-negativas (Patini et al., 2018). Um dos periodontopatógenos mais importantes é *Porphyromonas gingivalis*, porém outras espécies como *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* também estão relacionadas à doença periodontal (Patini et al., 2018). A interação dessas bactérias com o hospedeiro leva à síntese de inúmeras citocinas, quimiocinas e seus receptores, mediada pelos fibroblastos gengivais, células epiteliais, células endoteliais e células inflamatórias (Graves et al., 2001; Kirkwood et al., 2007).

As bactérias relacionadas ao desenvolvimento da doença periodontal são agrupadas em seis complexos: amarelo, azul, verde, violeta, laranja e vermelho (Socransky, Haffajee, 2002). Ocorre uma inter-relação entre os complexos microbianos e entre o conjunto de bactérias que compõem cada complexo (Socransky et al., 1998).

Fusobacterium nucleatum e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são micro-organismos Gram-negativos, não-móveis, pertencentes à microbiota subgengival (Haffajee, Socransky, 1994). A bactéria *Fusobacterium nucleatum*, anaeróbio obrigatório, faz parte do complexo laranja de Socransky, que também é

composto por *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus constellatus* e as 3 espécies de *Campylobacter* (Socransky, Haffajee, 2002). Já o micro-organismo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo b, anaeróbio facultativo, assim como *Selenomonas noxia*, apesar de fazerem parte do diagrama de Socransky, não estão classificados em nenhum dos complexos, pois são considerados *outliers* com pouca relação entre si e com os complexos (Socransky et al., 1998).

Micro-organismos Gram-negativos apresentam fatores de virulência que levam ao aumento da atividade degradativa de enzimas (Maeda et al., 1998), possuem capacidade de invasão e adesão às células epiteliais (Thurnheer et al., 2014), indução à perda da integridade epitelial (Abdulkareem et al., 2018), produção de protease (Byrne et al., 2015) e indução da disfunção e morte de neutrófilos (Matsui et al., 2014). A bactéria *F. nucleatum* é ainda capaz de co-agregação com inúmeras espécies de micro-organismos, principalmente *P. gingivalis* (Field et al., 2012) e também é capaz de produzir base, neutralizando assim ácidos que possam estar presentes no ambiente bucal, mantendo o pH do biofilme dentário adequado à colonização de bactérias (Takahashi et al., 1997). O complexo bacteriano formado por *F. nucleatum* e *P. gingivalis* proporciona um ambiente favorável à colonização de outras bactérias anaeróbias estritas, além de exercer papel na apoptose celular (Ahn et al., 2016).

Localizada na membrana exterior está a molécula lipopolissacarídeo (LPS), componente característico de bactérias Gram-negativas, que facilita a invasão celular aos tecidos periodontais, sendo importante no estímulo da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6 pelas células imunes (Champagne et al., 2003). Assim, para bloquear a evolução da doença periodontal, o uso de agentes moduladores que bloqueiam a síntese desses mediadores inflamatórios pode ser eficaz (Choi et al., 2015).

Níveis significativamente maiores de *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* são encontrados em indivíduos com doença periodontal, quando comparados a indivíduos saudáveis (Boutaga et al., 2006; Rodrigues et al., 2018). *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b, micro-organismo altamente virulento, é fortemente relacionado à periodontite agressiva (Yang et al., 2005, Mínguez et al., 2016), sendo esta uma forma de periodontite severa e com rápida progressão da doença, acometendo frequentemente indivíduos jovens (Albandar, 2014).

A microbiota oral apresenta uma complexa população de micro-organismos comensais (Pearce et al., 1995), entre eles, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*, que são uns dos primeiros colonizadores da cavidade oral de neonatos (Pearce et al., 1995; Seow et al., 2009; Couvigny et al., 2018) e exercem papel importante na modulação do sistema imune do hospedeiro, estimulando o recrutamento de leucócitos, iniciando a inflamação (Engen et al., 2018) e gerando uma regulação metabólica do hospedeiro (Couvigny et al., 2015).

Apesar de *S. mitis* estar contido no complexo amarelo de Socransky, este complexo, juntamente com o azul, verde e violeta, é parte da base da pirâmide da formação do biofilme, estando relacionado à colonização inicial de superfícies sólidas e fornecendo condições adequadas para colonização de bactérias periodontopatogênicas do complexo laranja, que por sua vez cria condições favoráveis à colonização do complexo vermelho (Socransky, Haffajee, 2002).

É verificado um aumento na contagem de *Streptococcus* spp. em indivíduos com periodontite comparado a indivíduos saudáveis, embora ambos apresentem essa bactéria (Ximénez-Fyvie et al., 2000). A doença periodontal está relacionada ao aumento de micro-organismos Gram-negativos, que durante a progressão da doença faz com que o número de *Streptococcus* seja reduzido no biofilme dental (Aruni et al., 2015). O consumo de oxigênio pelos *Streptococcus* gera uma diminuição do mesmo no biofilme, favorecendo a colonização de bactérias anaeróbias periodontopatogênicas (Popova et al., 2014).

A redução dos periodontopatógenos é o foco da terapia convencional inicial; envolvendo raspagem, aplainamento radicular, e instruções de higiene oral (Haffajee et al., 2006). Uma outra estratégia usada é a associação de antibióticos ao tratamento de remoção mecânica, administrados de forma local ou sistêmica. Ambas formas de administração antibiótica possuem vantagens e limitações, e devem ser utilizadas baseando-se em alguns fatores como, o local de distribuição e concentração da droga, seu potencial terapêutico, efeitos adversos e limitações clínicas (Jepsen, Jepsen, 2006). Entretanto, essas formas de terapia são ineficientes em alguns pacientes com doença periodontal severa, devido a inúmeras causas, entre elas a microbiota subgingival resistente (Herrera et al., 2002).

Novas terapias de prevenção e como tratamento adjunto das doenças periodontais têm sido estudadas. Entre elas está a administração de bactérias

benéficas, com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Teughels et al., 2013). Estes são os probióticos, definidos internacionalmente como micro-organismos vivos que trazem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em doses adequadas (Sanders, 2008). Numerosos mecanismos de ação dos probióticos têm sido propostos, como inibição da adesão e colonização do patógeno e da formação do biofilme (Jiang et al., 2016), inibição das moléculas inflamatórias e da perda óssea (Maekawa, Hajishengallis, 2014), estimulação e modulação do sistema imune inato e específico do hospedeiro (Thomas et al., 2016). Os probióticos ainda protegem os tecidos bucais contra patógenos periodontais e cariogênicos (Köll-Klais et al., 2005; Çaglar et al., 2005).

A maioria dos probióticos pertence ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Shah et al., 2013). As principais espécies que pertencem ao gênero *Lactobacillus* são *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. gasseri* e *L. reuteri* (Haukioja et al., 2006). Os probióticos do gênero *Lactobacillus* têm a capacidade de inibir o crescimento de patógenos periodontais (Köll-Klais et al., 2005) e produzir componentes antimicrobianos como ácidos orgânicos (Neal-McKinney et al., 2012).

L. reuteri é uma bactéria ácido-láctica residente no trato gastrointestinal de humanos e de alguns animais como rato, porco, galinha e peru, além de também ser encontrada no trato urogenital de humanos e leite materno (Oh et al., 2010; Spinler et al., 2014). Estudos têm demonstrado seu efeito na produção de vitaminas do complexo B, como ácido fólico (B9), colabamina (B12) (Taranto et al., 2003; Ricci et al., 2015), no aumento da vitamina D circulante (Jones et al., 2013), na supressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF (Hemarajata et al., 2013) e no aumento da massa óssea, devido à redução da osteoclastogênese (Britton et al., 2014). Esta espécie produz reuterina, uma substância de amplo espectro antimicrobiano que induz o estresse oxidativo em organismos patogênicos (Schaefer et al., 2010).

Devido ao seu papel de potencial melhora na saúde e funções imunossupressoras, os probióticos têm recebido atenção em odontologia (Karimi et al., 2016; Thomas et al., 2016). Seu uso está relacionado à redução do volume do líquido crevicular (Twetman et al., 2009; Flichy-Fernández et al., 2015), da profundidade da sondagem (Vivekananda et al., 2010; Tekce et al., 2015) e da síntese de citocinas (Twetman et al., 2009; McCabe et al., 2013; Szkaradkiewicz et al., 2014;

Flichy-Fernández et al., 2015), além da diminuição do índice de placa, índice gengival e índice de sangramento à sondagem (Vivekananda et al., 2010; Vicario et al., 2013; Tekce et al., 2015; Sajedinejad et al., 2018). Relaciona-se também à diminuição do crescimento de bactérias, como *Streptococcus mutans* (Lin et al., 2017) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Sajedinejad et al., 2018), além da diminuição da cariogenicidade de *S. mutans* e *Candida albicans* (Fernández et al., 2015; Krzyściak et al., 2017). Apesar de inúmeros estudos clínicos exibirem resultados extremamente encorajadores que suportam o uso de probióticos para a doença periodontal, estudos que avaliam seus efeitos antimicrobianos sobre periodontopatógenos, em condições controladas, ainda são encontrados em menor número na literatura (Zhu et al., 2010; Baca-Castañón et al., 2015; Elavaruso et al., 2016; Jiang et al., 2016).

Em revisão de literatura realizada por Teughels et al. (2011), foi averiguada a atuação dos probióticos na microbiota periodontal e seus efeitos na saúde periodontal. Verificou-se que os métodos utilizados na literatura até então não foram totalmente apropriados para analisar a utilidade dos probióticos na cavidade oral. Segundo os autores, os estudos analisados utilizaram amostras pequenas, havia falta de randomização, cegamento e grupo controle. Deste modo, foi considerado antecipado concluir sobre o significado clínico e estatístico dos estudos, devido às suas limitações. Em seu estudo de revisão, Dhingra (2012) também verificou que ainda existem limitações nos ensaios clínicos, não havendo evidências científicas significativas que suportem a eficácia dos probióticos na doença periodontal. Por outro lado, na revisão sistemática e meta-análise realizada por Gruner et al. (2016), foi demonstrada redução significativa na profundidade de sondagem e diminuição do sangramento gengival. Martin-Cabezas et al. (2016), através de uma revisão sistemática e meta-análise, também verificaram a eficácia dos probióticos como terapia adjuvante ao tratamento não cirúrgico da doença periodontal. Os resultados encontrados sustentam o uso de *L. reuteri* como adjuvante de curto prazo associado à raspagem e aplainamento radicular, principalmente em bolsas profundas. Contudo, os resultados devem ser interpretados com cautela devido às diferentes metodologias utilizadas, que envolvem diferentes formas de administração de probióticos, sendo comprimidos, gomas de mascar, enxaguantes bucais, entre outros. Além dos benefícios do uso de probióticos em doença periodontal, Lin et al. (2018) em seu

estudo de revisão, demonstraram os benefícios do uso de bactérias viáveis na prevenção de cáries dentais.

Os probióticos, no entanto, podem apresentar efeitos adversos na saúde. Wagner et al. (1997) em estudo em ratos, sugeriram que hospedeiros com sistema imune deficiente, principalmente neonatos, apresentam risco elevado para sepse devido ao uso de probióticos. Infecções severas causadas por *Lactobacillus* apresentam, porém, baixa incidência. Em pessoas saudáveis não foram relatados casos que correlacionassem sepse a probióticos. Rautio et al. (1999) reportaram um caso de infecção severa em idosa diabética, 4 meses após início do uso diário de probiótico. Casos de bacteremia e fungemia probiótica foram relacionados a indivíduos com sistema imune comprometido ou doenças crônicas (Boyle et al., 2006). Besselink et al. (2008) verificaram que o tratamento com bactérias viáveis aumentou a resposta inflamatória e o comprometimento das funções da barreira das mucosas. Além disso, apesar de *Streptococcus mutans* ser um dos principais agentes etiológicos da cárie, também se observa a presença de algumas espécies de *Lactobacillus* envolvidos no processo cariogênico nesses indivíduos (Caufield et al., 2015). Uma alternativa para tais efeitos adversos é inativar o micro-organismo, mantendo as suas propriedades benéficas (Lopez et al., 2008).

Os termos “paraprobiótico” ou “probiótico fantasma” são propostos para células microbianas não viáveis, estejam elas intactas ou rompidas, ou extratos de células, que promovem benefícios quando administradas em quantidades ideais (Taverniti, Guglielmetti, 2011). Após a inativação, é possível conferir às bactérias efeitos potencialmente inofensivos (Ananta, Knorr, 2009). Células viáveis e inativas podem desencadear a mesma resposta imune por mecanismos de ação diferentes (Taverniti, Guglielmetti, 2011). Foi demonstrada diminuição da produção de imunoglobulina E, em ratos tratados com *Lactobacillus casei* inativado pelo calor, sugerindo assim uma inibição das células Th2 (Matsuzaki, Chin, 2000). Além disso, foi observado que diferentes espécies de *Lactobacillus* inativados pelo calor, exerceram atividade antimicrobiana sobre a bactéria *Helicobacter pylori* (Holz et al., 2015; Aiba et al., 2017). Entretanto estudos que avaliam o potencial antimicrobiano dos paraprobióticos ainda são escassos na literatura.

A doença periodontal e o uso de probióticos têm sido analisados através de modelos experimentais, tanto *in vitro* como *in vivo*. O modelo *in vitro* é extremamente

eficaz e útil, porém limitado em relação à resposta do hospedeiro (Pai et al., 2016). Dessa forma, invertebrados têm sido utilizados como um importante modelo de infecção experimental, devido às suas semelhanças, estruturais e funcionais, com o sistema imune inato dos mamíferos (Vilmos, Kurucz, 1998). *Galleria mellonella* é um inseto invertebrado, da espécie lepidóptero, família *Pyralidae* (Wojda, 2016). Apresenta inúmeras vantagens como criação e manutenção acessíveis, baixo custo (Binder et al., 2016) e sobrevivência em ambientes até 37 °C (Browne et al., 2013; Grounta et al., 2016). Além disso, variando entre 1,5 e 2,5 cm, o comprimento da lagarta permite sua manipulação e inoculação de micro-organismos, e também uma fácil obtenção da hemolinfa (Grounta et al., 2016). Geraldo (2017) utilizou em seu trabalho o modelo de *G. mellonella* para avaliar os efeitos imunomoduladores de *L. reuteri* vivo, morto e seu sobrenadante sobre infecção com *P. gingivalis*, com resultados encorajadores, visto que as preparações com o micro-organismo vivo e inativo (ambos 10^8 células/ml) aumentaram significativamente a sobrevivência das lagartas. No entanto, houve um aumento na contagem de hemócitos somente no grupo que recebeu *L. reuteri* vivo + *P. gingivalis* (ambos 10^7 células/ml), porém estatisticamente igual ao controle PBS.

A hemolinfa da lagarta contém 6 tipos de hemócitos, que compreendem a resposta imune celular, capazes de combater micro-organismos invasores (Price, Ratcliffe, 1974; Vertyporokh et al., 2015). Através da densidade hemocitária, é possível avaliar a resposta do hospedeiro frente ao agente agressor (Bergin et al., 2003). Existe uma estreita correlação entre a quantidade de hemócitos e a patogenicidade do micro-organismo, sendo a alta patogenicidade relacionada à diminuição significativa do número de hemócitos, enquanto que os micro-organismos menos patogênicos estão relacionados a uma pequena variação na contagem de hemócitos quando comparados ao controle (Bergin et al., 2003).

A possibilidade de tratar doenças bucais com um método natural, não invasivo e não estressante tem apelo importante, e pode prevenir problemas relacionados com tratamentos farmacológicos, como a resistência antibiótica. O uso do sobrenadante livre de células ao invés de bactérias viáveis também é interessante, porque apresenta aplicação mais ampla e fácil, especialmente para as doenças que envolvem o sistema imune para prevenir uma carga antigênica contínua. Frente à necessidade de novas alternativas terapêuticas ou adjuntas ao tratamento para doença periodontal, e ao

sucesso do uso de *L. reuteri* em alguns estudos clínicos, levantamos a hipótese de que paraprobióticos derivados de *L. reuteri* podem também ser efetivos em casos de infecção por periodontopatógenos. O estudo dos efeitos do lactobacilo vivo, morto e de seus produtos pode esclarecer mecanismos de ação do probiótico, e possibilitar o uso comercial de outras preparações, dado que os paraprobióticos teriam produção facilitada e maior tempo de prateleira.

2 PROPOSIÇÃO

A fim de entender os mecanismos de ação de *L. reuteri* Prodentis®, o lactobacilo mais utilizado nos estudos clínicos periodontais, assim como o potencial de seus produtos e da bactéria inativada, os objetivos gerais do presente trabalho são:

- a) avaliar os efeitos antimicrobianos de preparações de *L. reuteri* Prodentis® sobre *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*, bactérias fortemente associadas a doença periodontal e sobre *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*, bactérias comensais associadas a saúde bucal;
- b) analisar os efeitos antimicrobianos de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* sobre *L. reuteri* Prodentis® vivo;
- c) estudar os efeitos da interação *L. reuteri* Prodentis® vivo, inativado e de seus produtos com periodontopatógenos em modelo de invertebrado (*Galleria mellonella*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Lactobacillus reuteri*

Neste estudo foi utilizado *L. reuteri* Prodentis® (ATCC PTA 5289 associado à DSM 17938). Para ativação desse micro-organismo, um comprimido da preparação comercial Periobalance Sunstar® (BioGaia, Chicago, Illinois, EUA) foi diluído em 10 ml de solução tampão fosfato salina (PBS) estéril, por aproximadamente 10 min em Vórtex. A solução foi semeada pela técnica de esgotamento em Ágar de Man Rogosa-Sharpe (MRS) e também em caldo MRS, sendo cultivada em câmara de anaerobiose (Hidrogênio 9,974% Mol/Mol; Dióxido de Carbono 10,020% Mol/Mol; Nitrogênio para balanço) a 37 °C por no mínimo, 24 horas. Colônias isoladas foram confirmadas pela coloração de Gram a partir do ágar. A cultura em caldo, que também foi confirmada pela coloração de Gram, foi centrifugada (4700 rpm por 5 min), os sedimentos foram ressuspensos em PBS e foram realizadas suspensões do micro-organismo, padronizadas em espectrofotômetro (570 nm), onde a densidade óptica (DO)=1.0 correspondeu a 10⁸ células/ml. O dado foi confirmado após semeadura em ágar MRS, em duplicata.

