

Ana Carolina Punhagui Hernandez

**Efeitos do queijo probiótico com adição de
Lactobacillus casei-01 na periodontite
experimental em ratos**

ARAÇATUBA – SP

2019

Ana Carolina Punhagui Hernandez

**Efeitos do queijo probiótico com adição de
Lactobacillus casei-01 na periodontite
experimental em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do
Câmpus de Araçatuba – UNESP, para obtenção do Grau de
“Mestre em Odontologia” – Área de Concentração em
Periodontia

Orientadora: Prof^a. Associada Maria José Hitomi Nagata

Co-orientadores: Prof. Associado Michel Reis Messoria

Prof^a. Flávia A. Chaves Furlaneto

ARAÇATUBA – SP

2019

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

H557e Hernandez, Ana Carolina Punhagui.
Efeitos do queijo probiótico com adição de *Lactobacillus casei*-01 na periodontite experimental em ratos / Ana Carolina Punhagui Hernandez. – Araçatuba, 2019
119 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Maria José Hitomi Nagata

Coorientador: Prof. Michel Reis Messorá

Coorientadora: Profa. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto

1. Alimento funcional 2. Probióticos 3. *Lactobacillus casei*
4. Queijo 5. Periodontite 6. Ratos I.T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Ana Carolina Punhagui Hernandez

Nascimento: 29/07/1996 – Fernandópolis/SP

Filiação: João Luís Hernandez
Ana Patrícia Punhagui

2014-2017: Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Brasil – Câmpus de Fernandópolis

2018-2019: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, Área de Concentração em Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP



Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus.

Ele, que por meio da sua infinitude, me guiou por todo esse caminho e me abençoou com essa conquista. O Deus do infinito, justo e bom, que me deu clareza para vencer os obstáculos e despertou o amor em mim. Agradeço pelo amparo nos momentos difíceis que travei, pelo lenço para enxugar as lágrimas que deixei cair e pelo colo para me mostrar que eu não estava sozinha. O Senhor habita em mim e é carregando essa fé que desejo caminhar.

Agradeço a Ti pelo dom da vida, pela saúde e pelas pessoas que têm colocado em minha jornada, que o Seu amor faça morada em meu coração e que eu seja um instrumento desse amor.

*“Senhor, fazei-me instrumento da Vossa paz
Onde houver ódio, que eu leve o amor
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão
Onde houver discórdia, que eu leve a união
E onde houver dúvida, que eu leve a fé.”*

Oração de São Francisco

Dedico este trabalho a minha família.

Minha mãe, Ana Patrícia

Nem o mundo inteiro seria suficiente para agradecer tudo o que tem feito por mim. Você sempre fez o possível e o impossível, em nome do grande amor que sente por mim. Desculpe-me pelos momentos que me fiz ausente fisicamente e de coração e, também, por não saber expressar da forma que merecia a gratidão que sinto por você. Obrigada por ter me apoiado em cada sonho que sonhei, cada batalha que travei e cada sofrimento que passei. Você lutou para me proporcionar o melhor e eu espero poder retribuir pelo menos metade desse carinho e amor. Amo você!

Meus avós, Ariovaldo e Maria Elizabeth

Vocês são minha grande inspiração e a base de toda a família. Sempre apoiaram e ajudaram a todos. Eu não consigo imaginar outra forma de ter me apaixonado pela leitura sem que venha a minha mente a imagem da senhora, vó, sempre com uma revista ou livro na mão, ou a imagem daquele quarto com uma estante repleta de livros, os quais eu me deliciava durante as férias. A senhora é um exemplo de sabedoria e conhecimento que quero sempre ter para minha vida. E o senhor, vô, é o meu exemplo de serenidade. Obrigada por apoiarem minhas escolhas na

carreira profissional e por me impulsionarem a estudar e buscar conhecimento sempre.

Meu pai, João Luís

Pai, obrigada por sempre acreditar em mim e no meu potencial, muitas vezes mais do que eu mesma. O senhor é uma pessoa batalhadora e humilde que se esforça todos os dias pela família. Eu reconheço o grande amor que sente por mim e pela Victória. Obrigada pela infância maravilhosa que pude compartilhar com o senhor e por sempre se manter presente na minha vida. Sou grata ao senhor pelo carinho e compreensão.

“Tudo se resume ao amor. Nós estamos aqui em busca do amor. Este é o elemento alquímico que nos liberta.”

Sri Prem Baba

*Agradecimentos
Especiais*

Agradeço pela realização desse sonho,

A minha orientadora, Prof^a Maria José Hitomi Nagata

Obrigada por todo conhecimento que a senhora me proporcionou até o presente momento e o conhecimento que me proporcionará em meu Curso de Doutorado. O meu primeiro contato com a pesquisa científica se deu com a sua orientação e passado o tempo de estranheza, eu confesso que encontrei na ciência uma área prazerosa de trabalhar. Mas isso vai muito além da simpatia com a pesquisa, isso se deve também ao exemplo da pesquisadora com quem tive o prazer de trabalhar e ser orientada.

A senhora não mediu esforços para me ajudar na realização do meu Exame Geral de Qualificação, deste trabalho e, por fim, na obtenção deste título. Porém, acima de tudo, a senhora não mediu esforços para me ajudar nos meus momentos de fraqueza, de tristeza e de desespero. A senhora não mediu esforços para me lembrar que existe um Deus que está sempre conosco, que a tempestade sempre passará e que no final de tudo, se tivermos sido bons e honestos, a luz do Sol brilhará com mais intensidade e a fé estará fortalecida. Afinal, “se Deus é por nós, quem será contra nós? ”.

Todos os dias a senhora me mostra uma parte de quem é que me faz ter orgulho de ser sua orientada e me faz agradecer a Deus por ter nos colocado juntas nessa caminhada. Mais uma vez, obrigada pela orientação e além disso, obrigada pela amiga que tem demonstrado ser.

*“Para cada tempestade, um arco íris
Para cada lágrima, um sorriso
Para cada cuidado, uma promessa
Para cada problema, a vida lhe traga alguém fiel para dividi-lo
Para cada olhar, uma doce canção
E para cada oração, uma grande resposta. ”*

Pe. Fábio de Melo

Agradeço pela contribuição neste trabalho,

À meu co-orientador, Prof. Michel Reis Messora

Obrigada pela paciência e pelo carinho que teve comigo desde o primeiro momento. O senhor é um grande profissional com quem tive o prazer de trabalhar. Sou grata por ter me proporcionado essa grande oportunidade, juntamente com a Professora Maria José, de conhecer a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e trabalhar com pessoas incríveis.

À minha co-orientadora, Prof^a Flávia A. Chaves

Furlaneto

Obrigada por toda ajuda e orientação que a senhora me proporcionou. Sou grata por todas as vezes que se mostrou disponível caso eu precisasse. Apesar do pouco contato, pude perceber na senhora uma pessoa muito solícita e com grande conhecimento.

À Prof. Edilson Ervolino

Obrigada por todas as vezes que o senhor se mostrou disponível para ajudar e colaborar, tanto para minha formação, como para o desenvolvimento deste trabalho. Os poucos momentos que compartilhamos me permitiu conhecer a pessoa incrível que o senhor é,

competente, amigo, bem-humorado e humilde. O prazer que sente em ensinar é grandioso e o amor pela histologia é admirável. O meu desejo é de aprender mais e mais com o senhor nessa área que também tenho apreço.

Ao Prof. Adriano Gomes da Cruz

Obrigada pelo fornecimento do principal instrumento deste trabalho: os queijos. Obrigada por acreditar no nosso grupo de pesquisa para avaliar os efeitos do alimento funcional desenvolvido pelo senhor.

Ao Pós-graduando Pedro Henrique Felis da Silva

Grande amigo que tive o prazer de conhecer em minha estadia em Ribeirão Preto e que foi responsável pelo desenvolvimento do experimento nos momentos em que eu não podia estar presente. Obrigada por toda a ajuda, por todo o conhecimento que me transmitiu e pela forma com que me acolheu. Você me inspirou a querer conhecer cada vez mais o mundo da pesquisa e fez eu me apaixonar pela Microbiologia.

“Nunca é pequeno o que se faz por amor.”

Chiara Lubich

Agradeço pelos ensinamentos e contribuição em minha formação,

Ao Prof. Juliano Milanezi de Almeida

Obrigada por todo o conhecimento que o senhor transmitiu a mim durante o Curso de Mestrado. É gratificante ter tido o contato com o senhor atuando nas clínicas ou realizando uma cirurgia. Sou grande admiradora da habilidade e facilidade com que opera e o prazer com que ensina, além da competência em desenvolver pesquisa. Obrigada pela forma como o senhor me acolheu, pelos conselhos, pelas risadas e acima de tudo, pelo cuidado e carinho que tem comigo.