A preparação do sobrenadante utilizado foi baseada na metodologia de Schaefer et al. (2010). Após o crescimento em caldo MRS por 24 horas, os micro-organismos foram centrifugados (4700 rpm por 5 min) e lavados 2 vezes com solução tampão fosfato de sódio 50 mM. Após a lavagem, aproximadamente 150 mg de bactérias foram ressuspensas em 15 ml de glicerol 250 mM. O glicerol é a matéria-prima para a produção de reuterina. A solução foi incubada a 37 °C em câmara de anaerobiose, durante 2 horas. Após este período, foi centrifugada (4700 rpm por 5 min), o sobrenadante recolhido e esterilizado com filtro de membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm. Nos experimentos seguintes *in vitro* e *in vivo*, utilizamos um grupo tratado com glicerol no intuito de analisar se o efeito antimicrobiano está relacionado à produção da reuterina ou ao glicerol.

Para a inativação da bactéria, após 24 horas de cultivo em caldo MRS, a solução foi centrifugada (4700 rpm por 5 min). Os sedimentos foram ressuspensos

em PBS e foi realizada suspensão padronizada em espectrofotômetro (DO=1.0; comprimento de onda de 570 nm). Depois disso, a suspensão padronizada de *L. reuteri* vivo foi autoclavada a 121 °C por 20 minutos (Chuang et al., 2016).

Tanto a preparação da bactéria inativada como o sobrenadante foram semeados em ágar MRS para confirmar a ausência de células vivas.

3.2 *Fusobacterium nucleatum*

A cepa de *F. nucleatum* (ATCC 25586), adquirida comercialmente (Microbiologics, Saint Cloud, Minnesota, USA), foi cultivada em ágar Brucella suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e 1% de solução de hemina e menadiona, em câmara de anaerobiose à 37 °C, durante 5 dias.

Colônias isoladas foram confirmadas pela coloração de Gram a partir do ágar. Após, colônias isoladas foram ressuspensas em PBS e realizadas suspensões do micro-organismo, padronizadas em espectrofotômetro (DO=1.0 correspondeu a 10^6 células/ml, DO=2.0 correspondeu a 10^8 células/ml, DO=3.0 correspondeu a 10^9 células/ml; comprimento de onda de 550 nm). O dado foi confirmado após duplicata.

3.3 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

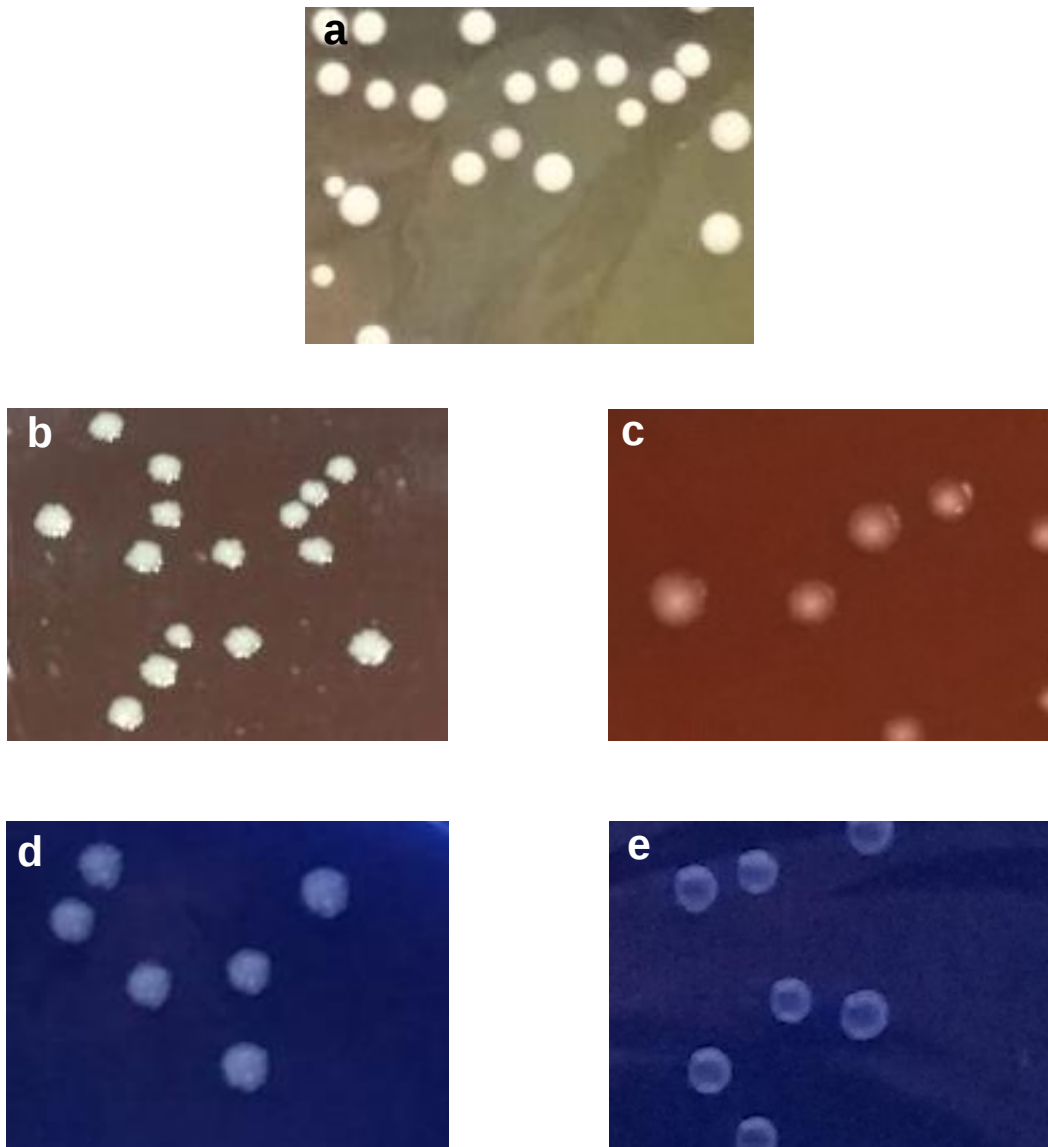
A cepa de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29522), adquirida comercialmente (Microbiologics, Saint Cloud, Minnesota, USA), foi cultivada em ágar Brucella suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e 1% de solução de hemina e menadiona, em câmara de anaerobiose à 37 °C, durante 5 dias.

Colônias isoladas foram confirmadas pela coloração de Gram a partir do ágar. Após, colônias isoladas foram ressuspensas em PBS e realizadas suspensões do micro-organismo, padronizadas em espectrofotômetro (DO=1.0 correspondeu a 10^7 células/ml, DO=2.0 correspondeu a 10^8 células/ml, DO=3.0 correspondeu a 10^9 células/ml; comprimento de onda de 600 nm). O dado foi confirmado após duplicata.

3.4 *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*

Foram utilizadas cepa de *S. salivarius* (INCQS 00457) e *S. mitis* (INCQS 00456), ambas adquiridas do banco de cepas da Fiocruz, cultivadas em ágar Mitis-Salivarius e caldo BHI, em estufa bacteriológica (5% de CO₂) a 37 °C, repicadas a cada 24 h, durante 3 dias. Os micro-organismos foram padronizados em PBS a uma concentração de 10⁷ células/ml em espectrofotômetro (DO= 1.0; comprimento de onda de 660 nm para *S. salivarius* e comprimento de onda de 600 nm para *S. mitis*). O dado foi confirmado após duplicata.

Figura 1 – a) Colônias de *L. reuteri* (ATCC PTA 5289 associado à DSM 17938) cultivadas em ágar MRS em anaerobiose; b) Colônias de *F. nucleatum* (ATCC 25586) cultivadas em ágar Brucella sangue enriquecido, em anaerobiose; c) Colônias de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29522) cultivadas em ágar Brucella sangue enriquecido, em anaerobiose; d) Colônias de *S. salivarius* (INCQS 00457) cultivadas em ágar Mitis-Salivarius, em aerobiose; e) Colônias de *S. mitis* (INCQS 00456) cultivadas em ágar Mitis-Salivarius, em aerobiose



Legenda: a) Colônias grandes, redondas, brancas, opacas, formato convexo; b) Colônias pequenas, brancas, formato circular irregular com aspecto de “migalhas de pão”; c) Colônias pequenas, formato circular irregular, coloração translúcida branca, o centro das colônias exibe coloração opaca em formato característico de “estrela”; d) Colônias convexas, brilhantes, quando cultivadas em ágar Mitis-Salivarius exibem coloração azulada, e) Colônias pequenas, achatadas, quando cultivadas em ágar Mitis-Salivarius exibem coloração azulada, com aparência de “vidro fosco” e apresentam centros escurecidos.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada baseando-se na metodologia proposta por Lin et al. (2015) com algumas alterações. Duzentos e cinquenta microlitros da suspensão padronizada em 10^7 células/ml de bactérias comensais/periodontopatogênicas (*S. salivarius*, *S. mitis*, *F. nucleatum* ou *A. actinomycetemcomitans*) foram adicionados à 250 μ L da preparação de 10^7 células/ml de *L. reuteri* vivo, morto, ou seu sobrenadante conforme descrito anteriormente, em tubos contendo 1,5 ml de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI). Foram realizados controles com *S. salivarius*, *S. mitis*, *F. nucleatum* ou *A. actinomycetemcomitans*, isoladamente, associados a PBS. Também foi realizado um grupo de interação de glicerol com as bactérias.

Os tubos foram incubados em câmara de anaerobiose ou estufa bacteriológica, dependendo do micro-organismo, por 72 horas, após o quê foram realizadas diluições seriadas decimais das culturas, e alíquotas de 100 μ L foram semeadas em placas de Petri contendo meios de cultura apropriados (água MRS para *L. reuteri*, água Mitis-Salivarius para *S. salivarius* e *S. mitis*; e água sangue Brucella suplementado com hemina e menadiona para *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*). Após as interações que envolveram o *L. reuteri* vivo, a observação do crescimento bacteriano em água MRS foi utilizada para avaliar os efeitos das bactérias bucais sobre o probiótico, enquanto o crescimento nos demais meios foi observado para se avaliar o efeito do *L. reuteri* e preparações sobre as bactérias bucais. As placas foram incubadas durante 5 dias para *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* e durante 3 dias para as demais bactérias. Após este período, as colônias foram contadas e as unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml) calculadas. Para todos os grupos foi utilizado n=5, sendo que para cada tubo de interação, foram confeccionadas 2 placas para contagem de UFC/ml por micro-organismo. Os dados foram confirmados após duplicata, em experimentos independentes.

O Quadro 1 ilustra os grupos que foram analisados.

Quadro 1 – Grupos experimentais analisados na atividade antimicrobiana de *L. reuteri* (vivo, sobrenadante e morto) e micro-organismos (*S. mitis*, *S. salivarius*, *F. nucleatum* ou *A. actinomycetemcomitans*)

Grupos		Ágar utilizado
Grupo LV	+ PBS	MRS
SS	+ PBS	Mitis-Salivarius
SM	+ PBS	Mitis-Salivarius
FN	+ PBS	Brucella sangue enriquecido
AA	+ PBS	Brucella sangue enriquecido
Grupo LV	+ SS	MRS e Mitis-Salivarius
	+ SM	MRS e Mitis-Salivarius
	+ FN	MRS e Brucella sangue enriquecido
	+ AA	MRS e Brucella sangue enriquecido
Grupo LM	+ SS	Mitis-Salivarius
	+ SM	Mitis-Salivarius
	+ FN	Brucella sangue enriquecido
	+ AA	Brucella sangue enriquecido
Grupo LS	+ SS	Mitis-Salivarius
	+ SM	Mitis-Salivarius
	+ FN	Brucella sangue enriquecido
	+ AA	Brucella sangue enriquecido
Grupo G	+ SS	Mitis-Salivarius
	+ SM	Mitis-Salivarius
	+ FN	Brucella sangue enriquecido
	+ AA	Brucella sangue enriquecido

Legenda: LV – *L. reuteri* Vivo, LM – *L. reuteri* Morto, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, G – Glicerol, SS – *S. salivarius*, SM – *S. mitis*, FN – *F. nucleatum*, AA – *A. actinomycetemcomitans*. Os grupos associados a PBS serão referidos no texto apenas como LV, SS, SM, FN e AA.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.6 Estudo em *Galleria mellonella*

3.6.1 Curva de Sobrevivência

Foram utilizadas *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal entre 190 - 230 mg, cultivadas no laboratório de invertebrados do ICT, UNESP. Todas as lagartas selecionadas apresentavam cor clara e livres de manchas e/ou pigmentos escuros em sua cutícula, que pode indicar comprometimento do animal por algum processo infeccioso, influenciando no resultado do experimento. Todos os ensaios, a seguir apresentados, foram repetidos ao menos duas vezes.

Diferentemente do estudo *in vitro*, onde foram utilizadas bactérias comensais no intuito de avaliar se *L. reuteri* seria capaz de influenciar a microbiota comensal, no estudo *in vivo*, foram utilizadas somente as bactérias *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*, no intuito de analisar o efeito de *L. reuteri* sobre bactérias periodontopatogênicas, em modelo de invertebrado.

Inicialmente, foi realizada a análise da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *L. reuteri*, para determinação da concentração dos micro-organismos a ser utilizada nos experimentos seguintes. Para isso, suspensões padronizadas de *F. nucleatum*, nas concentrações de 10^6 , 10^8 e 10^9 células/ml, *A. actinomycetemcomitans*, nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 células/ml ou *L. reuteri*, nas concentrações de 10^4 a 10^8 células/ml, foram inoculadas em *G. mellonella*. Para cada concentração inoculada, foi utilizado um grupo de 12 lagartas. Antes da inoculação, as seringas (Hamilton Inc., EUA) utilizadas para as injeções foram esterilizadas. Um inóculo de 10 µL de cada suspensão foi injetado em *G. mellonella*, na última prolegue esquerda. A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foi realizada a cada 4 injeções.

Os animais foram acondicionados em placas de Petri e incubados em estufa bacteriológica, a 37 °C no escuro. Diariamente, durante 7 dias, o número de lagartas mortas foi anotado. Foram consideradas mortas as lagartas que não apresentaram nenhum movimento ao toque por uma pinça metálica. Os animais mortos, assim que identificados, foram removidos dos grupos.

Depois de determinada a concentração de cada micro-organismo a ser

utilizada (10^8 células/ml) , um inóculo de 10 µL da suspensão padronizada de células vivas, sobrenadante, *L. reuteri* morto, glicerol ou PBS foram inoculados na última prolegue esquerda, 3 horas (profilaxia 3 h) e 24 horas (profilaxia 24 h) antes da inoculação da suspensão padronizada de *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* ou PBS, na última prolegue direita de 12 lagartas por grupo. O experimento foi realizado em duplicata. Como no estudo de suscetibilidade, o número de larvas mortas foi anotado diariamente, durante 7 dias, para determinação da curva de sobrevivência. O Quadro 2 ilustra os grupos experimentais e o número de lagartas utilizadas por experimento.

Quadro 2 - Grupos experimentais e número de lagartas utilizadas por experimento após inoculação de *L. reuteri* e periodontopatógenos, em modelo de *G. mellonella*

Grupo Experimental	Curva de sobrevivência		Densidade Hemocitária	Recuperação Microbiana
	3 h	24 h		
Infecção por FN ou AA (FN: 10^6 , 10^8 e 10^9 células/ml; AA: 10^7 , 10^8 e 10^9 células/ml) - estudo de susceptibilidade	12 por grupo		-	-
Infecção por LV (10^4 a 10^8 células/ml) - estudo de susceptibilidade	12 por grupo		-	-
LV + FN ou AA	12	12	12	12
LS + FN ou AA	12	12	12	12
LM + FN ou AA	12	12	12	12
G + FN ou AA	12	12	12	12
PBS + FN ou AA	12	12	12	12
LV + PBS	12	12	12	-
LM + PBS	12	12	12	-
LS + PBS	12	12	12	-
Controle PBS	12	12	12	-

Legenda: LV – *L. reuteri* Vivo, LM – *L. reuteri* Morto, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, G – Glicerol, FN – *F. nucleatum*, AA – *A. actinomycetemcomitans*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5 – a) Lagartas vivas após 1 h de inoculação de PBS; b) Lagartas vivas exibindo coloração escurecida após 1 h de infecção por *A. actinomycetemcomitans*; c) Lagartas mortas exibindo coloração extremamente escurecida após 24 h de infecção por *A. actinomycetemcomitans*



Fonte: Elaborado pela autora.

3.6.2 Densidade hemocitária

Para avaliação da densidade hemocitária, três larvas de cada grupo foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C durante 3 horas após a última injeção. A seguir, foi realizada uma pequena incisão no sentido longitudinal da larva, lateral à última prolegue esquerda. A hemolinfa extravasada de um pool de três lagartas foi coletada em eppendorfs e diluída solução anticoagulante (2% NaCl; 0,1 M glicose; 30 mM citrato de sódio; 26 mM ácido cítrico e 10 mM EDTA) na proporção de 1:10. A

determinação da concentração hemocitária foi realizada utilizando câmara de Neubauer. Para cada grupo foram analisados 4 pools de 3 lagartas, totalizando 12 animais (Quadro 2). O experimento foi realizado em duplicata.

3.6.3 Recuperação microbiana

Para a recuperação dos micro-organismos, foram realizadas diluições seriadas do pool da hemolinfa adquirida, que foram semeadas em placas de Petri, contendo o meio de cultura seletivo, ágar sangue Brucella suplementado com 1% de solução de hemina e menadiona. As placas foram incubadas sob condições de anaerobiose, por um período de 5 dias. As colônias foram contadas, após este período, para o cálculo de unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml). O experimento também foi realizado em duplicata.

3.7 Análise Estatística

Para os experimentos de sobrevivência em *G. mellonella* foi realizada a curva de sobrevivência e estimativa das diferenças pelo método de Log-rank (Mantel-Cox). Para os demais testes foi aplicado o teste de normalidade e após, realizado o teste ANOVA e pós hoc de Tukey quando necessário, ou Teste t. Em todos os testes, foi considerado nível de significância de 5% (GraphPad Prism 6).

4 RESULTADOS

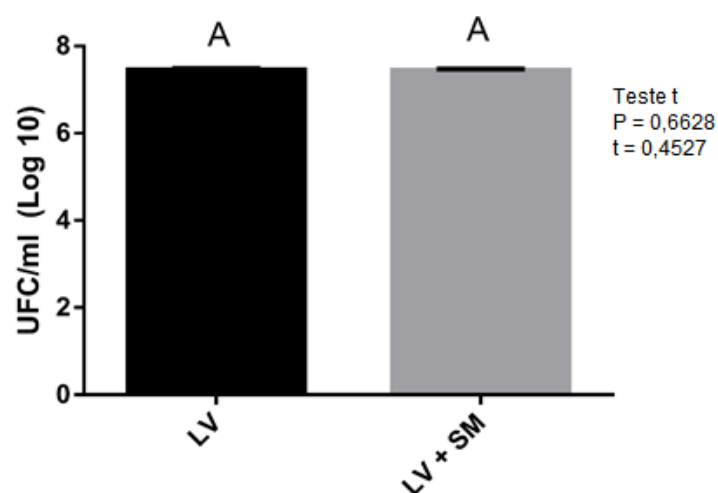
4.1 Atividade antimicrobiana

4.1.1 *L. reuteri* e preparações X *S. mitis*

Após a interação das suspensões padronizadas em 10^7 células/ml de *L. reuteri* e *S. mitis* foi realizada a contagem de UFC/ml em ágar. Os dados foram então submetidos à análise estatística (Teste t ou ANOVA).

Observou-se que não houve redução significativa de colônias entre os grupos LV e LV + SM, cultivados em ágar MRS para quantificação de *L. reuteri*, indicando que *S. mitis* não influencia o crescimento de *L. reuteri* (Figura 6).

Figura 6 - Médias e desvios-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10) de *L. reuteri* após interação em caldo BHI e cultivo em ágar MRS



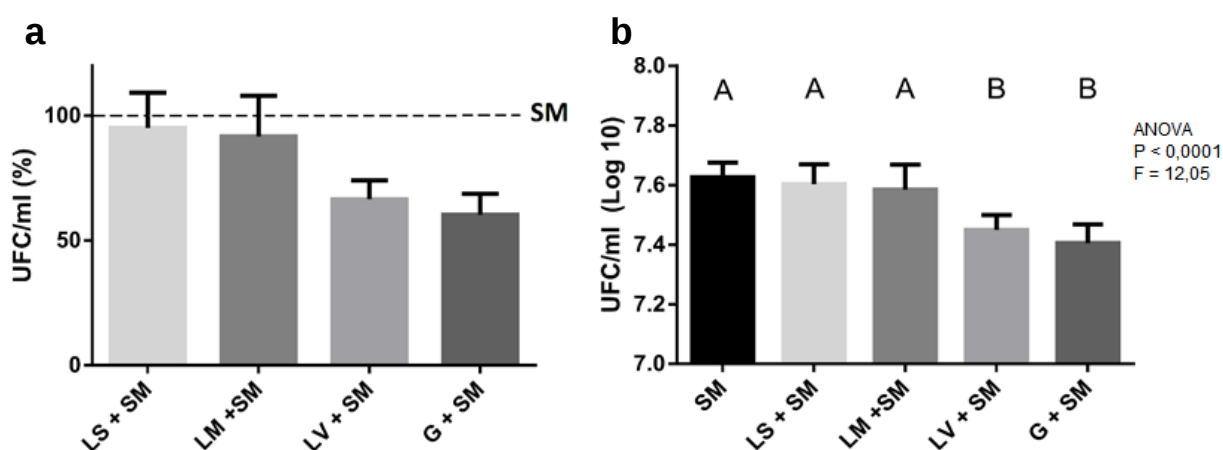
Legenda: LV – *L. reuteri* Vivo, SM - *S. mitis*. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste t.

Fonte: Elaborado pela autora.

Já a Figura 7a apresenta o percentual de *S. mitis* em contato com *L. reuteri*. Observa-se uma redução bacteriana de 33,43% no grupo LV + SM e 39,64% no grupo G + SM em comparação ao grupo controle SM (cultivado em ágar Mitis-Salivarius para quantificação de *S. mitis*), demonstrando que essas preparações foram capazes de inibir o crescimento de *S. mitis*.

As contagens de UFC/ml nos grupos LV+SM e G+SM foram significativamente menores que o grupo SM (Figura 7b), indicando que *L. reuteri* e o glicerol influenciaram o crescimento de *S.mitis* (cultivado em ágar Mitis-Salivarius).

Figura 7 – a) Percentual de crescimento de *S. mitis* nos diversos grupos, em relação ao controle (UFC/ml); b) Média e desvio-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10) de *S.mitis* após em interação em caldo BHI e cultivo em ágar Mitis-Salivarius



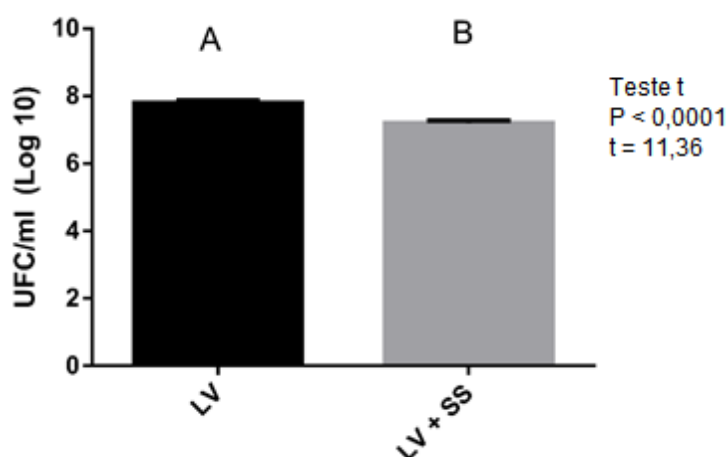
Legenda: SM – *S. mitis*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2 *L. reuteri* e preparações X *S. salivarius*

A interação de *L. reuteri* e *S. salivarius* também foi realizada após padronização das suspensões em 10^7 células/ml. As contagens de colônias foram realizadas em ágar e os dados então, submetidos à análise estatística (Teste t ou ANOVA).

Observou-se que houve redução significativa do percentual de colônias entre os grupos LV e LV + SS, cultivados em ágar MRS para quantificação de *L. reuteri*, indicando que *S. salivarius* reduziu o crescimento de *L. reuteri* (Figura 8).

Figura 8 – Médias e desvios-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10) de *L. reuteri* após em interação em caldo BHI e cultivo em ágar MRS



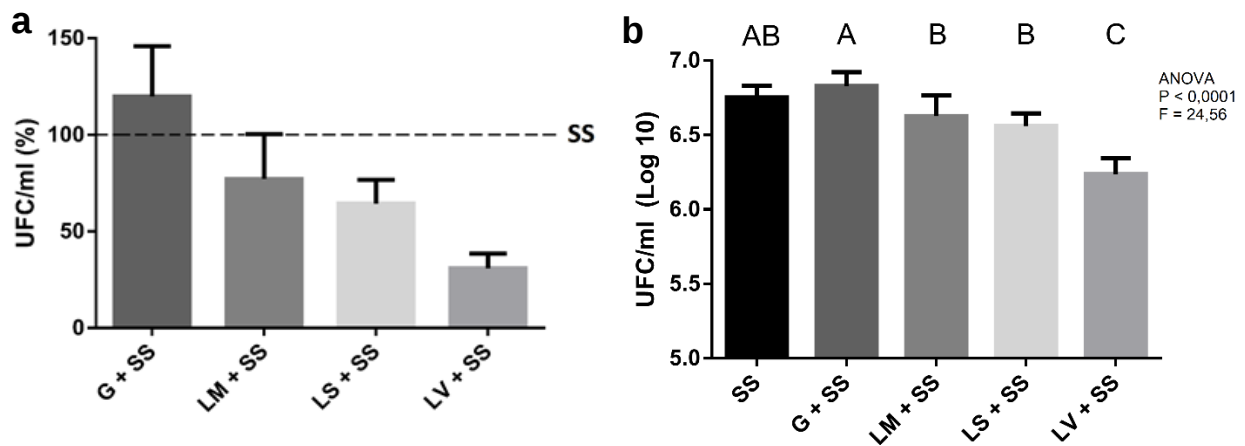
Legenda: LV – *L. reuteri* Vivo, SS – *S. salivarius*. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste t.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 9a observa-se o percentual de colônias de *S. salivarius* em contato com *L. reuteri*. Observa-se uma redução significativa de 69,1% no grupo LV + SS em comparação ao grupo controle SS (cultivado em ágar Mitis-Salivarius para quantificação de *S. salivarius*), demonstrando uma inibição deste micro-organismo.

Não houve diferenças estatísticas na contagem de UFC/ml entre os grupos SS, LM + SS e LS + SS, diferentemente do grupo LV+SS, que foi significativamente menor que os demais (Figura 9b), indicando que *L. reuteri* vivo influenciou no crescimento de *S. salivarius* (cultivado em ágar Mitis-Salivarius).

Figura 9 – a) Percentual de crescimento de *S. salivarius* nos diversos grupos, em relação ao controle (UFC/ml); b) Média e desvio-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10) de *S. salivarius* após em interação em caldo BHI



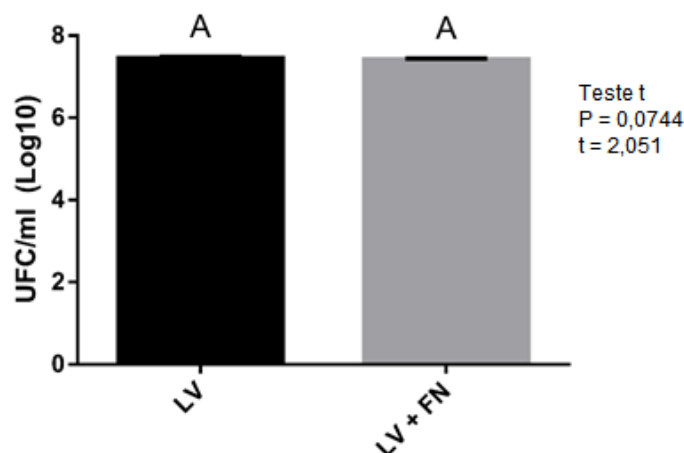
Legenda: SS – *S. salivarius*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.3 *L. reuteri* e preparações X *F. nucleatum*

Após a interação das suspensões padronizadas em 10^6 células/ml de *L. reuteri* e *F. nucleatum*, foi realizada a contagem de UFC/ml em ágar. Os dados foram então submetidos à análise estatística (ANOVA ou Teste t).

Observou-se que não houve redução significativa do percentual de colônias entre os grupos LV e LV + FN, cultivados em ágar MRS para quantificação de *L. reuteri* (Figura 10), indicando que *F. nucleatum* não influencia o crescimento de *L. reuteri*.

Figura 10 – Médias e desvios-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10) de *L. reuteri* após interação em caldo BHI e cultivo em ágar MRS



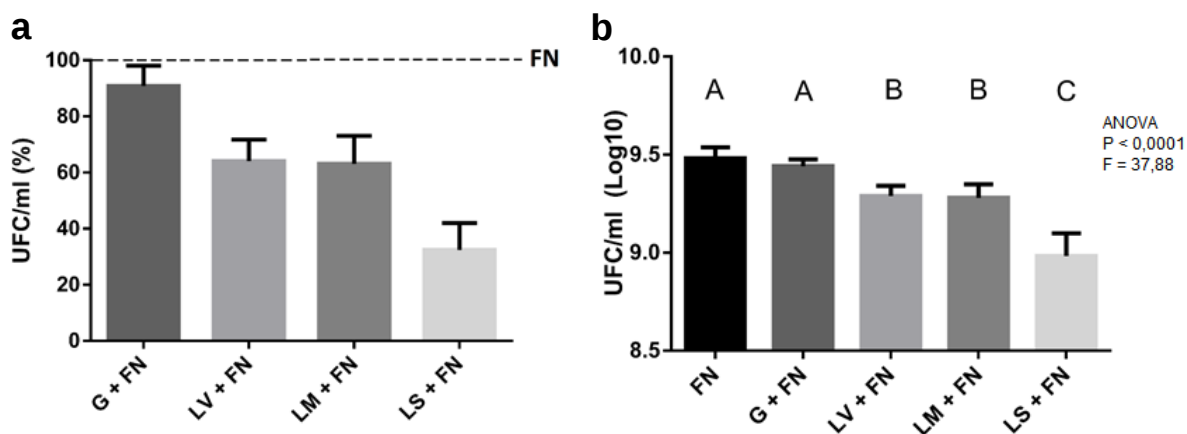
Legenda: LV – *L. reuteri* Vivo, FN – *F. nucleatum*. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste t.

Fonte: Elaborado pela autora.

Já na Figura 11a observa-se o percentual de colônias de *F. nucleatum* após contato com *L. reuteri*. Houve uma redução de 35,86% no grupo LV + FN, 36,91% no grupo LM + FN e 67,54% no grupo LS + FN em comparação ao grupo FN (cultivado em ágar sangue para quantificação de *F. nucleatum*).

Na Figura 11b observa-se uma redução significativa na contagem de UFC/ml nos grupos LV + FN, LM + FN e LS + FN, quando comparados ao grupo FN. Esses resultados indicam que *L. reuteri* reduziu o crescimento de *F. nucleatum* (cultivado em ágar sangue), observando-se que sua preparação de sobrenadante demonstrou a maior redução.

Figura 11 – a) Percentual de crescimento de *F. nucleatum* nos diversos grupos, em relação ao controle (UFC/ml); b) Média e desvio-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10) de *F. nucleatum* após em interação em caldo BHI e cultivo em ágar sangue Brucella suplementado



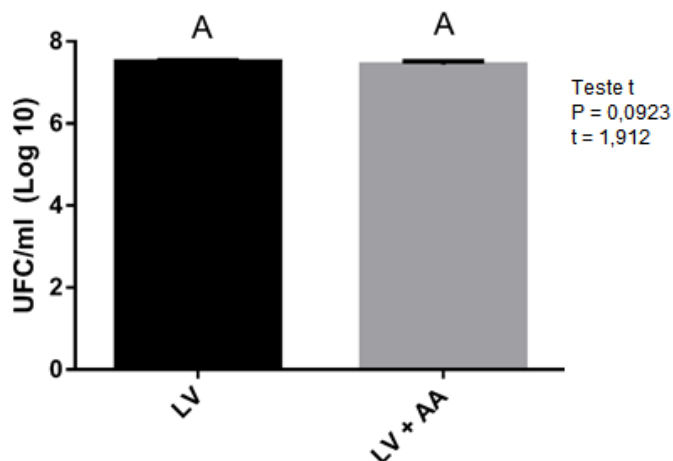
Legenda: FN – *F. nucleatum*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.4 *L. reuteri* e preparações X *A. actinomycetemcomitans*

Após a interação das suspensões padronizadas em 10^7 células/ml de *L. reuteri* e *A. actinomycetemcomitans*, foi realizada a contagem de UFC/ml e os dados submetidos à análise estatística (ANOVA ou teste t).

Observou-se que não houve redução significativa do percentual de colônias entre os grupos LV e LV + FN, cultivados em ágar MRS para quantificação de *L. reuteri* (Figura 12), indicando que *A. actinomycetemcomitans* não influenciou no crescimento de *L. reuteri*.