Ao Prof. Paulo Henrique Bortoluzo

O senhor foi a inspiração para que eu seguisse a área de Periodontia e não me arrependo nenhum segundo de ter escolhido essa área. Obrigada pelo grande professor que foi para mim durante a Graduação e por estar sempre disponível durante minha Pós-Graduação. Obrigada pelos conselhos e por ser verdadeiro comigo, mostrando sempre qual o melhor caminho. Lembro-me de um dia que o senhor me disse que, com minha competência, eu teria o mundo em minhas mãos e asas para voar para onde quisesse. Essa conquista é o início desse voo e eu aprendi a voar com sua ajuda. Muito obrigada por tudo!

A Prof^a Luciana Estevam Simonato

Obrigada por ter me convidado para apresentar meu primeiro trabalho na Jornada da Faculdade, esse foi o primeiro passo para minha carreira acadêmica. Obrigada por ter acreditado no meu potencial dentro da sala de aula e me mostrado o grande mundo que existia lá fora. Eu só tenho que agradecer por tudo o que aprendi com você, todo o apoio que tive em cada apresentação de Congresso e, principalmente, toda força que me ofereceu quando decidi que queria prestar a prova para entrar no Mestrado. Lu, a sua doçura é contagiante, muito obrigada de coração!

Ao Prof. Sérgio Luiz de Souza Salvador

Obrigada pela forma que me acolheu em seu laboratório e me explicou as análises microbiológicas que iríamos realizar. Obrigada também pela preocupação que sempre mostrava com o andamento do meu experimento. O senhor é um grande professor.

*“A gente só encanta quando se encanta.
Se eu não estiver encantado com o meu objeto de conhecimento,
Eu não posso encantar o outro.”*

Mario Sergio Cortella

Agradeço pela amizade, ajuda e compreensão,

As minhas amigas de infância, Beatriz e Tamires

Muito obrigada por terem sonhado esse sonho comigo e entendido todas as vezes que precisei me ausentar por conta das atividades do Mestrado. Obrigada por terem mantido nossa amizade sólida e se fazerem presentes em cada pequena conquista da minha vida. Nossos caminhos se desviaram, mas nossa amizade é para toda a vida. E eu tenho certeza que por mais que a correria do dia a dia tente nos afastar e nossos encontros se tornem cada vez menos frequentes, vocês estarão fortes como pilares quando eu precisar.

As minhas amigas de Graduação, Lara, Carol e Quêren

Dentre tantos colegas, nós nos identificamos. Sempre juntas, compartilhando as alegrias e os desesperos da caminhada da Graduação. Cada uma seguiu seu sonho, mas entendemos que são os rumos que a vida dá. E por mais que seja clichê, eu nunca vou me cansar de repetir para cada uma de vocês: “Amigos podem passar longos períodos sem se falar e jamais questionar essa amizade. Quando eles se encontram, parece que se viram ontem. Entendem que a vida é corrida, mas que você os amará para sempre.”

As amigas que os Congressos me deram, Ângela e Roberta

Ângela e Roberta, obrigada por cada companhia e cada ajuda nos Congressos que participamos juntas. Os momentos que compartilhamos foram tão únicos, que voltamos a repetí-los a cada ano. Eu nunca imaginei que criaria um vínculo tão grande com colegas de outras turmas, mas quando o caráter e os princípios são os mesmos, não tem como ser diferente. Vocês são pessoas de ouro e eu desejo um futuro profissional brilhante para ambas.

A minha amiga-irmã, Natália de Campos Kajimoto

Muito obrigada pela pessoa que você foi e tem sido comigo. Você me acolheu como se eu fosse sua irmã mais nova, me ensinou as vertentes boas e ruins do Mestrado. Eu sinto muita falta dos nossos momentos de trabalho juntas nas cirurgias dos animais e no laboratório, essas atividades eram sempre mais divertidas com você. Agradeço a Deus por ter sido você quem me recebeu em Araçatuba, por ter sido você que estava sendo orientada pela Professora Maria José naquela época, por ter sido você que me ensinou a pesquisar artigos científicos, a fazer todo o processamento laboratorial dos espécimes, a cortar no micrótomo... Ele não poderia ter colocado uma pessoa melhor para me ensinar tudo isso. E eu não digo somente pela sua competência, que é enorme, mas pelo ser humano maravilhoso que você é e pelo coração grandioso que carrega no peito. Eu amo você Nati!

A minha amiga Beatriz Ommati Pirovani,

Obrigada por ter me ajudado nessa fase final e mantido a paciência comigo. Nós nos conhecemos há pouco tempo, mas você é uma pessoa muito boa. Nunca desconfie do seu potencial, você se esforça muito e terá o que quiser em sua vida. Desejo que nossa amizade continue mesmo após o Curso de Mestrado, pois Deus não coloca alguém em nossa vida sem propósito.

Aos orientados do Prof. Juliano, Nathália, David,

Breno, Luiz Guilherme e Henrique

Vocês sempre se mostraram dispostos e de prontidão quando precisei da ajuda de cada um. Lógico, que cada um com sua peculiaridade, mas todos com o mesmo princípio: altruísmo. Sou grata também pela forma com que me acolheram e o carinho com que sempre brincamos uns com os outros. Eu gosto muito de vocês!

Aos colegas da Periodontia, João, Marina, Tiago e

Mariane,

Obrigada pelo convívio agradável e por todo carinho que cada um de vocês demonstram ter comigo. Obrigada por compartilharmos de momentos de muito aprendizado juntos.

*Aos grandes amigos que fiz em Ribeirão Preto, Pedro,
Natacha, Christian, Átila, Milla e Giselle*

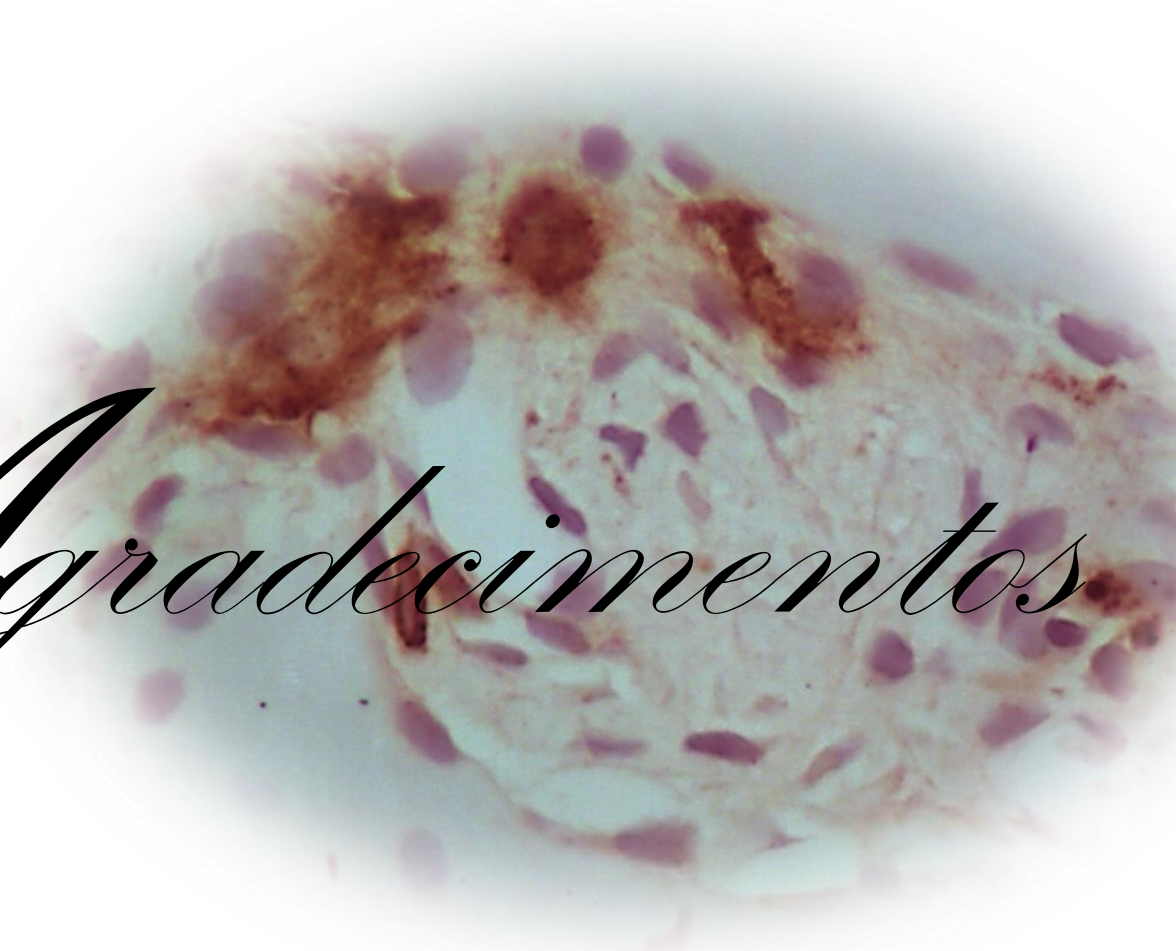
Vocês são os anjos da guarda que Deus mandou para cuidar de mim em Ribeirão Preto. É impossível escrever qualquer agradecimento a vocês sem deixar lágrimas caírem. Minha primeira experiência em uma cidade totalmente desconhecida, longe da minha família por quatro meses, trouxe grandes presentes para mim. A amizade de cada um de vocês é um tesouro. Eu considero surpreendente a forma com que simpatizei com todos, a naturalidade com que nos aproximamos e o carinho com que fui recebida e acolhida. Vocês me ajudaram sem esperar nada em troca, isso para mim é o puro amor ao próximo. Eu sou abençoada por ter conhecido pessoas maravilhosas, de coração enorme, caráter íntegro e extrema alegria. Espero que sejamos sempre amigos e espero que consigamos nos rever sempre, apesar dos desencontros da vida, porque eu sinto muito a falta de vocês. Eu sinto a falta de cada momento que passávamos juntos, até dos momentos mais estressantes, como as eutanásias. Eu amo vocês para sempre!