Figura 12 – Médias e desvios-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10) de *L. reuteri* após interação em caldo BHI e cultivo em ágar MRS



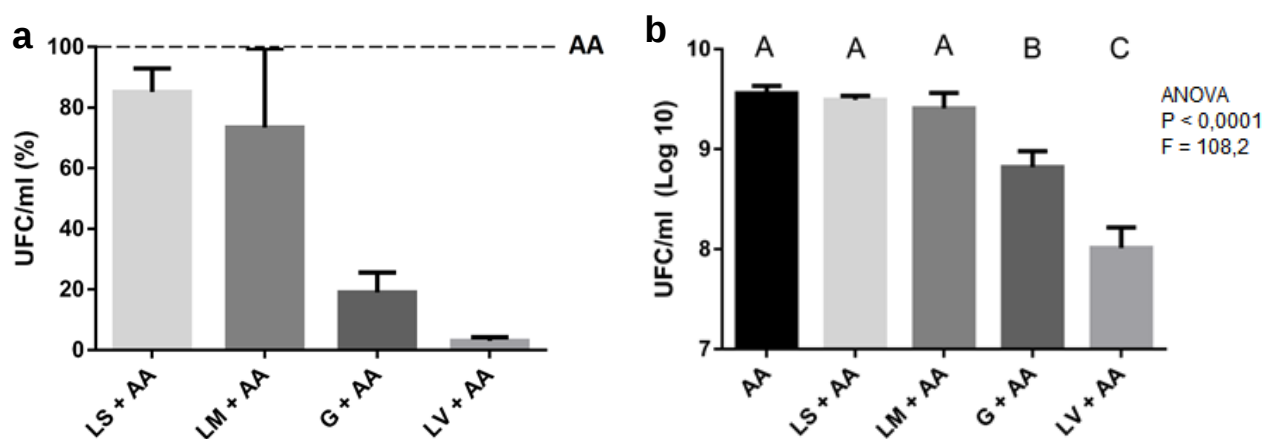
Legenda: LV – *L. reuteri* Vivo, AA – *A. actinomycetemcomitans*. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste t.

Fonte: Elaborado pela autora.

Já na Figura 13a observa-se o percentual de colônias de *A. actinomycetemcomitans* após contato com *L. reuteri*. Houve uma redução de 80,99% no grupo G + AA e 96,95% no grupo LV + AA em comparação ao grupo AA (cultivado em ágar sangue para quantificação de *A. actinomycetemcomitans*), demonstrando que essas preparações inibiram o crescimento de *A. actinomycetemcomitans*.

A Figura 13b demonstra que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos LS + AA e LM + AA, quando comparados ao grupo AA. Entretanto, observa-se uma redução significativa na contagem de UFC/ml nos grupos G + AA e LV + AA, quando comparados ao grupo AA. Esses resultados indicam que *L. reuteri* vivo apresentou os melhores resultados na redução do crescimento de *A. actinomycetemcomitans*.

Figura 13 – a) Percentual de crescimento de *A. actinomycetemcomitans* nos diversos grupos, em relação ao controle (UFC/ml); b) Média e desvio-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10) de *A. actinomycetemcomitans* após em interação em caldo BHI e cultivo em ágar sangue Brucella suplementado



Legenda: AA – *A. actinomycetemcomitans*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Curva de sobrevivência

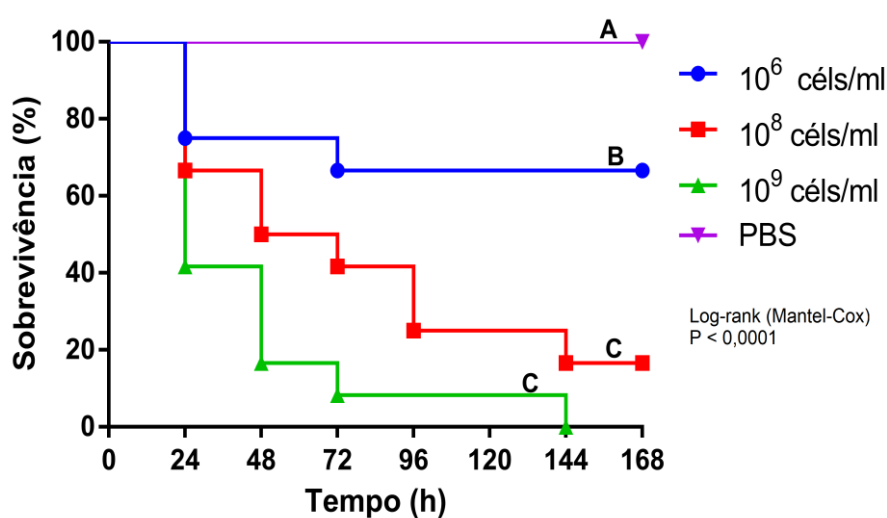
4.2.1 Estudo da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *L. reuteri* e a periodontopatógenos

Inicialmente foi avaliada a suscetibilidade da *Galleria mellonella* à inoculação de *L. reuteri*. Após sete dias de infecção por *L. reuteri*, as lagartas demonstraram 100% de sobrevivência em todas as concentrações testadas (10^4 a 10^8 células/ml). Isto demonstra que este micro-organismo não gerou toxicidade às lagartas. Sendo assim, baseado nesses resultados foi escolhida a concentração de 10^8 células/ml de *L. reuteri* para avaliar os efeitos desse micro-organismo na infecção por periodontopatógenos em *G. mellonella*. Após, foi realizada a suscetibilidade da lagarta à inoculação de *L. reuteri* morto (10^8 células/ml) e seu sobrenadante. Ambos demonstraram 100% de sobrevivência após 7 dias de infecção.

A suscetibilidade da *G. mellonella* à inoculação por periodontopatógenos também foi avaliada. Após sete dias de infecção por *F. nucleatum*, não houve

diferença estatística significativa entre as concentrações 10^8 células/ml e 10^9 células/ml (Log-rank (Mantel-Cox), $P = 0,067$). Com base nesses resultados a concentração escolhida para a infecção desse micro-organismo em *G. mellonella* foi de 10^8 células/ml (Figura 14).

Figura 14 – Curva de sobrevivência *G. mellonella* após infecção com diferentes concentrações de *F. nucleatum*

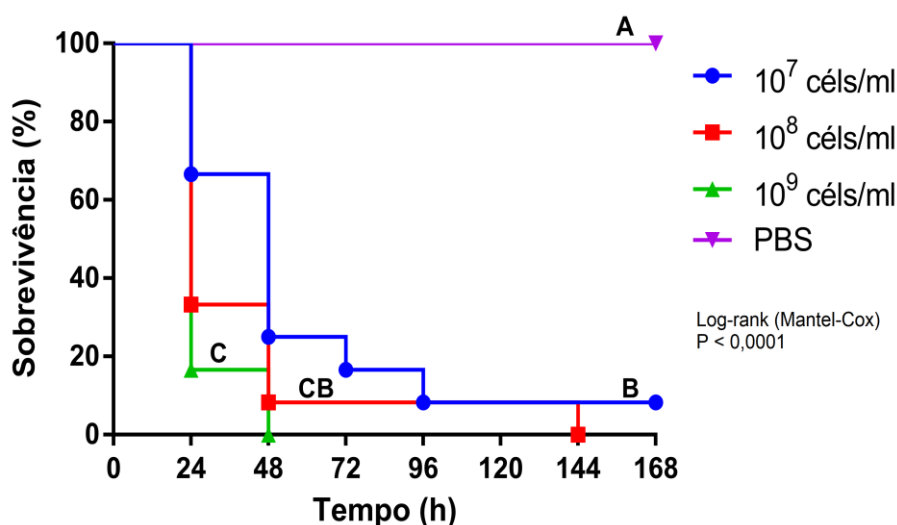


Legenda: Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste Log-rank (Mantel-Cox).
Fonte: Elaborado pela autora.

A concentração escolhida baseada na curva de sobrevivência de *A. actinomycetemcomitans* também foi de 10^8 células/ml. Verificou-se que não houve diferença estatística entre as concentrações 10^8 e 10^9 células/ml (Log-rank (Mantel-Cox), $P = 0,2591$) (Figura 15).

Em nenhum dos experimentos houve mortalidade de *G. mellonella* nos grupos que receberam apenas PBS.

Figura 15 – Curva de sobrevivência *G. mellonella* após infecção com diferentes concentrações de *A. actinomycetemcomitans*



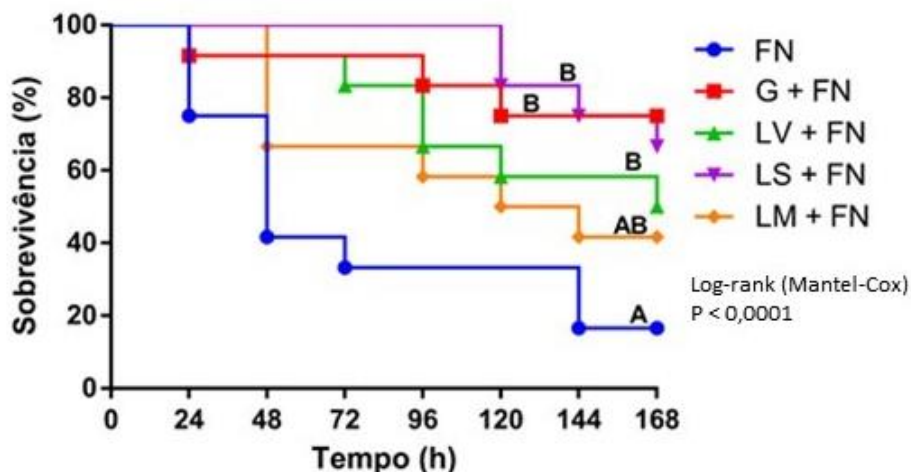
Legenda: Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste Log-rank (Mantel-Cox).
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 Estudo da interação entre *L. reuteri* e *F. nucleatum* em *G. mellonella*

A sobrevivência das lagartas foi observada durante 7 dias. A Figura 16 ilustra os resultados da inoculação profilática de *L. reuteri* 3 h antes da inoculação por *F. nucleatum*.

Após 168 horas, observou-se mortalidade de 83,33% no grupo FN. Os grupos G+FN (25%) e LS + FN (33,33%) demonstraram as menores taxas de mortalidade, seguido dos grupos LV + FN (50%) e LM + FN (58,33%). O grupo LM + FN, apesar de aumentar a taxa de sobrevivência das gallerias em 33,33% quando comparada ao grupo FN, não apresentou diferença estatisticamente significativa (Log-rank (Mantel-Cox), P = 0,1194). Os grupos LS + FN e LV + FN (Log-rank (Mantel-Cox), P = 0,2855) não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si.

Figura 16 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* após interação de *L. reuteri* e preparações (profilaxia 3 h) e *F. nucleatum*

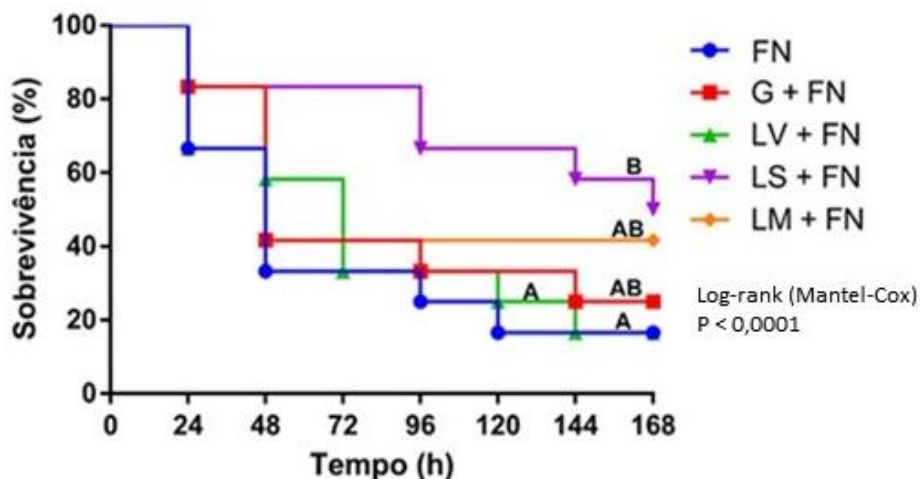


Legenda: FN – *F. nucleatum*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste Log-rank (Mantel-Cox).
Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 17 ilustra os resultados da inoculação de *L. reuteri* e preparações 24 horas antes da inoculação por *F. nucleatum*.

O grupo LS + FN aumentou 33,33% a taxa de sobrevivência das lagartas quando comparado ao grupo FN, com diferença estatisticamente significativa (Log-rank (Mantel-Cox), $P = 0,0352$). Já o grupo LM, apesar de aumentar a taxa de sobrevivência das gallerias em 25%, não foi estatisticamente diferente do controle FN (Log-rank (Mantel-Cox), $P = 0,195$). Quando comparados entre si, os grupos LS + FN e LV + FN, demonstraram diferença estatisticamente significativa (Log-rank (Mantel-Cox), $P = 0,041$).

Figura 17 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* após interação de *L. reuteri* e preparações (profilaxia 24 h) e *F. nucleatum*



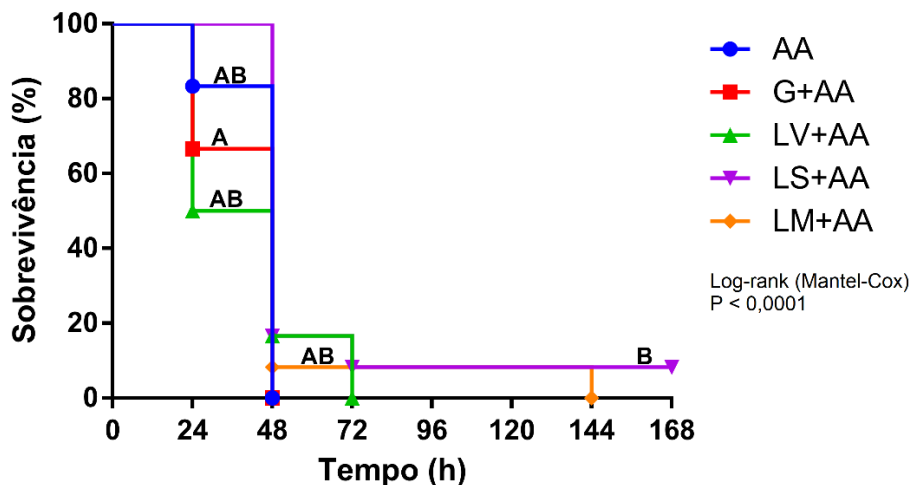
Legenda: FN – *F. nucleatum*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste Log-rank (Mantel-Cox).
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.3 Estudo da interação entre *L. reuteri* e *A. actinomycetemcomitans* em *G. mellonella*

A sobrevivência das lagartas foi observada durante 7 dias após inoculação de *L. reuteri* 3 horas antes da inoculação por *A. actinomycetemcomitans*. A Figura 18 ilustra esses resultados.

Apesar do *L. reuteri* vivo, morto e seu sobrenadante aumentarem o tempo de sobrevivência de parte das lagartas, não houve diferença estatisticamente significativa entre esses grupos quando comparados entre si e quando comparados ao grupo AA. O grupo glicerol demonstrou uma mortalidade de 100% em 48h, o que foi estatisticamente diferente do grupo sobrenadante (Log-rank (Mantel-Cox), $P = 0,015$).

Figura 18 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* após interação de *L. reuteri* e preparações (profilaxia 3 h) e *A. actinomycetemcomitans*



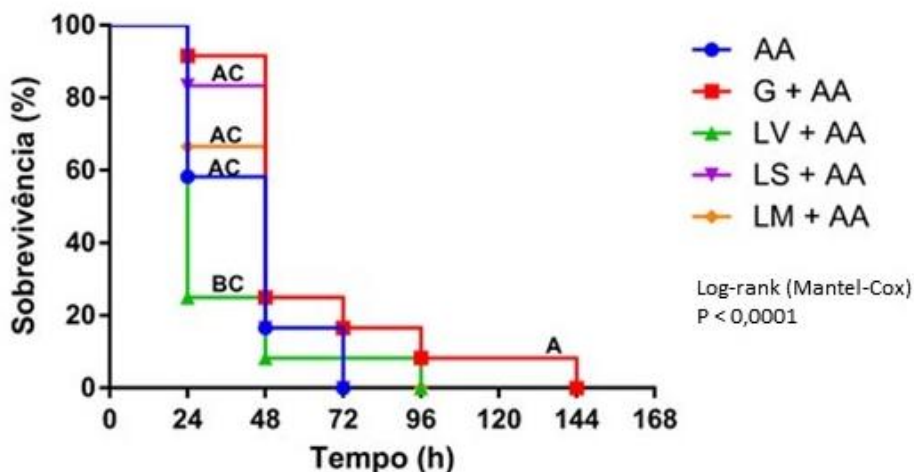
Legenda: AA – *A. actinomycetemcomitans*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste Log-rank (Mantel-Cox).

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 19 ilustra os resultados da inoculação de *L. reuteri* 24 horas antes da inoculação por *A. actinomycetemcomitans*.

O grupo AA exibiu uma taxa de mortalidade de 100% das lagartas em 48 horas. O grupo LS + AA também demonstrou 100% de mortalidade, porém em 72 horas e os grupos LV + AA, LM + AA exibiram mortalidade de 100% das lagartas em 96 horas. Apesar de aumentarem o tempo de sobrevivência das lagartas, estes resultados não são estatisticamente significantes quando comparados entre si e quando comparados ao grupo AA. O glicerol quando inoculado 24 horas antes de *A. actinomycetemcomitans* (Log-rank (Mantel-cox), $p=0,2395$), diferentemente de quando foi inoculado 3 horas antes, levou a 100% de mortalidade em 144 horas, o que não foi estatisticamente diferente do grupo sobrenadante.