“Solidão tem sete letras, mas a alegria tem sete letras também.

Segredo tem sete letras, amizade sete letras têm.

Amizade mora no coração, que tem sete letras também. ”

O Segredo da Amizade – Wagner Costa



Agradecimientos

A Direção da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –
UNESP,

Nas pessoas do Diretor Prof. Titular **Glauco Issamu Miyahara**
e Vice-Diretor Prof. Titular **Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia,

Na pessoa do Prof. Associado **André Luiz Fraga Briso**.

Aos colegas do Curso de Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Odontologia

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em
Odontologia,

Pelo conhecimento e experiência transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica
Integrada, **Renato, Paulo e Marco**,

Por sempre se prontificarem a ajudar. Os meus sinceros
agradecimentos.

Ao Laboratório da Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e à técnica **Marina,**

Pelo auxílio com as análises microbiológicas realizadas.

Ao Laboratório de Histologia e Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e à técnica **Milla,**

Pelo auxílio com a organização dos procedimentos experimentais e processamento dos espécimes.

Aos funcionários do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e ao Médico Veterinário **Raphael,**

Por todo o cuidado que tiveram com os animais e o carinho que tiveram comigo.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, **Valéria,**
Cristiane e Lilian,

Por todas as orientações, disponibilidade, auxílio e paciência.
Por serem funcionárias exemplares, sempre dispostas a auxiliar
todos os alunos e professores.

Aos funcionários da Seção de Diretoria Técnica de
Informática

Aos funcionários da Manutenção

Aos vigias,

Por zelarem pela Faculdade e pelos alunos.

Aos alunos do Curso de Graduação

Pelo convívio e aprendizado mútuo.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de
Araçatuba – UNESP

Aos Pacientes,

Sem os quais não teria como obter todo o conhecimento das atividades clínicas. Pela confiança no meu trabalho e pela paciência com o meu aprendizado.

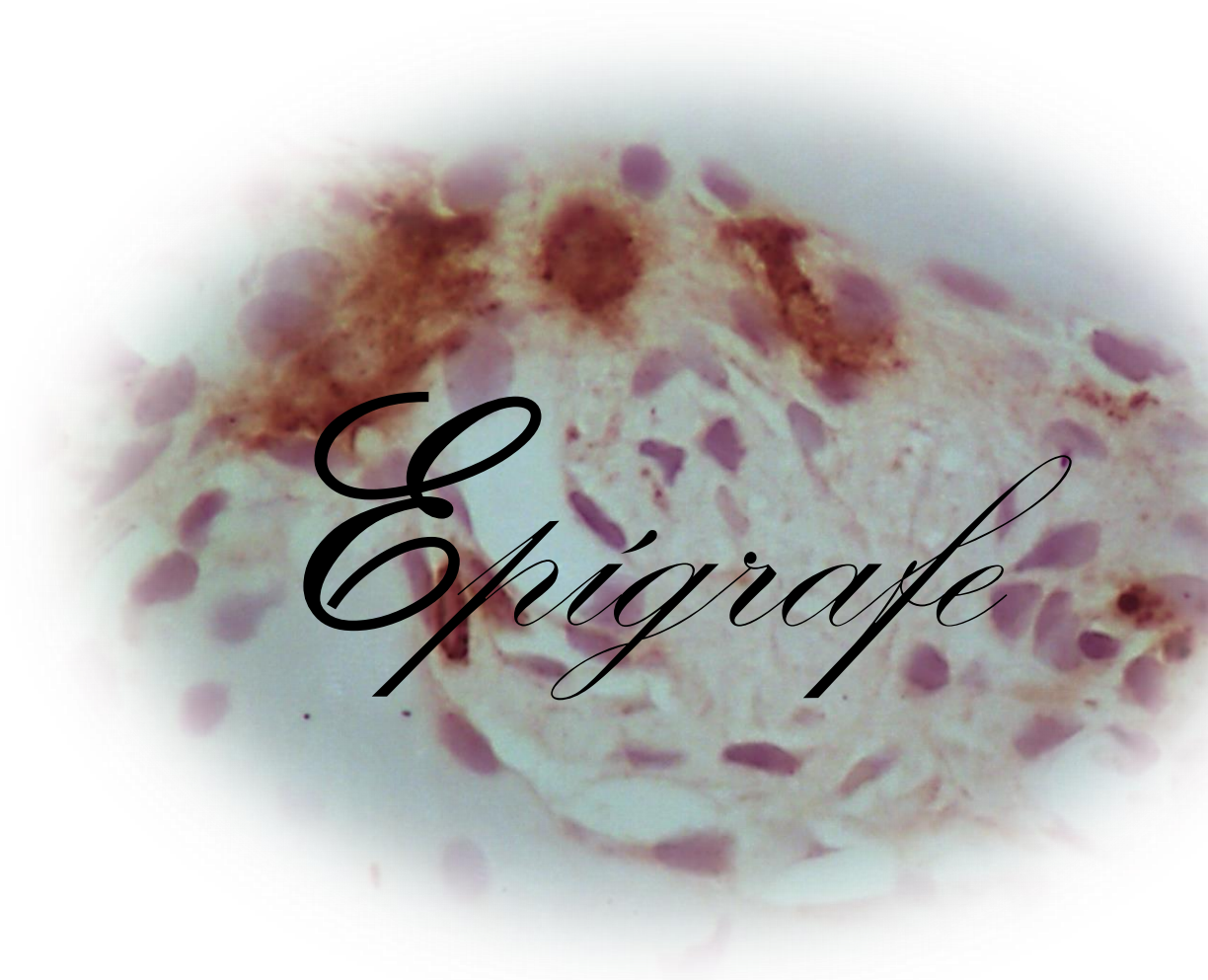
Aos animais,

Pelo sacrifício de suas vidas para o desenvolvimento das ciências. Meu profundo agradecimento e respeito.

Aqueles,

Que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e para a minha educação e formação profissional...

...Minha sincera **GRATIDÃO.**



Epigrafe

*“Toda coragem precisa de um medo para existir.
Uma dependência complicada de sentir.
A coragem de levantar vem do medo de cair.
Use sempre a coragem para se fortalecer.
E quando o medo surgir, não precisa se esconder.
Faça que o seu próprio medo tenha medo de você.”*