Figura 19 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* após interação de *L. reuteri* e preparações (profilaxia 24 h) e *A. actinomycetemcomitans*



Legenda: AA – *A. actinomycetemcomitans*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste Log-rank (Mantel-Cox).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Densidade Hemocitária

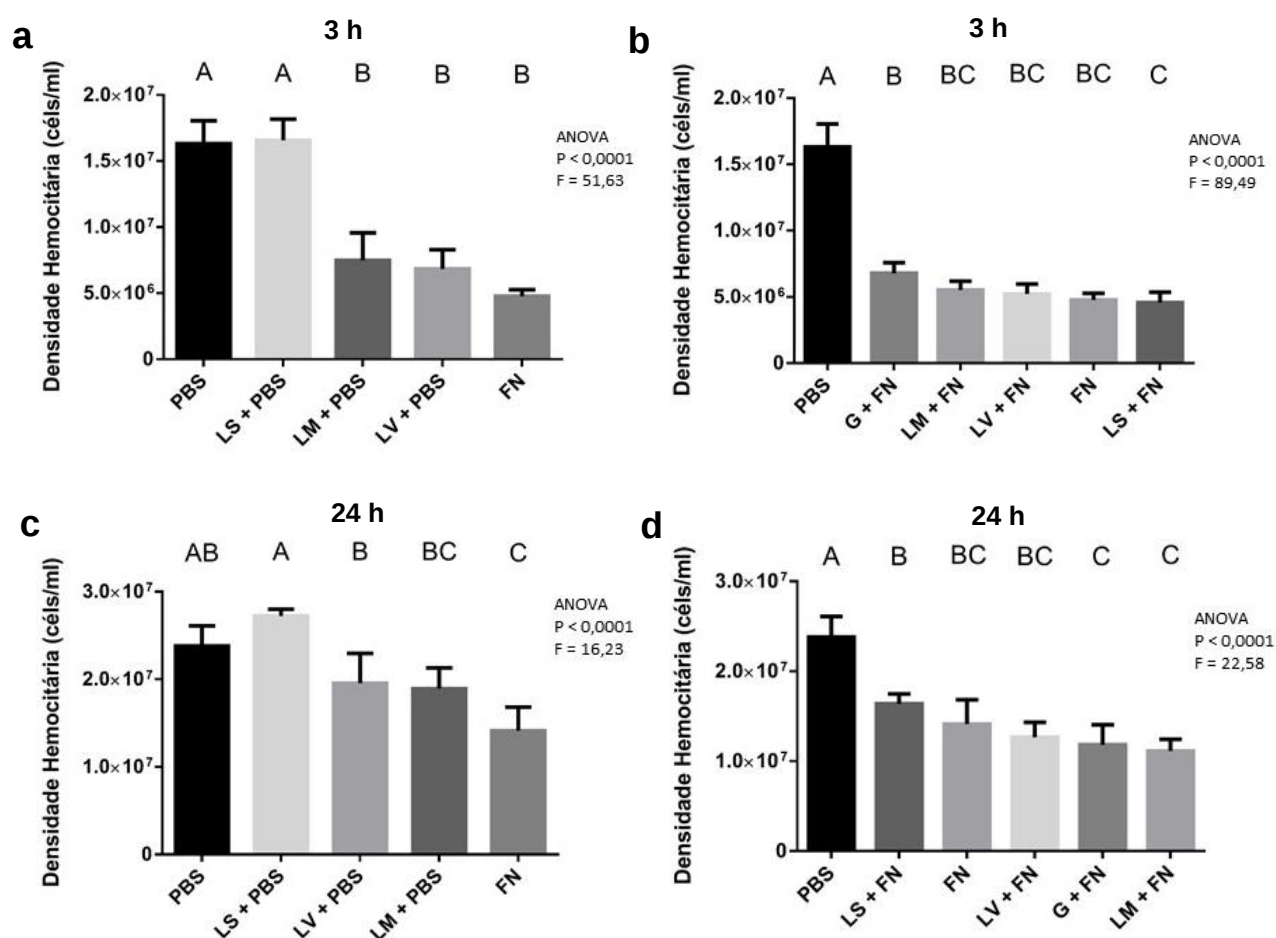
4.3.1 Interação de *L. reuteri* preparações e *F. nucleatum*

Para verificar a influência de *L. reuteri*, bem como suas preparações na densidade hemocitária, inicialmente foi realizada a profilaxia com 10^8 células/ml de *L. reuteri* 3 horas antes da inoculação padronizada em 10^8 células/ml de *F. nucleatum*. Após 3 horas da última inoculação, foi realizada a contagem de hemócitos.

A Figura 20a ilustra os resultados encontrados nos grupos controles. Não houve diferença significativa entre os grupos que receberam somente *L. reuteri* vivo, morto ou *F. nucleatum*, sendo que todos diminuíram significativamente a produção de hemócitos em comparação ao grupo PBS. O grupo que recebeu a preparação de sobrenadante demonstrou um aumento de 1,5% de hemócitos quando comparado ao grupo PBS, entretanto esta não foi uma diferença estatística significativa.

Já na Figura 20b verifica-se que, tanto o *L. reuteri* vivo, quanto o morto e o sobrenadante não alteraram o número de hemócitos após a inoculação de *F. nucleatum*, sendo estatisticamente iguais ao grupo FN.

Figura 20 – Médias e desvios-padrão da contagem de hemócitos. a) Comparação entre os grupos controles - profilaxia 3 h; b) Comparação entre os grupos FN – profilaxia 3 h; c) Comparação entre os grupos controles – profilaxia 24 h; d) Comparação entre os grupos FN – profilaxia 24 h



Legenda: FN – *F. nucleatum*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

As Figuras 20c e 20d demonstram a densidade hemocitária após inoculação de *L. reuteri* e suas preparações 24 horas antes da segunda inoculação. A inoculação de *L. reuteri* vivo ou morto não alterou significativamente a produção de hemócitos

quando comparada com o controle PBS. Apesar do grupo LS + PBS aumentar 14,37% a contagem de hemócitos, essa também não foi uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS (Figura 20c).

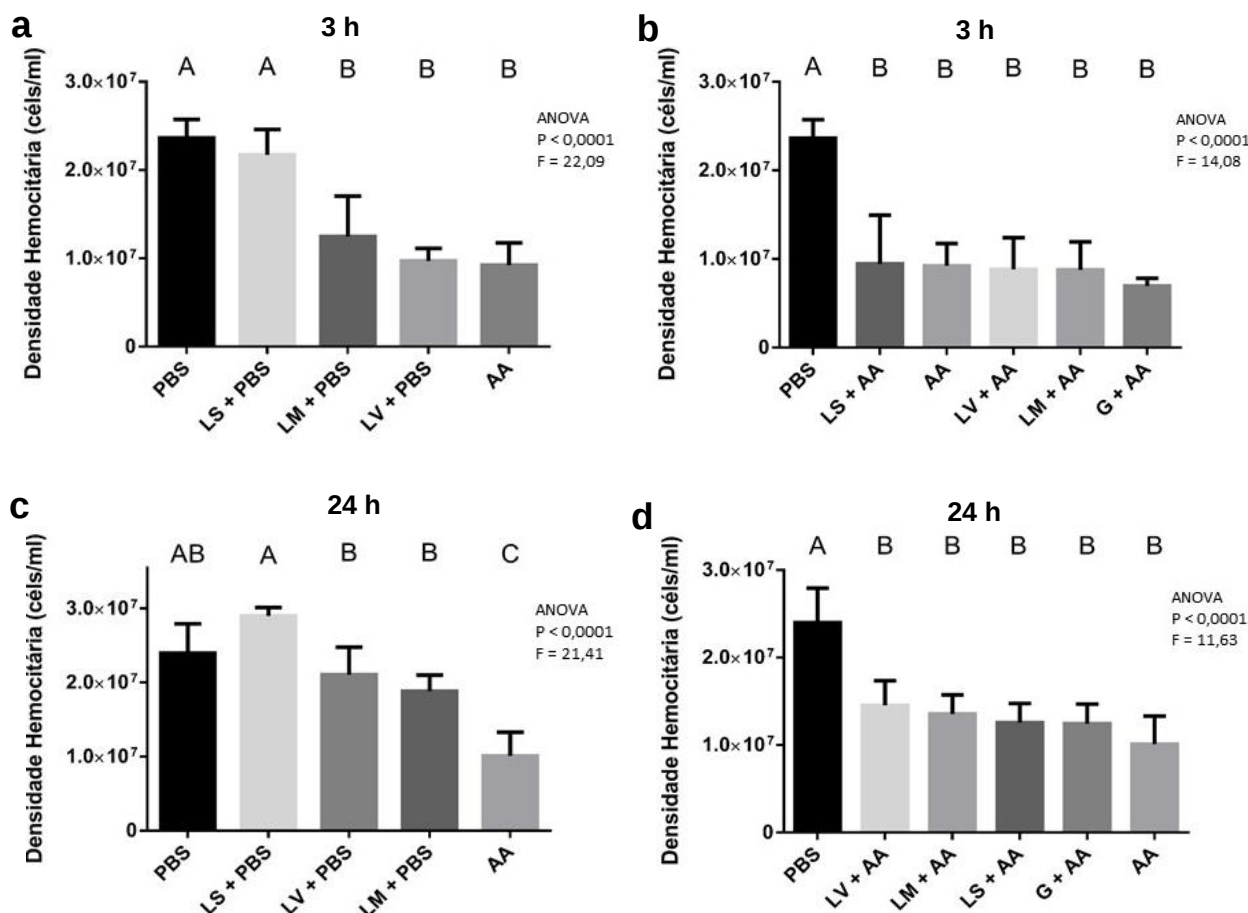
Da mesma maneira que no período de 3 horas, com a inoculação 24 horas antes da infecção por FN, tanto o *L. reuteri* vivo, quanto o morto e o sobrenadante não alteraram o número de hemócitos comparados com o grupo FN, sendo estatisticamente menores que o controle PBS (Figura 20d).

4.3.2 Interação de *L. reuteri* e *A. actinomycetemcomitans*

Os resultados encontrados nos grupos controles, *L. reuteri* e suas preparações, profilaxia 3 horas, estão ilustrados na Figura 21a. O grupo que recebeu a preparação de sobrenadante foi o único em que não houve uma redução significativa de hemócitos em comparação ao controle PBS.

Já na Figura 21b, verificou-se que, tanto o *L. reuteri* vivo, quanto o morto e o sobrenadante não alteraram a produção de hemócitos após a inoculação da bactéria patogênica *A. actinomycetemcomitans*, sendo estatisticamente iguais ao grupo controle AA.

Figura 21 – Médias e desvios-padrão da contagem de hemócitos. a) Comparação entre os grupos controles - profilaxia 3 h; b) comparação entre os grupos AA - profilaxia 3 h; c) Comparação entre os grupos controles – profilaxia 24 h; d) Comparação entre os grupos AA – profilaxia 24 h



Legenda: AA – *A. actinomycetemcomitans*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora.

Quando a inoculação profilática foi realizada 24 horas antes da inoculação de *A. actinomycetemcomitans*, *L. reuteri* vivo, morto ou sobrenadante não alteraram significativamente a produção de hemócitos quando comparados com o controle PBS, diferentemente do grupo AA. Apesar do grupo LS + PBS aumentar 20,95% a contagem de hemócitos, essa também não foi uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS (Figura 21c).

Após a inoculação de *A. actinomycetemcomitans*, todos os grupos analisados foram estatisticamente iguais ao grupo AA (Figura 21d), demonstrando que *L. reuteri*

vivo, morto e sobrenadante não alteraram o número de hemócitos das lagartas após a infecção por este periodontopatógeno.

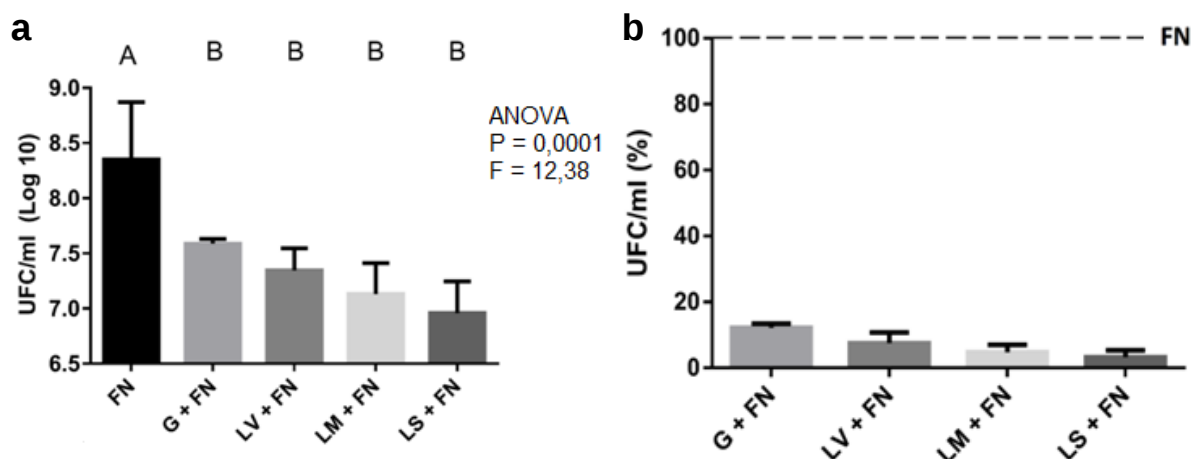
4.4 Recuperação microbiana

4.4.1 Interação de *L. reuteri* e *F. nucleatum*

Após a inoculação de *L. reuteri* 3 horas antes de *F. nucleatum*, ambos padronizados em 10^8 células/ml, foi realizada a contagem de UFC/ml da hemolinfa, removida 3 horas depois da infecção por *F. nucleatum*, em ágar sangue Brucella suplementado. Os dados foram então submetidos à análise estatística (ANOVA).

As contagens de UFC/ml nos grupos G + FN, LV + FN, LM + FN e LS + FN foram significativamente menores que o grupo FN (Figura 22a), porém não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si. Na Figura 22b observa-se o percentual de recuperação de colônias de *F. nucleatum*. Houve recuperação microbiana de 12,17% no grupo G + FN, 7,55% no grupo LV + FN, 4,82% em LM + FN e 3,33% no grupo LS + FN em comparação ao grupo controle FN.

Figura 22 – Recuperação microbiana de *F. nucleatum* – profilaxia 3 h. a) Média e desvios-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10); b) Percentual de *F. nucleatum* nos diversos grupos, em relação ao controle (UFC/ml)

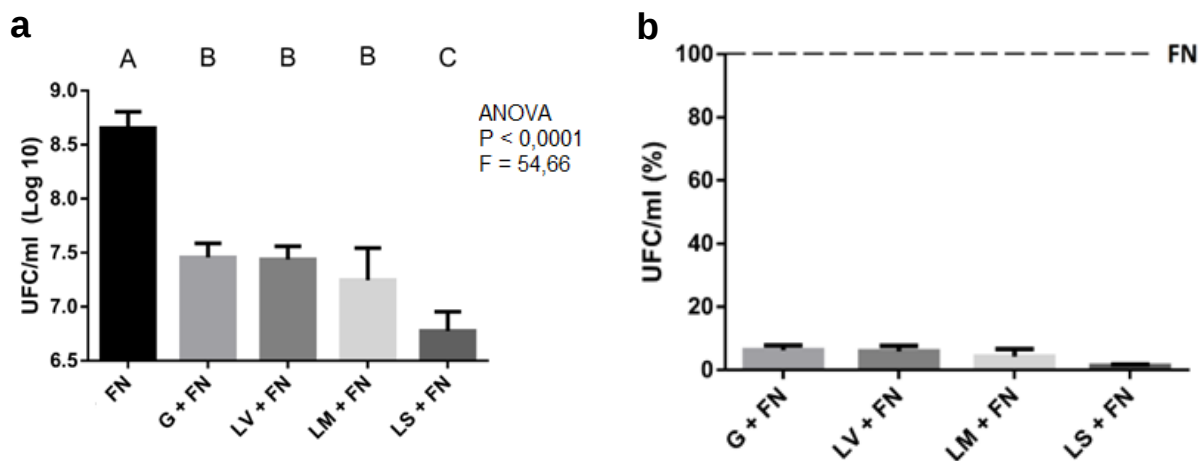


Legenda: FN – *F. nucleatum*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora.

Também foram verificados os efeitos da inoculação *L. reuteri* e preparações 24 horas antes de *F. nucleatum*.

As contagens de UFC/ml em todos os grupos tratados foram significativamente menores que o grupo FN. Entretanto, o sobrenadante levou à maior redução deste micro-organismo, sendo diferente estatisticamente dos grupos *L. reuteri* vivo, morto e glicerol (Figura 23a). Observa-se no grupo LS + FN a menor recuperação microbiana, 1,34%, seguido dos grupos LM + FN, LV + FN e G + FN, com 4,33%, 5,98% e 6,26%, respectivamente (Figura 23b).

Figura 23 – Recuperação microbiana de *F. nucleatum* – profilaxia 24 h. a) Média e desvios-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10); b) Percentual de crescimento de *F. nucleatum* nos diversos grupos, em relação ao controle (UFC/ml)

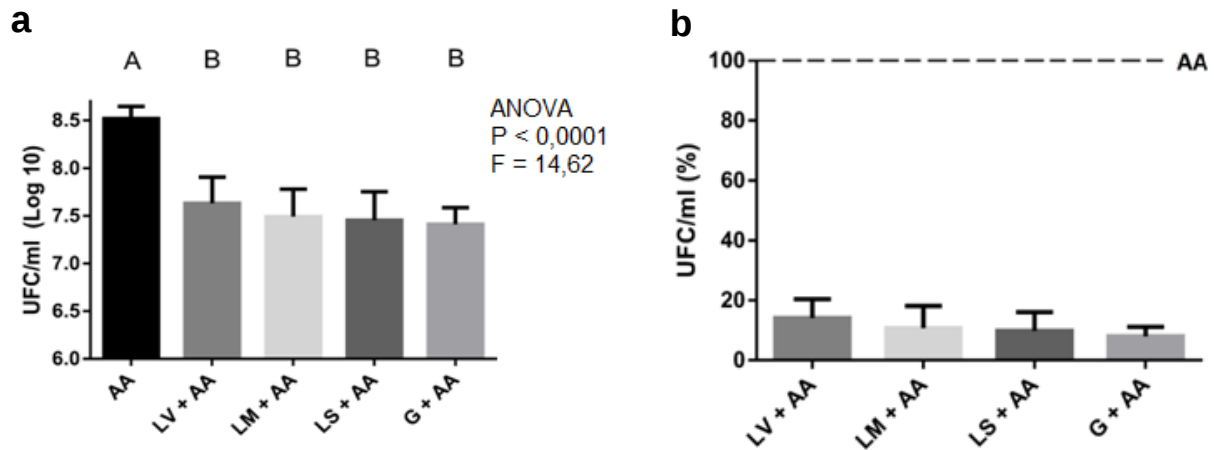


Legenda: FN – *F. nucleatum*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.2 Interação de *L. reuteri* e *A. actinomycetemcomitans*

As contagens de UFC/ml nos grupos LV + AA, LM + AA, LS + AA e G + AA foram significativamente menores que o grupo AA, entretanto não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si (Figura 24a). Já na Figura 24b verifica-se o percentual de colônias de *A. actinomycetemcomitans*. No grupo LV + AA observa-se recuperação microbiana de 14,15%, seguido de LM + AA com 10,79%, LS + AA com 9,87 e G + AA com 8,01%.

Figura 24 – Recuperação microbiana de *A. actinomycetemcomitans* – profilaxia 3 h.
a) Média e desvios-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10); b) Percentual de crescimento de *A. actinomycetemcomitans* nos diversos grupos, em relação ao controle (UFC/ml)



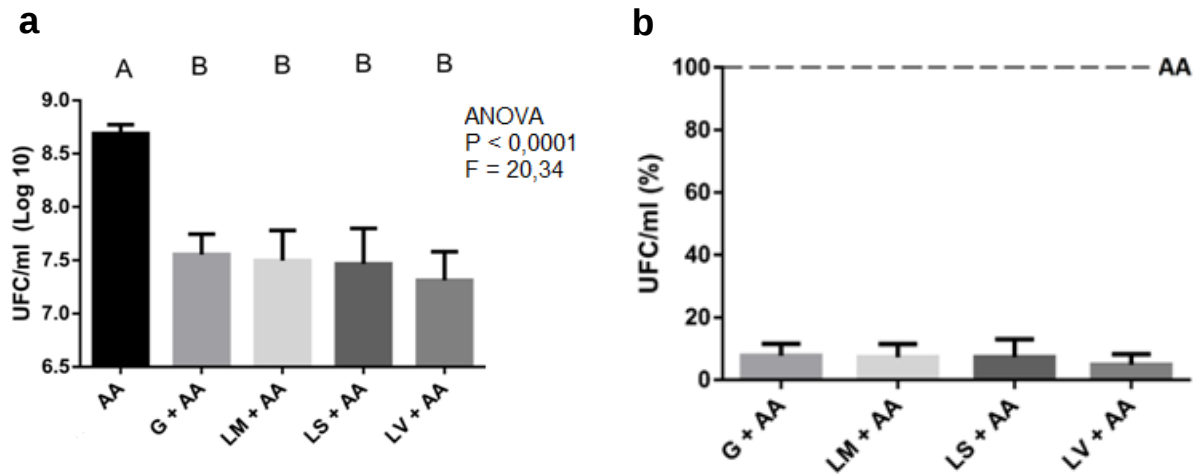
Legenda: AA – *A. actinomycetemcomitans*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora.

Também foi verificada a recuperação microbiana após inoculação de *L. reuteri* 24 horas antes de *A. actinomycetemcomitans*.

As contagens de UFC/ml em todos os grupos tratados foram significativamente menores que o grupo AA, indicando em que todos estes grupos houve menos crescimento de *A. actinomycetemcomitans*. Quando comparados entre si, *L. reuteri* vivo, morto e sobrenadante não apresentaram diferenças significantes (Figura 25a).

O grupo LV + AA demonstrou a menor recuperação microbiana (4,85%), seguido de LS + AA, LM + AA e G + AA com respectivamente, 7,29%, 7,33% e 7,81% (Figura 25b).

Figura 25 – Recuperação microbiana de *A. actinomycetemcomitans* – profilaxia 24 h.
a) Média e desvios-padrão dos dados de UFC/ml (Log 10); b) Percentual de crescimento de *A. actinomycetemcomitans* nos diversos grupos, em relação ao controle (UFC/ml)



Legenda: AA – *A. actinomycetemcomitans*, LV – *L. reuteri* Vivo, LS – *L. reuteri* Sobrenadante, LM – *L. reuteri* Morto, G – Glicerol. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística após Teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou *in vitro* os efeitos antimicrobianos de *L. reuteri* vivo, morto e seu sobrenadante sobre bactérias patogênicas relacionadas à doença periodontal e sobre bactérias comensais da microbiota bucal. Além disso, foram avaliados *in vivo* os efeitos imunomodulatórios desse probiótico, assim como sua preparação paraprobiótica e seus produtos.

Inicialmente, verificou-se na interação antimicrobiana *in vitro*, que todas as bactérias anaeróbias patogênicas analisadas e *S. mitis* não influenciaram no crescimento de *L. reuteri*. Este resultado é extremamente importante, pois o probiótico, em concentração adequada, deve ser capaz de aderir às superfícies orais, tornando-se parte do biofilme, para então gerar seus efeitos benéficos (Çaglar et al., 2009). Entretanto, *S. salivarius* reduziu o crescimento de *L. reuteri*. Isso demonstra a complexidade do ecossistema bucal. Çaglar et al. (2009) demonstraram em seu estudo que, após o período de intervenção com administração de *L. reuteri*, foi verificada uma diminuição gradual desse mesmo micro-organismo na cavidade oral, gerando uma colonização não permanente do probiótico, sendo assim necessária uma administração contínua. A cavidade bucal apresenta inúmeras espécies de outros micro-organismos que, talvez possam influenciar no crescimento de *L. reuteri*, assim como *S. salivarius* no presente estudo, fato este que pode associar-se à colonização não permanente do probiótico.

Na interação antimicrobiana *in vitro*, também foi analisado se *L. reuteri* vivo, inativo e sua preparação paraprobiótica reduziram o crescimento das bactérias analisadas. *L. reuteri* vivo diminuiu significativamente tanto as bactérias periodontopatogênicas quanto as comensais, o que mostra que *L. reuteri* pode alterar o ecossistema bucal. Resultado semelhante foi encontrado por Kang et al. (2011) em seu estudo *in vitro*, no qual analisaram o efeito de *L. reuteri* (KCTC 3594 e KCTC 3678, ambas derivadas de humano e KCTC 3679, derivada de rato) no crescimento de *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*. Os autores observaram diminuição no crescimento de todos os micro-organismos periodontopatogênicos, estando a atividade antimicrobiana de *L. reuteri* relacionada à produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e substâncias semelhantes à bacteriocina. Já Vestman et al. (2015) em seu estudo em humanos que

fizeram uso de 2 pastilhas por dia contendo *L. reuteri* (DSM 17938 e PTA 5289) durante 12 semanas, verificaram que após este período houve uma mudança na composição da microbiota oral, com redução no crescimento de bactérias como *F. nucleatum ss vincentii*, *F. periodicum* e *S. mutans* e, diferentemente do presente estudo, aumento de *S. mitis*. As bactérias vivas, do gênero *Lactobacillus*, são capazes de multiplicação e adesão ao tecido epitelial (Çaglar et al., 2009), produção de ácidos orgânicos, como o ácido láctico e o acético (Neal-Mckinney et al., 2012), e produção de reuterina, que possui amplo espectro antimicrobiano (Bin et al., 2011). Esses micro-organismos também são capazes de modular o sistema imune do hospedeiro (De Gregorio et al., 2016) e de co-agregação com outras bactérias, inibindo o crescimento destas (De Gregorio et al., 2014). A célula viável possui essas inúmeras características que a fazem eficaz contra patógenos. Já o sobrenadante, livre de células, são substâncias que apresentam efeitos bactericidas e/ou bacteriostáticos (Poppi et al., 2015) e possíveis efeitos imunomoduladores (Goad et al., 2013).

Neste estudo, o sobrenadante foi superior ao *L. reuteri* vivo somente para a bactéria *F. nucleatum*, levando a uma redução de 67,54% desse micro-organismo. Na literatura existem diferentes metodologias para produção da reuterina através da bioconversão do glicerol por *L. reuteri*, que variam a concentração do glicerol, a quantidade de micro-organismos e o tempo de exposição à essa substância (Talarico e Dobrogosz, 1989; Cleusix et al., 2007; Jones, Versalovic, 2009). A preparação do sobrenadante deste trabalho foi baseada na metodologia de Schaefer et al. (2010), que estimulou a síntese da reuterina (3-hidroxipropionaldeído (3-HPA)) através da exposição de *L. reuteri* ao glicerol 250 mM, durante 2 horas. Após o sobrenadante ser recolhido e filtrado, os autores comprovaram a produção da reuterina através de um ensaio colorimétrico e a atividade antimicrobiana foi quantificada através do ensaio de concentração inibitória mínima (MIC). Embora tenhamos seguido a metodologia de Schaefer, que leva à comprovada produção do composto, cujo efeito antimicrobiano foi verificado nos resultados da presente pesquisa, nós não mensuramos a produção de reuterina ou outros compostos no sobrenadante. Burgé et al. (2015) verificaram que, a partir de 0,5 h, *L. reuteri* bioconverteu glicerol, resultando em altos níveis de 3-HPA. Entretanto, também a partir de 0,5 h, houve aumento nas concentrações de 3-HP e 1,3-PDO. Portanto, a ativação dessa via metabólica gera subprodutos que se

acumulam no meio. Estudos dos efeitos desses produtos sobre bactérias, ainda são escassos.

O efeito bacteriostático do glicerol já foi comprovado em vários estudos. Singh (2013) analisou o efeito de 19 tipos de açúcares em 96 cepas de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Verificou que nenhum dos açúcares testados apresentou efeito bactericida, entretanto o glicerol foi bacteriostático para *Enterococcus gallinarum*, efeito que varia entre os micro-organismos expostos a diferentes tipos de açúcares. Nalawade et al. (2015) verificaram que a glicerina só foi bactericida sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, na concentração de 100%. No presente estudo, o glicerol 250 mM reduziu o crescimento de *S. mitis* e *A. actinomycetemcomitans*. Em seu estudo, Burgé et al. (2015) expuseram diferentes cepas de *L. reuteri* (DSM 20016, DSM 17938 e ATCC 53608) a glicerol 200 mM, e verificaram que *L. reuteri* produz ácido 3-hidroxipropiônico (3-HP) a partir do glicerol. Ocorre uma reação enzimática na qual o glicerol é convertido em 3-HPA, e então é oxidado em 3-HP. O 3-HP gerou toxicidade a todas as cepas testadas de *L. reuteri* entre 2-3 horas. Assim como *L. reuteri*, outras bactérias são capazes de produzir o ácido 3-HP através do glicerol, como *Pseudomonas denitrificans* (Zhou et al., 2013) e *Lactobacillus diolivorans* (Lindlbauer et al., 2017). Não encontramos na literatura se *S. mitis* e *A. actinomycetemcomitans* poderiam bioconverter o glicerol em ácido 3-hidroxipropiônico.

L. reuteri morto apresentou atividade antimicrobiana sobre *F. nucleatum*, *in vitro*. Aiba et al. (2017) encontraram resultados semelhantes, pois diferentes cepas de *Lactobacillus* inativadas pelo calor, inibiram o crescimento de *Helicobacter pylori*. Não houve co-agregação de *Lactobacillus johnsonii* No. 1088 inativo a *H. pylori*, entretanto sugeriu-se que a própria presença do micro-organismo inativo afeta a viabilidade de *H. pylori*, através de mecanismos desconhecidos envolvendo as moléculas da superfície celular desse paraprobiótico. Na literatura ainda são escassos os trabalhos que verificaram o efeito antimicrobiano de paraprobióticos, sendo assim, o exato mecanismo desse efeito ainda necessita ser elucidado.

No estudo de suscetibilidade utilizando o modelo *in vivo*, verificou-se a maior patogenicidade de *A. actinomycetemcomitans* quando comparado a *F. nucleatum*. Na concentração de 10^8 células/ml, *F. nucleatum* demonstrou uma taxa de sobrevivência

de 16,67% ao final de 7 dias, comparada a uma mortalidade de 100% de *A. actinomycetemcomitans* em 144 horas. Já na concentração de 10^9 células/ml, ambos micro-organismos demonstraram uma taxa de mortalidade de 100%, entretanto o grupo inoculado com *A. actinomycetemcomitans* exibiu essa taxa de mortalidade em 48 h enquanto isso ocorreu com *F. nucleatum* 144 horas após a inoculação. *A. actinomycetemcomitans* é um micro-organismo extremamente patogênico em humanos, que está relacionado à periodontite agressiva (Mínguez et al., 2016), e sua alta virulência também foi observada em *G. mellonella*. Apesar dos periodontopatógenos apresentarem efeitos locais na doença periodontal em humanos, quando em infecção em *G. mellonella*, o efeito é sistêmico. Apesar disso, existe uma estreita correlação entre a virulência de várias espécies bacterianas em insetos e em mamíferos (Cook, McArthur, 2013; Scorzoni et al., 2015), sendo este um modelo que tem se consolidado para análise de infecção por micro-organismos e estudos de substâncias antimicrobianas (Loh et al., 2013; Jorjão et al., 2018).

Na literatura, estudos de interação entre *L. reuteri* e periodontopatógenos ainda são escassos, embora numerosos estudos evidenciem efeito benéfico de *L. reuteri* em casos de periodontite (Tekce et al., 2015; Sajedinejad et al., 2018). No presente estudo *in vivo*, após a interação de *L. reuteri* e suas preparações com *F. nucleatum*, verificou-se que o sobrenadante foi a preparação que teve maior contribuição para a sobrevivência das lagartas, tanto na profilaxia de 3 horas quanto em 24 horas. Entretanto, o sobrenadante só foi mais eficiente que o glicerol quando inoculado 24 horas antes de *F. nucleatum*. Isto sugere que a reuterina leva um tempo maior para agir em comparação ao glicerol. Já a preparação de *L. reuteri* inativo não alterou a sobrevivência de *F. nucleatum*. Apesar de aumentar a taxa de sobrevivência das lagartas, esta não foi uma diferença estatisticamente significativa. Resultado semelhante encontrou Jorjão et al. (2018) em seu estudo, no qual analisaram a interação de *Lactobacillus rhamnosus* (vivo e morto) com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em *Galleria mellonella*. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos, *L. rhamnosus* inativo aumentou a taxa de sobrevivência das lagartas. Entretanto, o grupo que recebeu *L. rhamnosus* vivo 2,5 h antes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* apresentou menor sobrevivência das lagartas em relação ao controle, porém sem diferença estatística. Os autores não explicaram os mecanismos envolvidos nestes resultados,

e sugeriram que novos estudos são necessários para avaliar os efeitos dos probióticos em *G. mellonella*, analisando diferentes períodos de infecção e diferentes intervalos de inoculação do probiótico. Já Grounta et al. (2016) verificaram que a inoculação de *Lactobacillus pentosus* B281, *Lactobacillus plantarum* B282 e *Lactobacillus rhamnosus* LGG 24 horas antes da infecção por *L. monocytogenes* resultou em maior sobrevivência das lagartas quando comparada à inoculação do *Lactobacillus* 6 horas antes do patógeno. Dessa forma, identifica-se que a inoculação prévia de lactobacilos em diferentes tempos antes do patógeno leva a diferentes taxas de sobrevivência das lagartas.

Entretanto, no presente trabalho a inoculação de *L. reuteri* vivo e suas preparações, tanto em 3 horas quanto 24 horas antes de *A. actinomycetemcomitans* não aumentaram a sobrevivência das lagartas. Geraldo (2017) analisou a sobrevivência de *G. mellonella* inoculadas com *L. reuteri* vivo, morto e sobrenadante, 2 horas antes da infecção por *P. gingivalis*. Todas as preparações aumentaram a sobrevivência das lagartas. Contudo, somente os grupos que receberam inoculação prévia de *L. reuteri* vivo e morto, aumentaram estatisticamente a sobrevivência das lagartas. Sendo assim, observa-se que a ação de *L. reuteri* e suas preparações, variam de acordo com o periodontopatógeno.