Braulio Bessa



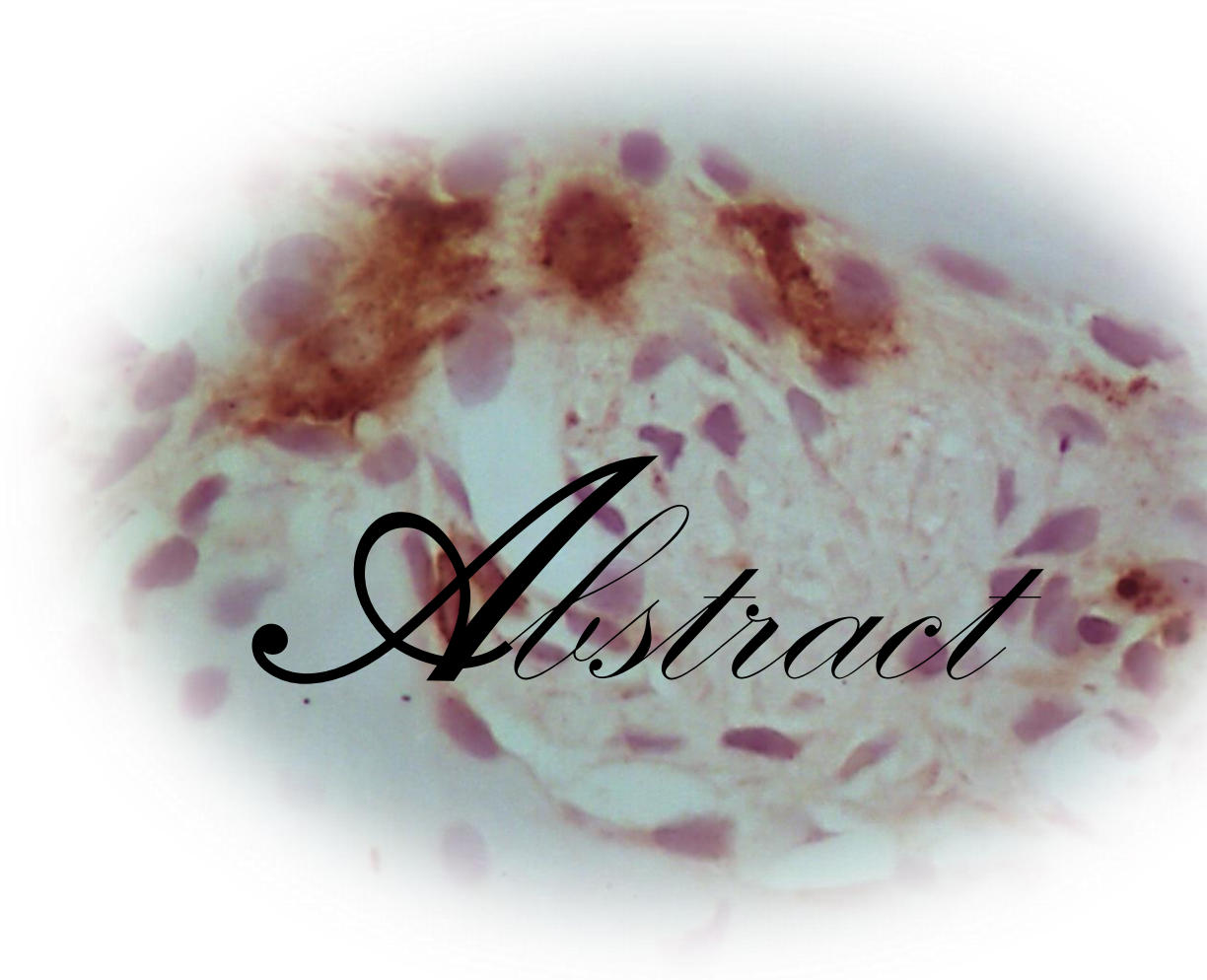
Resumo

Hernandes ACP. Efeitos do queijo probiótico com adição de *Lactobacillus casei*-01 na periodontite experimental em ratos [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019.

Objetivo: Este estudo avaliou os efeitos da ingestão de alimento funcional, queijo Prato contendo *Lactobacillus casei*-01, no desenvolvimento da periodontite experimental (PE) em ratos. **Materiais e Métodos:** 44 ratos machos Wistar foram divididos em 4 grupos (n = 11): C (controle) - animais sem indução de PE e alimentados com ração convencional (RC) + queijo convencional (CONV); PROB - animais sem indução de PE e alimentados com RC + queijo probiótico (PROB); PE - animais com indução de PE e alimentados com RC + queijo CONV e PE-PROB - animais com indução de PE e alimentados com RC + queijo PROB. O queijo Prato foi fabricado por método tradicional com bactérias lácticas, suplementado ou não com a cepa probiótica *Lactobacillus casei*-01. No dia 0 do experimento, queijo CONV ou PROB, de acordo com o grupo experimental, foi administrado oralmente para todos os animais 1 x / dia até o final do experimento. No dia 28, a PE foi induzida nos primeiros molares inferiores direito e esquerdo dos animais dos grupos PE e PE-PROB. No dia 42, todos os animais foram submetidos à eutanásia. Foram realizadas análises microtomográfica na região da bifurcação e nos sítios vestibular, lingual e interproximais [volume ósseo (BV), número de trabéculas (Tb.N), espessura das trabéculas (Tb.Th), perda óssea alveolar (ABL)] e análises histológica (parâmetros dos tecidos moles e duros), histométrica [porcentagem de osso na furca (PBF)] e imunoistoquímica [fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina (IL)-1 β , IL-10, fator de crescimento transformador- β 1 (TGF β 1) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)] na região da furca. Foram realizadas análises histológica (parâmetros de inflamação, celularidade e estruturação tecidual) e histométrica [altura de vilosidades (VH) e profundidade de cripta (CD)] nos tecidos intestinais. Os dados foram submetidos à análise estatística. **Resultados:** Os valores de BV foram similares em todos os grupos experimentais. No entanto, os grupos PE e PE-PROB apresentaram Tb.N significativamente maior e Tb.Th significativamente menor que os grupos C e PROB. O grupo PE apresentou PBF significativamente menor que os grupos C e PROB, e similar ao grupo PE-PROB. Os grupos PE e PE-PROB apresentaram maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1 β) e TRAP que os grupos C e PROB. O grupo PE-PROB apresentou maior expressão de citocinas anti-inflamatórias (TGF β 1 e IL-10) que o grupo PE. Não houve diferenças

significativas para os valores de VH e CD entre os grupos experimentais. **Conclusão:** O consumo de queijo Prato, tanto CONV como PROB, teve efeito protetor nos tecidos periodontais durante o desenvolvimento da PE em ratos. Contudo, o queijo PROB parece ter estimulado principalmente a expressão de citocinas anti-inflamatórias, quando comparado ao queijo CONV, favorecendo o processo de reparo tecidual.

Palavras-chave: alimento funcional; probióticos; *Lactobacillus casei*; queijo; periodontite; ratos.



Abstract

Hernandes ACP. Effects of probiotic cheese supplemented with *Lactobacillus casei*-01 on experimental periodontitis in rats [Dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2019.

Objective: This study evaluated the effects of a functional food (Prato cheese) intake supplemented with *Lactobacillus casei*-01 in experimental periodontitis (EP) in rats.

Materials and Methods: 44 Wistar male rats were divided into 4 groups (n = 11): C (control) - animals without EP induction and fed with conventional feed (CF) + conventional cheese (CONV); PROB - animals without EP induction and fed with CF + probiotic cheese (PROB); EP - animals with EP induction and fed with CF + CONV cheese; and EP-PROB - animals with EP induction and fed with CF + PROB cheese. Prato cheese was produced by traditional lactic bacteria manufacturing method, supplemented or not with the probiotic strain *Lactobacillus casei*-01. On day 0, either CONV or PROB cheese, according to the experimental group, was orally administered to all animals once a day until the end of the experiment. On day 28, EP was induced on the right and left mandibular first molars of the animals of groups EP and EP-PROB. On day 42, all animals were euthanized. Microtomographic analysis was performed in the furcation region and at the buccal, lingual and interproximal sites [bone volume (BV), trabeculae number (Tb.N), trabeculae thickness (Tb.Th), alveolar bone loss (ABL)]. Histologic (hard and soft tissue parameters), histometric [bone percentage in the furcation area (PBF)] and immunohistochemical [transforming growth factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-10, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)] analyses were performed in the furcation region. Histologic (inflammatory, cellularity and tissue structure parameters) and histometric [villi height (VH) and crypt depth (CD)] analyses were performed in the intestinal tissues. Data were statistically analyzed. **Results:** BV values were similar in all experimental groups. However, groups EP and EP-PROB presented significantly greater Tb.N and significantly lower Tb.Th than groups C and PROB. Group EP presented significantly lower PBF than groups C and PROB, and similar to group EP-PROB. Groups EP and EP-PROB presented higher expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and TRAP than groups C and PROB. Group EP-PROB presented higher expression of anti-inflammatory cytokines (TGF β 1 e IL-10) than group EP. No significant differences were observed among groups for VH and CD values. **Conclusion:** CONV as well as PROB Prato cheese intake promoted a

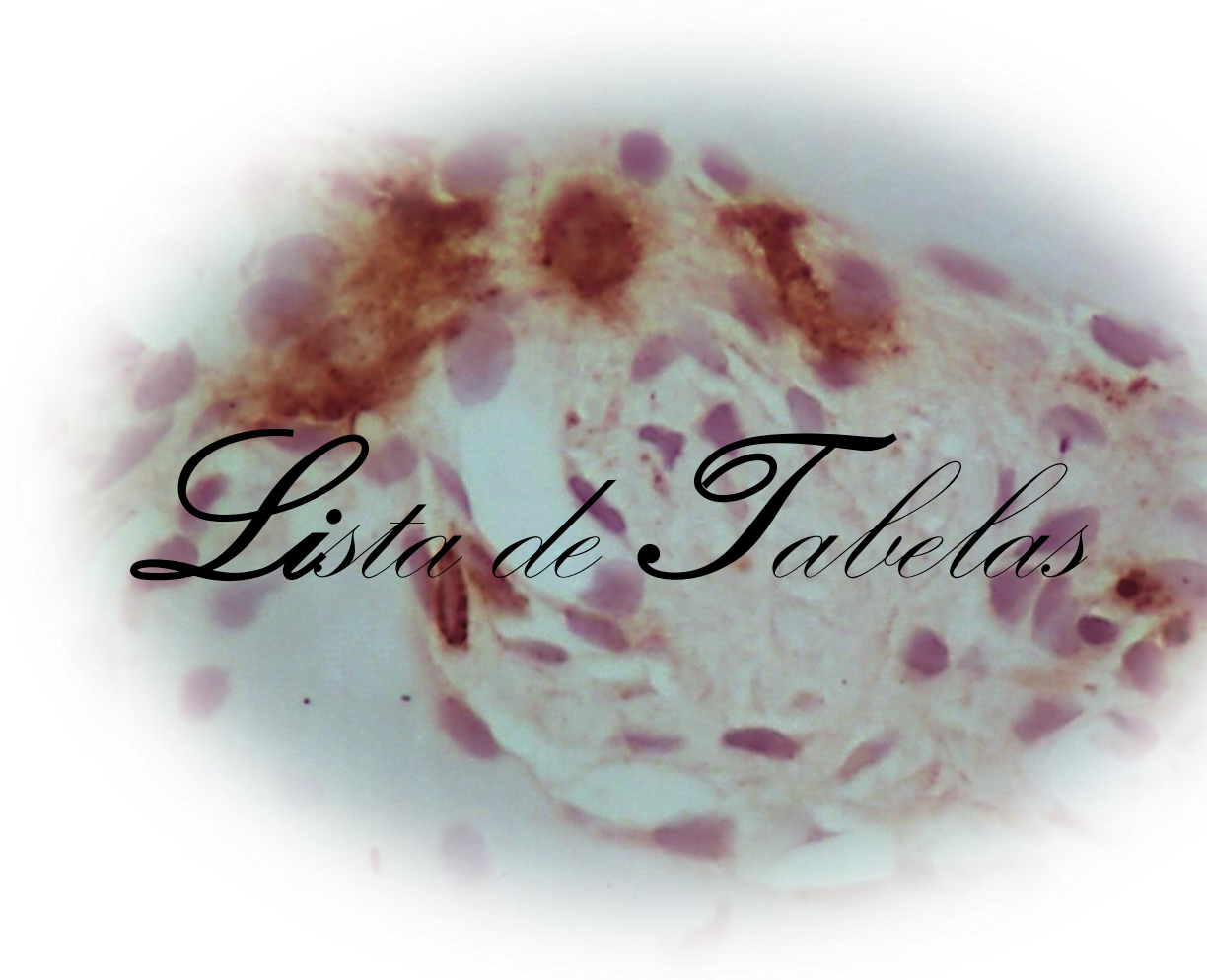
protective effect on periodontal tissues during EP induction in rats. However, PROB cheese seems to mainly stimulate the expression of anti-inflammatory cytokines when compared with CONV cheese, favoring tissue repair process.

Key-words: functional food; probiotics; *Lactobacillus casei*; cheese; periodontitis; rats.



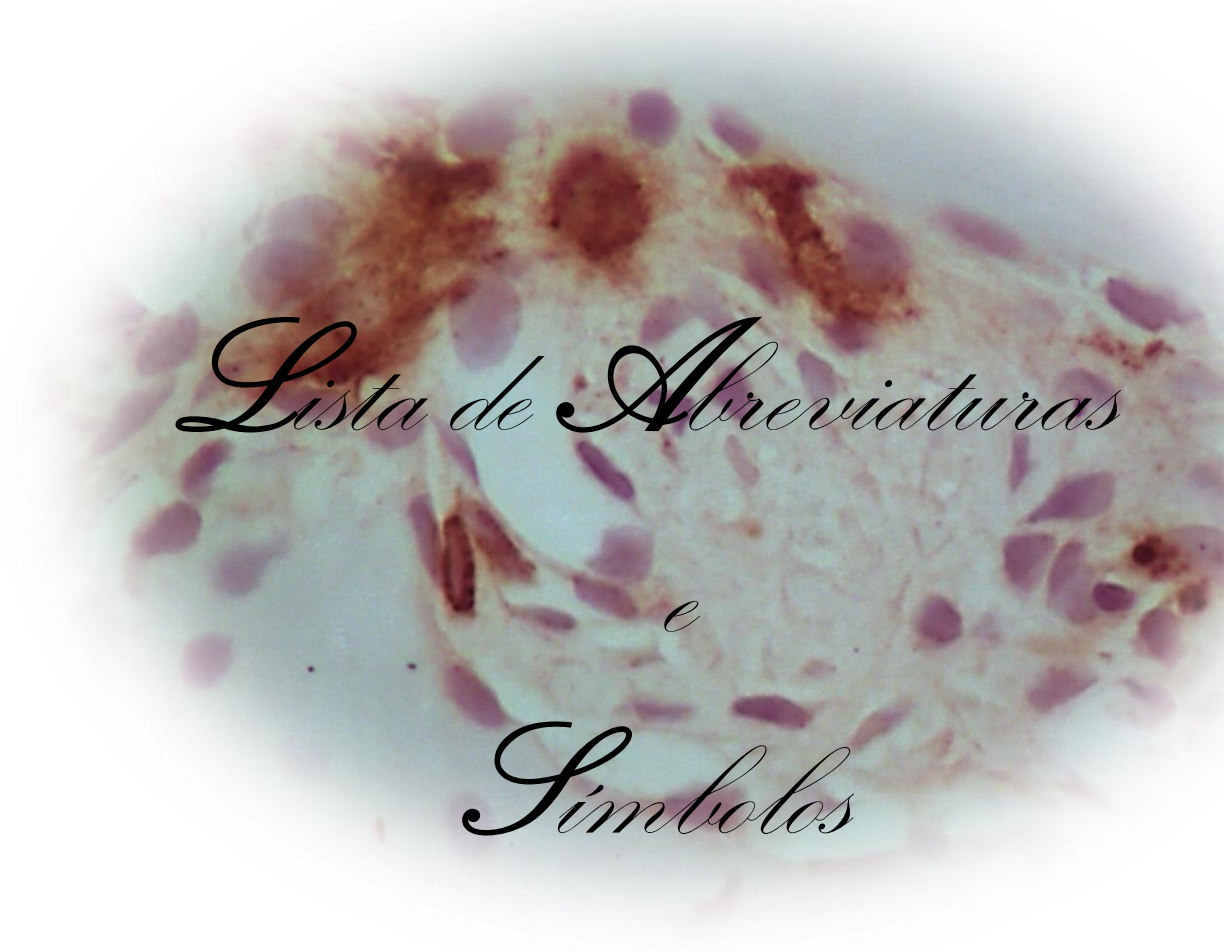
Lista de Figuras

Figura 1	Delineamento experimental.	89
Figura 2	Médias e desvios-padrão dos pesos de todos os animais de cada grupo nos dias 0, 28 e 42 do experimento, com comparações intragrupos. Médias e desvios-padrão da quantidade de queijo consumido dos animais de todos os grupos durante todo o experimento.	90
Figura 3	Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos BV, Tb.N, Tb.Th e lineares ABL com comparações intergrupos. Imagens representativas de reconstruções tridimensionais renderizadas de secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais dos grupos C, PE, PROB e PE-PROB.	91
Figura 4	Fotomicrografias evidenciando a magnitude da resposta inflamatória periodontal nos grupos C, PROB, PE e PE-PROB. Médias e $\pm$ da PBF, com comparações intergrupos.	92
Figura 5	Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP na área de furca do primeiro molar inferior esquerdo nos grupos C, PROB, PE e PE-PROB. Médias e desvios-padrão do número de células TRAP-positivas, com comparações intergrupos.	93
Figura 6	Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para IL-10 e TGF β 1 na área de furca do primeiro molar inferior esquerdo nos grupos C, PROB, PE e PE-PROB. Medianas, intervalos interquartis e valores máximos e mínimos dos padrões de imunomarcações para IL-10 e TGF- β 1.	94
Figura 7	Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TNF α e IL-1 β na área de furca do primeiro molar inferior esquerdo nos grupos C, PROB, PE e PE-PROB. Medianas, intervalos interquartis e valores máximos e mínimos dos padrões de imunomarcações para TNF α e IL-1 β .	95
Figura 8	Médias e desvios-padrão dos valores de VH e CD de todos os grupos experimentais. Fotomicrografia evidenciando o aspecto histológico do intestino delgado ao nível do duodeno no grupo PE-PROB.	96



Lista de Tabelas

- Tabela 1** Médias e desvios-padrão da contagem de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus casei*-01 dos queijos CONV e PROB, expressos em log UFC / g, com comparações intergrupos. **62**
- Tabela 2** Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de todos os grupos experimentais. **63**

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing various cellular structures. The tissue is stained with purple (hematoxylin) and brown (likely a counterstain or specific stain). The image is used as a background for the title text.