Verificou-se que *L. reuteri* vivo, morto e seu sobrenadante não estimularam o aumento do número de hemócitos em *G. mellonella*, resultado que difere do esperado. O grupo inoculado com sobrenadante apresentou a maior densidade hemocitária, tanto em 3 horas quanto em 24 horas, apesar de não ser estatisticamente diferente do grupo controle PBS. De maneira geral, os grupos apresentam maior contagem de hemócitos quando inoculados 24 horas antes. A inoculação profilática de *L. reuteri* vivo e inativo, quando em profilaxia de 3 horas, reduziu significativamente o número de hemócitos, que se igualou ao controle PBS em 24 horas. Como *L. reuteri* não aumentou significativamente a contagem de hemócitos, levantamos a hipótese de que a concentração utilizada (10^8 células/ml) foi alta para este modelo *in vivo*. No estudo também realizado em *G. mellonella*, Geraldo (2017) verificou que a concentração de 10^7 células/ml de *L. reuteri*, aumentou a quantidade de hemócitos da lagarta, embora estatisticamente igual ao controle PBS. A escolha em utilizar a mesma concentração (10^8 células/ml) tanto do probiótico quanto dos periodontopatógenos, no intuito de não favorecer nenhum dos micro-organismos, foi baseada em trabalhos que utilizaram

essa mesma metodologia (Vilela et al., 2015; Geraldo, 2017; Ribeiro et al., 2017). Entretanto, a redução da concentração de *L. reuteri* poderia levar aos resultados esperados. Jorjão et al. (2018) analisaram em *G. mellonella* o efeito de *L. rhamnosus* vivo e morto na concentração de 10^8 células/ml para ambos, sobre infecção por bactérias patogênicas na concentração de 10^9 células/ml. Foi demonstrado que, apesar da menor concentração de *L. rhamnosus*, houve redução do número de hemócitos das lagartas após inoculação das bactérias patogênicas, sendo estatisticamente diferentes do controle. Do mesmo modo, Grounta et al. (2016) também utilizaram concentração menor de *Lactobacillus pentosus* B281, *Lactobacillus plantarum* B282 e *Lactobacillus rhamnosus* GG (10^4 células/ml), antes da infecção inoculação de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em 10^6 células/ml, e verificaram que os probióticos em concentrações menores também foram capazes de aumentar a sobrevivência das lagartas.

Em estudos de virulência entre hospedeiro (*G. mellonella*) e micro-organismos, é necessário considerar diversas condições. O sistema imune da *G. mellonella* é complexo, e sua ativação envolve vários componentes como hemócitos, proteínas, melanina e peptídeos antimicrobianos que estão envolvidos na eliminação do patógeno. Entretanto, ativar esse sistema gera um alto custo energético aos insetos (Freitak et al., 2003). Muitas vezes esse alto custo de ativação e manutenção do sistema imune pode não ser sustentado, e mesmo bactérias consideradas não patogênicas, quando em altas concentrações, são capazes de induzir morte séptica nas lagartas (Mukherjee et al., 2010). A ativação da melanina também indica que o sistema imune está ativo, iniciando com manchas enegrecidas até a completa melanização, que é o caminho relacionado à morte inerente das lagartas (Loh et al., 2013), como vista na Figura 5c. Assim, se o estímulo é intenso e excessivo, a ativação e manutenção desse sistema pode gerar efeitos negativos que implicam na baixa sobrevivência das lagartas, assim como verificado nesse estudo após interação de *L. reuteri* e suas preparações sobre infecção por periodontopatógenos em *G. mellonella*.

Neste estudo, *L. reuteri* vivo, morto e seu sobrenadante reduziram a produção de hemócitos, tanto em 3 horas quanto 24 horas antes da inoculação dos periodontopatógenos. Há uma estreita correlação entre aumento da mortalidade das lagartas e diminuição da contagem de hemócitos (Bergin et al., 2003; Scorzoni et al., 2015). Apesar disso, todas as preparações de *L. reuteri* inibiram significativamente o

crescimento de *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*, tanto em profilaxia 3 horas quanto em 24 horas, quando comparados ao respectivo grupo controle. Observa-se que, apesar da eficácia em diminuir o crescimento bacteriano, esse fator não influenciou na sobrevivência dos invertebrados, exceto os grupos inoculados com *F. nucleatum* e *L. reuteri* vivo e seu sobrenadante 3 horas antes, e o grupo inoculado com sobrenadante 24 horas antes da infecção por *F. nucleatum*. Dessa forma, levantamos a hipótese de que a alta carga bacteriana, estimulando intensamente o sistema imune e gerando altos gastos de energia, possa ter levado à morte séptica, e que os animais não conseguiram sustentar de maneira prolongada a ativação do sistema imune para combate dos patógenos. Já os grupos que receberam somente o sobrenadante, foram estatisticamente iguais ao controle com relação ao número de hemócitos, sugerindo que não houve estimulação excessiva do sistema imune na primeira inoculação. Quando inoculado *F. nucleatum*, a estimulação não excessiva do sobrenadante, que fez a lagarta poupar energia, associado à inibição significativa deste patógeno, possivelmente levou a uma maior sobrevivência dessas lagartas.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos na metodologia utilizada, concluiu-se que:

In vitro:

- a) *S. mitis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* não influenciaram no crescimento de *L. reuteri*;
- b) *S. salivarius* diminuiu o crescimento de *L. reuteri*;
- c) em geral, *L. reuteri* vivo foi a preparação com o maior efeito antimicrobiano;
- d) para *F. nucleatum*, o sobrenadante foi a preparação com maior efeito antimicrobiano.

In vivo:

- a) *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* são patogênicos no modelo experimental, em *G. mellonella*;
- b) para *F. nucleatum*, o sobrenadante foi a preparação que apresentou maior contribuição para a sobrevivência das lagartas;
- c) em geral, *L. reuteri* e suas preparações, quando inoculados 3 horas antes de *F. nucleatum*, resultaram em maior sobrevivência das lagartas que em 24 horas;
- d) nenhuma das preparações aumentou significativamente a sobrevivência das lagartas infectadas por *A. actinomycetemcomitans*;
- e) *L. reuteri* vivo, morto e sobrenadante não estimularam o aumento do número de hemócitos em *G. mellonella*;
- f) *L. reuteri* e suas preparações reduziram o crescimento bacteriano na hemolinfa.

REFERÊNCIAS*

- Abdulkareem AA, Shelton RM, Landini G, Cooper PR, Milward MR. Potential role of periodontal pathogens in compromising epithelial barrier function by inducing epithelial-mesenchymal transition. *J Periodontal Res*. 2018 Aug;53(4):565-74. doi: 10.1111/jre.12546. PubMed PMID:29704258.
- Ahn SH, Song JE, Kim S, Cho SH, Lim YK, Kook JK, et al. NOX1/2 activation in human gingival fibroblasts by *Fusobacterium nucleatum* facilitates attachment of *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Microbiol*. 2016 Aug;198(6):573-83. doi: 10.1007/s00203-016-1223-7. PubMed PMID: 27071620.
- Aiba Y, Ishikawa H, Tokunaga M, Komatsu Y. Anti-*Helicobacter pylori* activity of non-living, heat-killed form of lactobacilli including *Lactobacillus johnsonii* No.1088. *FEMS Microbiol Lett*. 2017 Jun 15;364(11):1-5. doi: 10.1093/femsle/fnx102. PubMed PMID:28505287.
- Albandar JM. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol* 2000. 2014 Jun;65(1):13-26. doi: 10.1111/prd.12014. PubMed PMID: 24738584.
- 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. PubMed PMID: 19465252.
- Aruni AW, Dou Y, Mishra A, Fletcher HM. The biofilm community: rebels with a cause. *Curr Oral Health Rep*. 2015 Mar 1;2(1):48-56. doi: 10.1007/s40496-014-0044-5. PubMed PMID: 26120510.
- Baca-Castañón ML, Garza-Ramos MA, Alcázar-Pizaña AG, Grondin Y, Coronado-Mendoza A, Sánchez-Najera RI, et al. Antimicrobial effect of *Lactobacillus reuteri* on cariogenic bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and periodontal diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics & Antimicro Prot*. 2015 Mar;7(1):1-8. doi: 10.1007/s12602-014-9178-y. PubMed PMID: 25422124.
- Bhardwaj A, Bhardwaj SV. Effects of androgens, estrogens and progesterone on periodontal disease. *J Orofac Research*. 2012 Jul-Sep;2(3):165-70. doi: 10.5005/jp-journals-10026-1034.
- Bahrami G, Vaeth M, Kirkevang LL, Wenzel A, Isidor F. The impact of smoking on marginal bone loss in a 10-year prospective longitudinal study. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2017 Feb;45(1):59-65. doi: 10.1111/cdoe.12260. PubMed PMID: 27649930.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* 2003 Dec;5(15):1389-95. PubMed PMID: 14670452

Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, et al. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008 Feb 23;371(9613):651-9. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60207-X. PubMed PMID: 18279948.

Binder U, Maurer E, Lass-Flörl C. *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biol.* 2016 Feb;120(2):288-95. doi: 10.1016/j.funbio.2015.06.002. PubMed PMID: 26781383.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol.* 2006 Jun;33(6):427-33. doi: 10.1111/j.1600-051X.2006.00925.x. PubMed PMID: 16677332.

Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr.* 2006 Jun;83(6):1256-64. doi:10.1093/ajcn/83.6.1256. PubMed PMID:16762934.

Britton RA, Irwin R, Quach D, Schaefer L, Zhang J, Lee T, et al. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model. *J Cell Physiol.* 2014 Nov;229(11):1822-30. doi: 10.1002/jcp.24636. PubMed PMID: 24677054.

Browne N, Heelan M, Kavanagh K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence.* 2013 Oct 1;4(7):597-603. doi: 10.4161/viru.25906. PubMed PMID: 23921374.

Burgé G, Saulou-Bérion C, Moussa M, Pollet B, Flourat A, Allais F, et al. Diversity of *Lactobacillus reuteri* strains in converting glycerol into 3-Hydroxypropionic acid. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015 Oct;177(4):923-39. doi: 10.1007/s12010-015-1787-8. PubMed PMID: 26319567.

Byrne DP, Manandhar SP, Potempa J, Smalley JW. Breakdown of albumin and haemalbumin by the cysteine protease interpain A, an albuminase of *Prevotella intermedia*. *BMC Microbiol.* 2015 Sep 24;15:1-10. doi: 10.1186/s12866-015-0516-3. PubMed PMID:26403890.

Çaglar E, Kargul B, Tanboga I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis.* 2005 May;11(3):131-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01109.x. PubMed PMID: 15888102.

Çaglar E, Topcuoglu N, Çildir SK, Sandalli N, Kulekci G. Oral colonization by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 after exposure to probiotics. *Int J Paediatr Dent*. 2009 Sep;19(5):377-81. doi: 10.1111/j.1365-263X.2009.00989.x. PubMed PMID: 19486373.

Caufield PW, Schön CN, Saraithong P, Li Y, Argimón S. Oral *Lactobacilli* and dental caries: a model for niche adaptation in humans. *J Dent Res*. 2015 Sep;94(9):110-8. doi: 10.1177/0022034515576052. PubMed PMID: 25758458.

Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2003; 31:167-80. PubMed PMID: 12657001.

Choi EY, Choe SH, Hyeon JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Effect of caffeic acid phenethyl ester on *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced production of proinflammatory mediators in murine macrophages. *J Periodontal Res*. 2015 Dec;50(6):737-47. doi: 10.1111/jre.12260. PubMed PMID: 25601508.

Chuang CH, Tsai CC, Lin ES, Huang CS, Lin YY, Lan CC, et al. Heat-killed *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus johnsonii* reduce liver injury induced by alcohol *in vitro* and *in vivo*. *Molecules*. 2016 Oct 31;21(11):1-11. doi: 10.3390/molecules21111456. PubMed PMID: 27809254.

Ciandrini E, Campana R, Baffone W. Live and heat-killed *Lactobacillus* spp. interfere with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus oralis* during biofilm development on titanium surface. *Arch Oral Biol*. 2017 Jun;78:48-57. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.004. PubMed PMID: 28193570.

Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol*. 2007 Nov 12; 7:101. doi: 10.1186/1471-2180-7-101. PubMed PMID: 17997816.

Cook SM, McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*. 2013 Jul;4(5):350-3. doi: 10.4161/viru.25240. PubMed PMID: 23799664.

Couvigny B, Wouters T, Kaci G, Jacouton E, Delorme C, Doré J, et al. Commensal *Streptococcus salivarius* modulates PPAR γ transcriptional activity in human intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 2015 May 6;10(5):1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0125371. PubMed PMID: 25946041.

Couvigny B, Kulakauskas S, Pons N, Quinquis B, Abraham AL, Meylheuc T, et al. Identification of new factors modulating adhesion abilities of the pioneer commensal bacterium. *Front Microbiol*. 2018 Feb 20;9:1-13. doi: 10.3389/fmicb.2018.00273. PubMed PMID: 29515553.

Cury PR, Carmo JP, Horewicz VV, Santos JN, Barbuto JA. Altered phenotype and function of dendritic cells in individuals with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2013 Sep;58(9):1208-16. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.03.013. PubMed PMID: 23623310.

De Gregorio PR, Tomás MSJ, Terraf MCL, Nader-Macías MEF. *In vitro* and *in vivo* effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. *J Med Microbiol*. 2014 May; 63(5):685-96. doi: 10.1099/jmm.0.069401-0. PubMed PMID: 24523160.

De Gregorio PR, Tomás MSJ, Nader-Macías MEF. Immunomodulation of *Lactobacillus reuteri* CRL1324 on group B Streptococcus vaginal colonization in a murine experimental model. *Am J Reprod Immunol*. 2016 Jan; 75(1):23-35. doi: 10.1111/aji.12445. PubMed PMID: 26547516.

Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010 Jun;53:28-44. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00326.x. PubMed PMID: 20403103.

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

Dorn BR, Leung KL, Progulske-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun*. 1998 Dec;66(12):6054-7. PubMed PMID: 9826397.

Doungudomdacha S, Rawlinson A, Walsh TF, Douglas CW. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol*. 2001 May;28(5):437-45. PubMed PMID: 11350507.

Elavarasu S, Suthanthiran T, Thangavelu A, Kanagaraj SS, Mohandas L, Sekar S. Evaluation of efficacy of probiotic (BIFILAC) on *Porphyromonas gingivalis*: *in vitro* study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2016 Oct;8(1):45-47. doi: 10.4103/0975-7406.191966. PubMed PMID: 27829746.

Engen SA, Schreurs O, Petersen F, Blix IJS, Baekkevold ES, Schenck K. The regulatory role of the oral commensal *Streptococcus mitis* on human monocytes. *Scand J Immunol*. 2018 Feb, 87(2):80-7. doi: 10.1111/sji.12636. PubMed PMID: 29194752.

Fernández CE, Giacaman RA, Tenuta LM, Cury JA. Effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB21 on the cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in a dual-species biofilm model. *Caries Res*. 2015;49(6):583-90. doi: 10.1159/000439315. PubMed PMID: 26451810.

Field CA, Gidley M, Preshaw PM, Jakubovics N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol Res*. 2012 Aug;47(4):470-8. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01455.x. PubMed PMID: 22220967.

Flichy-Fernández AJ, Ata-Ali J, Alegre-Domingo T, Candel-Martí E, Ata-Ali F, Palacio JR, et al. The effect of orally administered probiotic *Lactobacillus reuteri*-containing tablets in peri-implant mucositis: a double-blind randomized controlled trial. *J Periodontol Res*. 2015 Dec;50(6):775-85. doi: 10.1111/jre.12264. PubMed PMID: 25712760.

Freitak D, Ots I, Vanatoa A, Peeter Hõrak P. Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae. *Proc Biol Sci*. 2003 Nov 7;270(2):220-2. doi: 10.1098/rsbl.2003.0069. PubMed PMID: 14667388.

Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar;44(18):S94-S105. doi: 10.1111/jcpe.12677. PubMed PMID: 28266116.

Geraldo BMC. Efeito antimicrobiano e imunomodulador de *Lactobacillus reuteri* em cultura osteoblastos e *Galleria mellonella* desafiados por *Porphyromonas gingivalis* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

Goad J, Bharrhan S, Garg N, Rishi P. Antibacterial and immunomodulatory effect of cell free supernatant of *Lactobacillus plantarum* against *Shigella flexneri*. *J Gastro Infs*. 2013; 3(1):33-40.

Gomes FI, Aragão MG, Barbosa FC, Bezerra MM, de Paulo Teixeira Pinto V, Chaves HV. Inflammatory cytokines interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α - novel biomarkers for the detection of periodontal diseases: a literature review. *J Oral Maxillofac Res*. 2016 Jun 30;7(2):1-10. doi: 10.5037/jomr.2016.7202. PubMed PMID: 27489606.

Graves DT, Oskoui M, Volejnikova S, Naguib G, Cai S, Desta T, et al. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J Dent Res*. 2001 Oct;80(10):1875-9. doi: 10.1177/00220345010800100301. PubMed PMID: 11706944.

Grounta A, Harizanis P, Mylonakis E, Nychas GJ, Panagou EZ. Investigating the effect of different treatments with Lactic Acid Bacteria on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* infection in *Galleria mellonella* larvae. *PLoS One*. 2016 Sep 12;11(9):1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0161263. PubMed PMID: 27618619.

Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2016 May;48:16-25. doi: 10.1016/j.jdent.2016.03.002. PubMed PMID: 26965080.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994 Jun;5:78-111. PubMed PMID: 9673164.

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

Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Oct;21(5):326-32. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00299.x. PubMed PMID: 16922933.

Hemarajata P, Gao C, Pflughoeft KJ, Thomas CM, Saulnier DM, Spinler JK, et al. *Lactobacillus reuteri*-specific immunoregulatory gene rsiR modulates histamine production and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri*. *J Bacteriol*. 2013 Dec;195(24):5567-76. doi: 10.1128/JB.00261-13. PubMed PMID: 24123819.