Lista de Abreviaturas

e

Simbolos

ADA	<i>American Dietetic Association</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
FAO	Food and Agriculture Organization
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
AR	Artrite reumatoide
PE	Periodontite experimental
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
Lc.	<i>Lactococcus</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
C	Controle
RC	Ração convencional
CONV	Convencional
PROB	Probiótico
PBF	Porcentagem de osso na furca (<i>Percentage Bone Furcation</i>)
ABL	Perda óssea alveolar (<i>Alveolar Bone Loss</i>)
BV	Volume ósseo (<i>Bone Volume</i>)
Tb.N	Número de trabéculas (<i>Trabecular Number</i>)
Tb.Sp	Espessura das trabéculas (<i>Trabecular Space</i>)
VOI	Volume de interesse (<i>Volume of interest</i>)
TFA	Área total de furca (<i>Total Furcation Area</i>)
IL	Interleucina
TNFα	Fator de necrose tumoral α

TGF-β1	Fator de crescimento transformador-β1
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
VH	Altura de vilosidades (<i>Villi Height</i>)
CD	Profundidade de cripta (<i>Crypt Depth</i>)
mg/kg	Miligrama/Quilograma
kg	Quilograma
g	Grama
mm	Milímetro
μm	Micrometro
v/v	Volume/Volume
mL	Mililitro
L	Litro
min	Minuto
ms	Milissegundo
h	Hora
NaCl	Cloreto de Sódio
UFC	Unidade Formadora de Colônia
°C	Grau Celsius
HE	Hematoxilina & Eosina
%	Porcentagem
±	Desvio-padrão
<	Menor

Lista de Abreviaturas e Símbolos

MPa Mega Pascal

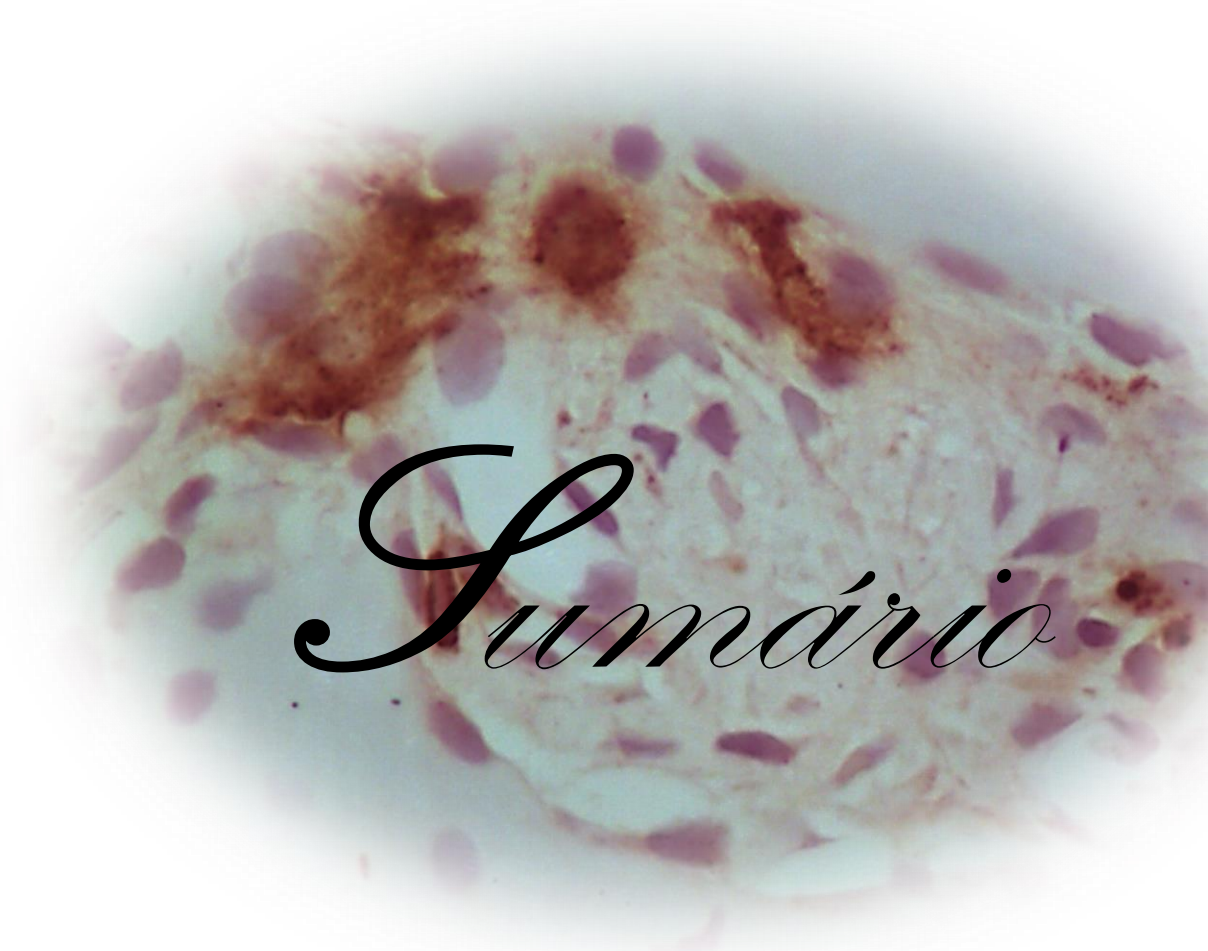
kV Kilovolt

μA Microampere



Lista de Anexos

Anexo A	Normas para publicação no periódico “ <i>Journal of Clinical Periodontology</i> ”	98
Anexo B	Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais	118



Somário

Manuscrito para publicação	45
Título	46
Resumo	47
Introdução	49
Materiais e Métodos	53
Resultados	61
Discussão	66
Conclusão	72
Referências Bibliográficas	74
Figuras	88
Anexos	97

Manuscrito
para
*Publicação **

*Manuscrito elaborado segundo a normatização da revista
Journal of Clinical Periodontology (Anexo A)

Efeitos do queijo probiótico com adição de *Lactobacillus casei*-01 na periodontite experimental em ratos

Ana Carolina Punhagui Hernandez¹, Maria José Hitomi Nagata^{1,*}

¹Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – Disciplina de Periodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, Brasil

***Autora correspondente:**

Maria José Hitomi Nagata

Disciplina de Periodontia - Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Rua José Bonifácio, 1193 CEP: 16015-050 Araçatuba, SP, Brasil

Telefone: +55 18 3636 3271

E-mail: maria.jh.nagata@unesp.br (autorizado para publicação)

Este estudo avaliou os efeitos da ingestão de alimento funcional, queijo Prato contendo *Lactobacillus casei*-01, no desenvolvimento da periodontite experimental (PE) em ratos. 44 ratos machos Wistar foram divididos em 4 grupos (n = 11): C (controle) - animais sem indução de PE e alimentados com ração convencional (RC) + queijo convencional (CONV); PROB - animais sem indução de PE e alimentados com RC + queijo probiótico (PROB); PE - animais com indução de PE e alimentados com RC + queijo CONV e PE-PROB - animais com indução de PE e alimentados com RC + queijo PROB. O queijo Prato foi fabricado por método tradicional com bactérias lácticas, suplementado ou não com a cepa probiótica *Lactobacillus casei*-01. No dia 0 do experimento, queijo CONV ou PROB, de acordo com o grupo experimental, foi administrado oralmente para todos os animais 1 x / dia até o final do experimento. No dia 28, a PE foi induzida nos primeiros molares inferiores direito e esquerdo dos animais dos grupos PE e PE-PROB. No dia 42, todos os animais foram submetidos à eutanásia. Foram realizadas análises microtomográfica na região da bifurcação e nos sítios vestibular, lingual e interproximais [volume ósseo (BV), número de trabéculas (Tb.N), espessura das trabéculas (Tb.Th), perda óssea alveolar (ABL)] e análises histológica (parâmetros dos tecidos moles e duros), histométrica [porcentagem de osso na furca (PBF)] e imunoistoquímica [fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina (IL)-1 β , IL-10, fator de crescimento transformador- β 1 (TGF β 1) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)] na região da furca. Foram realizadas análises histológica (parâmetros de inflamação, celularidade e estruturação tecidual) e histométrica [altura de vilosidades (VH) e profundidade de cripta (CD)] nos tecidos intestinais. Os dados foram submetidos à análise estatística. Os valores de BV foram similares em todos os grupos experimentais. No entanto, os grupos PE e PE-PROB apresentaram Tb.N significativamente maior e Tb.Th significativamente menor que os grupos C e PROB. O grupo PE apresentou PBF significativamente menor que os grupos C e PROB, e similar ao grupo PE-PROB. Os grupos PE e PE-PROB apresentaram maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1 β) e TRAP que os grupos C e PROB. O grupo PE-PROB apresentou maior expressão de citocinas anti-inflamatórias (TGF β 1 e IL-10) que o grupo PE. Não houve diferenças significativas para os valores de VH e CD entre os grupos experimentais. O consumo de queijo Prato, tanto CONV como PROB, teve efeito protetor nos tecidos periodontais durante o desenvolvimento da PE em ratos. Contudo, o queijo PROB parece ter estimulado

principalmente a expressão de citocinas anti-inflamatórias, quando comparado ao queijo CONV, favorecendo o processo de reparo tecidual.

Palavras-chave: alimento funcional; probióticos; *Lactobacillus casei*; queijo; periodontite; ratos.



Introdução

O primeiro conceito de “alimento funcional” surgiu no Japão no final da década de 80, quando foi proposta uma categoria de alimentos que provessem benefícios específicos à saúde (Yamaguchi, 2006). Nos Estados Unidos, “alimentos funcionais” não são oficialmente reconhecidos como uma categoria regulatória pela *Food and Drug Administration*. Segundo a *American Dietetic Association* (ADA) “alimentos funcionais” são alimentos integrais, fortificados, enriquecidos ou aprimorados, que tenham um efeito potencialmente benéfico na saúde quando consumidos em níveis efetivos, como parte de uma dieta variada e de forma regular (Hasler, Brown & ADA, 2009). Portanto, muitos “alimentos funcionais” contêm nutrientes essenciais adicionados que promovem saúde, podendo também conter ingredientes não nutritivos, tais como bactérias probióticas (Katan, 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS) juntamente com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) definem probióticos como “micro-organismos vivos que quando consumidos em quantidades adequadas, conferem um efeito na saúde do hospedeiro” (OMS & FAO, 2006). Evidências crescentes têm mostrado que o consumo de probióticos pode potencializar o sistema imune do hospedeiro, bem como agir na prevenção/tratamento de certas doenças, principalmente as gastrointestinais e/ou incômodos em humanos (Messora, Silva & Invernici, 2017; Markowiak & Slizewska, 2017).

A etiologia da periodontite considera a existência de três fatores necessários: hospedeiro susceptível, presença de periodontopatógenos e redução ou ausência de bactérias benéficas (Bartold & Van Dyke, 2017). Nos últimos anos, tem havido uma valorização crescente da microbiota bucal benéfica e seu uso na prevenção e no tratamento da inflamação periodontal relacionada ao biofilme. O aumento do número de bactérias benéficas por meio de probióticos pode ser de interesse no tratamento de doenças periodontais. Os probióticos podem não apenas suprimir a emergência de patógenos endógenos e impedir a superinfecção com patógenos exógenos, mas também proteger o hospedeiro por meio da promoção de resposta imunoinflamatória benéfica (Messora, Silva & Invernici, 2017). De fato, com base em estudos realizados em animais e humanos, o uso de probióticos tem emergido como monoterapia ou terapia adjunta potencial na periodontite, apesar dos mecanismos envolvidos permanecerem pobremente definidos (Teughels et al., 2013; Foreaux et al., 2014; Messora et al., 2016; Gatej et al., 2018; Silva et al., 2019). Esta abordagem pode oferecer uma opção de

prevenção ou tratamento fácil de usar, de baixo risco e custo para obter saúde periodontal (Gatej et al., 2017).

O objetivo de uma terapia probiótica é a substituição de agentes patogênicos nocivos residentes por outras bactérias não patogênicas. A quantidade ideal de micro-organismos probióticos a ser administrada não é facilmente determinada, e depende, especificamente, da cepa e do tipo de efeito benéfico almejado (Messora, Silva & Invernici, 2017). Os *Lactobacillus* (*Lb.*) são espécies de bactérias ácido-láticas, Gram-positivas, encontradas em diversos meios (alimentos e vegetais) e em humanos, tais como cavidade bucal, intestino e vagina (Prescott, Harley & Klein, 2002). Espécies de *Lb.* presentes na flora residente de humanos são geralmente não patogênicas e algumas delas têm sido utilizadas como probióticos, principalmente por seu papel importante na manutenção da saúde por estimular a imunidade natural e contribuir para o equilíbrio da microflora em vários habitats. Estudos clínicos têm demonstrado que *Lb.* podem ser usados como probióticos para reduzir a inflamação gengival e os níveis de micro-organismos patogênicos na saliva e placa subgengival, bem como terapia adjunta à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite (Ínce et al., 2015; Ikram et al., 2019; Yuki et al., 2019; Invernici et al., 2017; Matsuoka, Sugano & Ito, 2006; Krasse et al., 2006; Van Essche et al., 2013; Teanpaisan, Piwat & Dahlén, 2011). *Lb. casei*-01 é uma cepa probiótica associada a muitos efeitos benéficos à saúde, tais como atividade antioxidante (Kim et al., 2005), imunestimulação (Galdeano & Perdígón, 2006), diminuição nos níveis de colesterol (Liong & Shah, 2005), atividade anticarcinogênica (Liu, Chu & Chou, 2011) e redução na inflamação em modelo de colite de ratos (Ivanovska et al., 2017). Esta cepa possui capacidade de sobreviver a condições gastrointestinais (Araújo, Melo & Lima, 2015) e pode manter a viabilidade acima do nível terapêutico mínimo em matrizes alimentares durante o armazenamento, tais como iogurtes (Pimentel, Garcia & Prudencio, 2012), sorvetes (Baltazhar et al., 2018) e queijo Prato (Silva et al., 2018a; Silva et al., 2018b). O benefício da cepa probiótica é único e depende da sua interação com a matriz alimentar e dos constituintes intrínsecos dessa matriz (Forssten, Sindelar & Ouwehand, 2011). Algumas evidências sugerem que as matrizes alimentares atuam com um papel importante nos efeitos benéficos dos probióticos no hospedeiro, levando a recomendações para que o foco das pesquisas seja a compreensão de como a matriz alimentar e o conteúdo dietético interagem com as cepas probióticas mais

eficientes (Isolauro, 2007). Dentre os alimentos processados, os laticínios são a categoria de matrizes alimentares com mais produtos probióticos no mercado (Pimentel, Oliveira & Cruz, 2017). O queijo possui pH mais alto quando comparado aos iogurtes e leites fermentados, resultando em uma matriz mais estável para a sobrevivência dos micro-organismos probióticos (Cruz, Buriti & Souza, 2009). Além disso, os queijos têm conteúdo relativamente alto de gordura, que provê proteção para bactérias probióticas durante a passagem das mesmas pelo trato gastrointestinal, e apresentam capacidade tampão mais alta, consistência mais sólida, disponibilidade mais alta de nutrientes e conteúdo mais baixo de oxigênio que os iogurtes (Granato, Nazzaro & Pimentel, 2018). De fato, a ingestão de queijo suplementado como veículo para bactérias probióticas tem sido associada com vários benefícios à saúde humana, tais como melhoria no sistema imune (Ibrahim et al., 2010), na saúde bucal e intestinal de idosos (Lahtinen et al., 2012), bem como reforço na imunidade do intestino (Medici, Vinderola & Perdígón, 2004) e da saúde gastrointestinal (Modzelewska-Kapitula, Kobukowski & Klebukowska, 2010).

Vaghef-Mehrabany et al. realizaram um estudo clínico em pacientes com artrite reumatoide (AR) e concluíram que o consumo de cápsulas contendo *Lb. casei*-01 poderia melhorar a atividade e inflamação dessa doença (Vaghef-Mehrabany et al., 2014). As doenças reumatológicas, tais como a AR, e a periodontite são doenças imunoinflamatórias que apresentam vários mecanismos patogênicos similares (Araújo, Melo & Lima, 2015; Braga, Miranda & Miceli, 2007). Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar, através de análises microtomográfica, histológica, histométrica e imunoistoquímica os efeitos da ingestão de alimento funcional, queijo Prato contendo *Lb. casei*-01, no desenvolvimento da periodontite experimental (PE) em ratos.

*Materiais
e Métodos*

Apreciação Experimental

O estudo foi conduzido após revisão e aprovação (protocolo 208.1.561.58.3) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Anexo B) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP), seguindo os princípios da ARRIVE *Guidelines* (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) (Killkenny, Browne & Cuthill, 2010).

Cálculo do Tamanho da Amostra

O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa *Graphpad Statemate 2.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados que foram obtidos neste estudo foi calculado considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão entre os grupos DP e C do estudo de Oliveira et al. (2016), reconhecendo a diferença significativa de 5% (δ) entre os grupos, intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), desvio-padrão (σ) de 23%, mudanças na média do volume ósseo (BV) como variável primária [$Z\alpha$ (1.96) + $Z\beta$ (0.84)] = 7.84. O cálculo da amostra por grupo foi baseado na fórmula: $n \geq \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$. O número necessário foi de 8 animais por grupo experimental. De acordo com estudos prévios de nosso grupo, 30% dos animais podem apresentar ausência de perda óssea alveolar com este modelo de PE ou perda de ligaduras no pós-operatório. Portanto, foram utilizados 11 animais por grupo experimental.