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2002;29(3):136-59. PubMed PMID: 12787214.

Holz C, Busjahn A, Mehling H, Arya S, Boettner M, Habibi H, Lang C. Significant reduction in *Helicobacter pylori* load in humans with non-viable *Lactobacillus reuteri* DSM17648: a pilot study. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2015 Jun;7(2):91-100. doi: 10.1007/s12602-014-9181-3. PubMed PMID: 25481036.

Jepsen K, Jepsen S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontol* 2000. 2016 Jun;71(1):82-112. doi: 10.1111/prd.12121. PubMed PMID: 27045432.

Jiang Q, Stamatova I, Kainulainen V, Korpela R, Meurman JH. Interactions between *Lactobacillus rhamnosus* GG and oral micro-organisms in an in vitro biofilm model. *BMC Microbiol*. 2016 Jul 12;16(1):1-11. Doi: 10.1186/s12866-016-0759-7.

Jones ML, Martoni CJ, Prakash S. Oral supplementation with probiotic *L. reuteri* NCIMB 30242 increases mean circulating 25-hydroxyvitamin D: a post hoc analysis of a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jul;98(7):2944-51. doi: 10.1210/jc.2012-4262. PubMed PMID: 23609838.

Jones SE, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol*. 2009 Feb 11; 9:35. doi: 10.1186/1471-2180-9-35. PubMed PMID: 19210794.

Jorjão AL, Oliveira FE, Leão MVP, Jorge AOC, Oliveira LD. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the response of *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infections. *Arch Microbiol*. 2018 Apr;200(3):383-9. doi: 10.1007/s00203-017-1441-7. PubMed PMID: 29177947.

- Kang MS, Oh JS, Lee HS, Lee SW, Yang KH, Choi NK, et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. J Microbiol. 2011 Apr;49(2):193-9. doi: 10.1007/s12275-011-0252-9. PubMed PMID: 21538238.
- Karimi S, Ahl D, Vågesjö E, Holm L, Phillipson M, Jonsson H, et al. *In vivo* and *in vitro* detection of luminescent and fluorescent *Lactobacillus reuteri* and application of red fluorescent mCherry for assessing plasmid persistence. PLoS One. 2016 Mar 22;11(3):1-22. doi: 10.1371/journal.pone.0151969. PubMed PMID: 27002525.
- Kaur G, Grover V, Bhaskar N, Kaur RK, Jain A. Periodontal infectogenomics. Inflamm Regen. 2018;38:1-8. doi: 10.1186/s41232-018-0065-x. PubMed PMID: 29760828
- Khalighinejad N, Aminoshariae MR, Aminoshariae A, Kulild JC, Mickel A, Fouad AF. Association between systemic diseases and apical periodontitis. J Endod. 2016 Oct;42(10):1427-34. doi: 10.1016/j.joen.2016.07.007. PubMed PMID: 27592295.
- Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. Periodontol 2000. 2007;43:294-315. doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00166.x. PubMed PMID: 17214846.
- Krzyściak W, Kościelniak D, Papież M, Vyhouskaya P, Zagórska-Świeży K, Kołodziej I, et al. Effect of a *Lactobacillus salivarius* probiotic on a double-species *Streptococcus Mutans* and *Candida Albicans* caries biofilm. Nutrients. 2017 Nov 14;9(11):1-23. doi: 10.3390/nu9111242. PubMed PMID: 29135948.
- Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. Oral Microbiol Immunol. 2004 Jun;19(3):168-76. doi: 10.1111/j.0902-0055.2004.00135.x. PubMed PMID: 15107068.
- Kubota M, Yanagita M, Mori K, Hasegawa S, Yamashita M, Yamada S, et al. The effects of cigarette smoke condensate and nicotine on periodontal tissue in a periodontitis model mouse. PLoS One. 2016 May 20;11(5):1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0155594. PubMed PMID: 27203240.
- 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 Dec;20(6):354-61. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00239.x.
- Loh JMS, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. Virulence. 2013 Jul 1; 4(5):419-28. doi: 10.4161/viru.24930. PubMed PMID: 23652836.
- Lin FY, Hsiao FP, Huang CY, Shih CM, Tsao NW, Tsai CS, et al. *Porphyromonas gingivalis* GroEL induces osteoclastogenesis of periodontal ligament cells and enhances alveolar bone resorption in rats. PLoS One. 2014 Jul 24;9(7):1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0102450. Pubmed PMID: 25058444.

Lin TH, Lin CH, Pan TM. The implication of probiotics in the prevention of dental caries. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Jan;102(2):577-86. doi: 10.1007/s00253-017-8664-z. PubMed PMID: 29192351.

Lin X, Chen X, Chen Y, Jiang W, Chen H. The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Dis*. 2015 Jan;21(1):128-34. doi: 10.1111/odi.12257. PubMed PMID: 24806217.

Lin X, Chen X, Tu Y, Wang S, Chen H. Effect of probiotic Lactobacilli on the growth of *Streptococcus Mutans* and multispecies biofilms isolated from children with active caries. *Med Sci Monit*. 2017 Aug 30;23:4175-81. PubMed PMID: 28851857.

Lindlbauer KA, Marx H, Sauer M. 3-Hydroxypropionaldehyde production from crude glycerol by *Lactobacillus diolivorans* with enhanced glycerol uptake. *Biotechnol Biofuels*. 2017 Dec 7; 10:1-11. doi: 10.1186/s13068-017-0982-y. PubMed PMID: 29225699.

Lopez M, Li N, Kataria J, Russell M, Neu J. Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr*. 2008 Nov;138(11):2264-8. doi: 10.3945/jn.108.093658. PubMed PMID: 18936229.

Maeda N, Okamoto M, Kondo K, Ishikawa H, Osada R, Tsurumoto A, et al. Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. *Microbiol Immunol*. 1998;42(9):583-9. PubMed PMID: 9802558.

Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res*. 2014 Dec;49(6):785-91. doi: 10.1111/jre.12164. PubMed PMID: 24483135.

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. PubMed PMID: 26970230.

Matsui A, Jin JO, Johnston CD, Yamazaki H, Houry-Haddad Y, Rittling SR. Pathogenic bacterial species associated with endodontic infection evade innate immune control by disabling neutrophils. *Infect Immun*. 2014 Oct;82(10):4068-79. doi: 10.1128/IAI.02256-14. PubMed PMID: 25024367.

Matsuzaki T, Chin J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol*. 2000 Feb;78(1):67-73. doi: 10.1046/j.1440-1711.2000.00887.x. PubMed PMID: 10651931.

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. PubMed PMID: 23389860.

Miguel-Infante A, Martinez-Huedo MA, Mora-Zamorano E, Hernández-Barrera V, Jiménez-Trujillo I, Burgos-Lunar C, et al. Periodontal disease in adults with diabetes, prevalence and risk factors. Results of an observational study. *Int J Clin Pract*. 2018 Nov;e13294. doi: 10.1111/ijcp.13294. PubMed PMID: 30444571. [Epub ahead of print]

Mínguez M, Ennibi OK, Pousa X, Lakhdar L, Abdellaoui L, Sánchez M, et al. Characterization of *A. actinomycetemcomitans* strains in subgingival samples from periodontitis subjects in Morocco. 2016 Sep; 20(7):1809-18. doi: 10.1007/s00784-015-1653-7. PubMed PMID: 26592810.

Mohd-Dom T, Ayob R, Mohd-Nur A, Abdul-Manaf MR, Ishak N, Abdul-Muttalib K, et al. Cost analysis of periodontitis management in public sector specialist dental clinics. *BMC Oral Health*. 2014 May 20;14:1-10. doi: 10.1186/1472-6831-14-56. PubMed PMID: 24884465.

Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1995 Feb;22(2):124-30. PubMed PMID: 7775668.

Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med*. 1987;38:417-32. doi: 10.1146/annurev.me.38.020187.002221. PubMed PMID: 3555304.

Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, Vilcinskis A, Chakraborty T. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Jan; 76(1):310-7. doi: 10.1128/AEM.01301-09. PubMed PMID: 19897755.

Nalawade TM, Bhat K, Sogi SH. Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015 Mar; 5(2):114-9. doi: 10.4103/2231-0762.155736. PubMed PMID: 25992336.

Neal-McKinney JM, Lu X, Duong T, Larson CL, Call DR, Shah DH, et al. Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS One*. 2012 Sep 4;7(9):1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0043928. PubMed PMID: 22962594.

Oh PL, Benson AK, Peterson DA, Patil PB, Moriyama EN, Roos S, Walter J. Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven Evolution. *ISME J*. 2010 Mar;4(3):377-87. doi: 10.1038/ismej.2009.123. PubMed PMID: 19924154.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:9-11. PubMed PMID: 9567963.

Pai BM, Rajesh G, Shenoy R, Rao A. Anti-microbial efficacy of soursop leaf extract (*Annona muricata*) on oral pathogens: an *in-vitro* study. J Clin Diagn Res. 2016 Nov 1;10(11):ZC01-ZC4. doi:10.7860/JCDR/2016/18329.8762. PubMed PMID: 28050493.

Patini R, Staderini E, Lajolo C, Lopetuso L, Mohammed H, Rimondini L, et al. Relationship between oral microbiota and periodontal disease: a systematic review. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018 Sep;22(18):5775-88. doi: 10.26355/eurev_201809_15903. PubMed PMID: 30280756.

Pearce C, Bowdent GH, Evans M, Fitzsimmons SP, Johnsons J, Sheridan MJ, et al. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. J Med Microbiol. 1995 Jan; 42(1):67-72. doi: 10.1099/00222615-42-1-67. PubMed PMID: 7739028.

Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of periodontal diseases. A review. Biotechnol & Biotechnol Eq. 2014 Apr;27(3):3754-9. doi: 10.5504/BBEQ.2013.0027.

Poppi LB, Rivaldi JD, Coutinho TS, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJP, Mancilha IM. Effect of *Lactobacillus* sp. Isolates supernatant on *Escheria coli* 0157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. Pesq Vet Bras. 2015 Apr; 35(4):353-9. doi: 10.1590/S0100-736X2015000400007.

Price CD, Ratcliffe NA. A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1974 Mar 21;147(4):537-49. PubMed PMID: 4407658.

Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, et al. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from L. rhamnosus strain GG. Clin Infect Dis. 1999 May;28(5):1159-60. doi: 10.1086/514766. PubMed PMID: 10452653.

Ribeiro FC, Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. J Appl Microbiol. 2017 Jan; 122(1):201-11. doi: 10.1111/jam.13324. PubMed PMID: 27727499.

Ricci MA, Russo A, Pisano I, Palmieri L, de Angelis M, Agrimi G. Improved 1,3-propanediol synthesis from glycerol by the robust *Lactobacillus reuteri* strain DSM 20016. J Microbiol Biotechnol. 2015 Jun;25(6):893-902. doi: 10.4014/jmb.1411.11078. PubMed PMID: 25588555.

Rodrigues VAA, Avila ED, Nakano V, Avila-Campos MJ. Qualitative, quantitative and genotypic evaluation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* isolated from individuals with different periodontal clinical conditions. Anaerobe. 2018 Aug; 52:50-8. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.05.015. PubMed PMID: 29857043.

Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*. 2013 Aug 14;14(2):195-206. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012. PubMed PMID: 23954158.

Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis*. 2008 Feb 1;46(2):58-61. doi: 10.1086/523341. PubMed PMID: 18181724.

Sajedinejad N, Paknejad M, Houshmand B, Sharafi H, Jelodar R, Shahbani Zahiri H, et al. *Lactobacillus salivarius* NK02: a potent probiotic for clinical application in mouthwash. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018 Sep; 10(3):485-95. doi: 10.1007/s12602-017-9296-4. PubMed PMID: 28631250.

Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B, Britton RA. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*. 2010 Jun;156(6):1589-99. doi: 10.1099/mic.0.035642-0. PubMed PMID: 20150236.

Scorzoni L, Silva ACAP, Singulani JL, Leite FS, Oliveira HC, Silva RAM, et al. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. *Virulence*. 2015; 6(8):766-76. doi: 10.1080/21505594.2015.1085277. PubMed PMID: 26552324.

Seow WK, Lam JHC, Tsang AKL, Holcomber T, Bird PS. Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children - a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent*. 2009 Nov;19(6):406-11. doi: 10.1111/j.1365-263X.2009.01003.x. PubMed PMID: 19732193.

Shah MP, Gujjari SK, Chandrasekhar VS. Evaluation of the effect of probiotic (inersan®) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. *J Clin Diagn Res*. 2013 Mar;7(3):595-600. doi: 10.7860/JCDR/2013/5225.2834. PubMed PMID: 23634432.

Singh BR. Antibacterial Activity of glycerol, lactose, maltose, mannitol, raffinose and xylose. *Medicine*. 2014;1-2.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44. PubMed PMID: 9495612.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55. PubMed PMID: 12013340.

Spinler JK, Sontakke A, Hollister EB, Venable SF, Oh PL, Balderas MA, et al. From prediction to function using evolutionary genomics: human-specific ecotypes of *Lactobacillus reuteri* have diverse probiotic functions. *Genome Biol Evol*. 2014 Jun;6(7):1772-89. doi: 10.1093/gbe/evu137. PubMed PMID: 24951561.

Susin C, Haas AN, Albandar JM. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2014 Jun;65(1):27-45. doi: 10.1111/prd.12019. PubMed PMID: 24738585.

Szkaradkiewicz AK, Karpin Ski TM, Zeidler A, Szkaradkiewicz A. Opposite effect of supernatants from selected periopathogens and oral lactobacilli cultures on ATP levels in human gingival fibroblasts. *New Microbiol Oct*. 2014;37(4):509-16. PubMed PMID: 25387288.

Szymanowska-Powalowska D. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. *Electron J Biotechnol*. 2015 Mar;18(2):128-33.

Takahashi N, Saito K, Schachtele CF, Yamada T. Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol*. 1997 Dec;12(6):323-8. PubMed PMID: 9573805.

Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989 May;33(5):674-9. PubMed PMID: 2751282.

Taranto MP, Vera JL, Hugenholtz J, De Valdez GF, Sesma F. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J Bacteriol*. 2003 Sep;185(18):5643-7. doi: 10.1128/JB.185.18.5643-5647.2003. PubMed PMID: 12949118.

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. PubMed PMID: 21499799.

Tekce M, Ince G, Gursoy H, Dirikan Ipci S, Cakar G, Kadir T, et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr;42(4):363-72. doi: 10.1111/jcpe.12387. PubMed PMID: 25728888.

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 Nov;40(11):1025-35. doi: 10.1111/jcpe.12155. PubMed PMID: 24164569.

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

Thomas CM, Saulnier DM, Spinler JK, Hemarajata P, Gao C, Jones SE, et al. FolC2-mediated folate metabolism contributes to suppression of inflammation by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Microbiologyopen*. 2016 Oct;5(5):802-18. doi: 10.1002/mbo3.371. PubMed PMID: 27353144.

Thurnheer T, Belibasakis GN, Bostanci N. Colonisation of gingival epithelia by subgingival biofilms in vitro: role of "red complex" bacteria. Arch Oral Biol. 2014 Sep;59(9):977-86. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.023. PubMed PMID: 24949828.

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. PubMed PMID: 18985460.

Vertyporokh L, Taszłow P, Samorek-Pieróg M, Wojda I. Short-term heat shock affects the course of immune response in *Galleria mellonella* naturally infected with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. J Invertebr Pathol. 2015 Sep;130:42-51. doi: 10.1016/j.jip.2015.07.001. PubMed PMID: 26149823.

Vestman NR, Chen T, Holgersson PL, Öhman C, Johansson I. Oral Microbiota Shift after 12-Week Supplementation with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and PTA 5289; a randomized control Trial. PLoS One. 2015 May 6; 10(5):e1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0125812. PubMed PMID: 25946126.

Vicario M, Santos A, Violant D, Nart J, Giner L. Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. Acta Odontol Scand. 2013;71(3-4):813-9. doi: 10.3109/00016357.2012.734404. PubMed PMID: 23176716.

Vilela SFG, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MCA, Anbinder AL, Jorge AOC, Junqueira JC. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. Virulence. 2015 Jan; 6(1):29-39. doi: 10.4161/21505594.2014.981486. PubMed PMID: 25654408.

Vilmos P, Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Immunol Lett. 1998 Jun;62(2):59-66. PubMed PMID: 9698099.

Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. J Oral Microbiol. 2010 Nov 2;2:5344-52. doi: 10.3402/jom.v2i0.5344. PubMed PMID: 21523225.

Wagner RD, Warner T, Roberts L, Farmer J, Balish E. Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. Infect Immun. 1997 Aug;65(8):3345-51. PubMed PMID: 9234796.

Wojda I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. Insect Sci. 2017 Jun; 24(3):342-57. doi: 10.1111/1744-7917.12325. PubMed PMID: 26847724.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. J Clin Periodontol. 2000 Sep; 27(9):648-57. PubMed PMID: 10983598.

Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. Eur J Oral Sci. 2005 Feb; 113(1):28-33. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00192.x. PubMed PMID: 15693826.

Zhou S, Catherine C, Rathnasingh C, Somasundar A, Park S. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by recombinant *Pseudomonas denitrificans*. Biotechnol Bioeng. 2013 Dec; 110(12):3177-87. doi: 10.1002/bit.24980. PubMed PMID: 23775313.

Zhu Y, Xiao L, Shen D, Hao Y. Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. Acta Odontol Scand. 2010 Sep;68(5):261-8. doi: 10.3109/00016357.2010.492235. PubMed PMID: 20491536.