Modelo Experimental

Foram utilizados 44 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*), pesando entre 250 e 300 g (Biotério Central da FORP/USP). Os animais foram acomodados em caixas metabólicas individuais de polipropileno autoclaváveis e submetidos a um período de 7 dias de aclimação com o ambiente e com a equipe de execução do projeto. O ambiente foi climatizado à temperatura de 22 ± 2 °C e com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Os animais foram identificados com código numérico e alocados de acordo com tabela numérica gerada por *software* (Minitab® 17; Minitab Inc., State College, PA, EUA) nos seguintes grupos (n = 11): C (controle) - animais sem indução de PE e alimentados com ração

convencional (RC) + queijo convencional (CONV); PROB - animais sem indução de PE e alimentados com RC + queijo probiótico (PROB); PE - animais com indução de PE e alimentados com RC + queijo CONV; e PE-PROB - animais com indução da PE e alimentados com RC + queijo PROB.

Processamento do Queijo Prato

Dois tipos de queijos foram fabricados: 1) queijo CONV, contendo as bactérias lácticas *Lactococcus (Lc.) lactis* ssp. *lactis* e *Lc. lactis* ssp. *cremoris* R-704 (Chr. Hansen, Valinhos, SP, Brasil) e 2) queijo PROB, contendo as mesmas bactérias lácticas do queijo CONV e com adição das bactérias probióticas *Lb. casei*-01 (Chr. Hansen, Valinhos, SP, Brasil). O queijo Prato foi produzido pelo método de fabricação tradicional como descrito por Vasconcelos et al. (2019). A fabricação foi conduzida no Núcleo Avançado em Tecnologia de Alimentos, usando 120 L de leite pasteurizado integral (65 °C/30 min). O leite foi resfriado a 32 - 34 °C, as culturas de bactérias lácticas/probióticas congeladas foram adicionadas diretamente ao leite [1% v/v, aproximadamente 7 - 8 log Unidade Formadora de Colônia (CFU)/g] e encubadas por 40 min. Em seguida, foram adicionados cloreto de cálcio (80 mL/120 L de leite), corante de urucum (36 mL/120 L de leite) e coagulante (Ha La 1175, Chr. Hansen, Valinhos, SP, Brasil) para coagular o leite dentro de 35 a 50 min. A coalhada foi então cortada em cubos de 1 cm e misturada lenta e continuamente por 15 min, seguida pela remoção de parte do soro do leite (30 %) e aquecimento adicional a 42 °C pela adição progressiva de água quente (25 L a 80 °C) para aumentar a temperatura em 1 °C a cada 3 min. Essa temperatura foi mantida por 40 min. Em seguida, o soro do leite foi drenado e a coalhada salgada (18 g NaCl/kg de coalhada) foi depositada em moldes retangulares de plástico e prensada (0,1 MPa por 15 min; 0,24 MPa por 30 min; e 0,31 MPa por 90 min). Os queijos foram colocados em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) por 5 h, secos a 12 °C por 72 h, embalados a vácuo dentro de sacos plásticos termo-retráteis e armazenados a 10 °C por 25 dias.

Contagem de Bactérias Probióticas e Ácido-Lácticas

Foi utilizado o M-17 Agar (Oxoid Brasil LTDA, São Paulo, SP, BRA) para a enumeração de *Lc. lactis*, incubados a 37 °C por 72 h, sob condições aeróbicas, enquanto que

MRS Agar (Oxoid Brasil LTDA, São Paulo, SP, BRA) com vancomicina foi utilizado para a enumeração do *Lb. casei*-01, incubados a 37 °C por 72 h, sob condições anaeróbicas (Silva et al., 2018a; Silva et al., 2018b; Vasconcelos et al., 2019).

Composição Bruta e Minerais (Cálcio e Sódio) dos Queijos Prato Convencional e Probiótico

A composição do queijo (umidade, proteína e gordura; g / 100 g) e o conteúdo mineral (cálcio e sódio) foram determinados utilizando métodos tradicionais como descrito por Vasconcelos et al. (2019). A umidade foi determinada pela secagem de 5 g de amostra a 100 – 105 °C por 24 h. A proteína total foi analisada utilizando o método de Kjeldahl e a conversão da porcentagem de nitrogênio para a porcentagem de proteína sendo os valores obtidos multiplicados por um fator de 6,38. O conteúdo de gordura foi analisado utilizando o método de Gerber. Os níveis de cálcio e sódio foram determinados por espectrometria de absorção atômica na chama de ar-acetileno usando o *iCE 3000 Series Atomic Absorption Spectrometer* (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, HERTS, GBR).

Terapia Probiótica

No dia 0 do experimento, 10 g de queijo Prato, acondicionado em um recipiente padronizado, foram administrados para cada animal uma vez ao dia (às 8,00 h), durante todo o período experimental (42 dias) (Figura 1). Para os animais dos grupos C e PE, foi administrado queijo CONV. Para os animais dos grupos PROB e PE-PROB foi administrado queijo PROB.

Pesagem dos Animais e do Queijo Remanescente

Durante todo o experimento, os animais foram pesados, todos os dias, anteriormente à administração dos queijos. Além disso, a quantidade de queijo remanescente, ou seja, não consumido, foi pesada diariamente para avaliar a quantidade total de queijo ingerida por cada animal ao final do experimento.

Indução da Periodontite Experimental

No dia 28 do experimento, os animais dos grupos PE e PE-PROB foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xilazina (10 mg/kg de peso) (Rompum[®], Bayer Animal Health, São Paulo, SP, BRA) e cloridrato de quetamina (80 mg/kg de peso) (Dopalen[®], Agribands Purina do Brasil Ltda., Paulínia, SP, BRA) para colocação das ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo de cada animal, como descrito por Messora et al. (2013).

Eutanásia e Obtenção das Amostras

Os animais foram submetidos à eutanásia com dose letal de tiopental sódico (150 mg/kg de peso) (Thiopentax[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, BRA) no dia 42 do experimento (Figura 1). As hemi-mandíbulas direita e esquerda foram excisadas para o processamento dos primeiros molares e tecidos circunjacentes. Além disso, amostras de tecido de distintas partes do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foram coletadas. Todas as amostras foram fixadas em formaldeído 4% durante 24 horas. O primeiro molar inferior direito foi utilizado para a análise por microtomografia computadorizada (micro-CT) e o primeiro molar inferior esquerdo para as análises histológica, histométrica e imunoistoquímica.

Análise por Micro-CT

Os espécimes foram escaneados por um sistema de micro-CT de feixe cônico (Skyscan 1172, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA). O gerador de raio x foi operado com potencial de aceleração de 60 kV, corrente de 165 μ A e tempo de exposição de 650 ms por projeção. As imagens foram produzidas com tamanho de voxel de 6 x 6 x 6 e analisadas por examinadores previamente treinados e que desconheciam os grupos experimentais. Medidas lineares do nível ósseo alveolar foram realizadas em cinco sítios distintos (vestibular, lingual, mesial, distal e região de bifurcação) como descrito por Messora et al. (2016) (DataViewer[®] versão 1.4.3, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA). As cinco medidas lineares obtidas de cada animal foram somadas para expressar o valor da perda óssea alveolar (ABL). Medidas volumétricas foram realizadas como descrito por Oliveira et al. (2016) (CTan[®] versão 1.10.11.0, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA). Os seguintes

parâmetros foram analisados: 1) Volume Ósseo (BV): percentual do volume de interesse (VOI) preenchido com tecido ósseo; 2) Número Trabecular (Tb.N): número (mm^{-1}) de trabéculas ósseas presentes no VOI; 3) Espessura Trabecular (Tb.Th): espessura (mm) das trabéculas ósseas presentes no VOI. Reconstruções renderizadas das secções microtomográficas foram obtidas de todos os grupos utilizando o *software* CTVox® (versão 3.1.0, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA).

Análises Histológica e Histométrica dos Tecidos Periodontais

Após processamento laboratorial de rotina (Messora et al., 2013), os espécimes foram incluídos em parafina. Cortes histológicos seriados (4 μm de espessura) foram obtidos na direção méso-distal e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Dois cortes histológicos, representando a porção vestibulo-lingual mais central da área de furca do molar de cada espécime, foram selecionados para as análises histológica e histométrica. As análises foram realizadas por examinadores previamente treinados e que desconheciam os grupos experimentais. Para a análise histológica, foram avaliados os tecidos periodontais na região de bifurcação, considerando-se os seguintes parâmetros histológicos: intensidade da resposta inflamatória local, extensão do processo inflamatório, padrão de estruturação do tecido conjuntivo e ósseo. A análise histométrica foi realizada seguindo o estudo de Gusman et al. (2019) utilizando *software* de análise de imagem (ImageJ, Rasband, WS, EUA). Resumidamente, a área total da furca (TFA) foi delineada em mm^2 e considerada como 100% da área analisada. A área total de osso foi delineada dentro dos limites da TFA e expressa como porcentagem, ou seja, a porcentagem de osso na furca (PBF).

Análise Imunoistoquímica dos Tecidos Periodontais

Cinco cortes histológicos de cada espécime foram submetidos ao método da imunoperoxidase indireta (Furlaneto et al., 2014), utilizando os seguintes anticorpos primários: anti-TNF- α do rato gerado em cabra (1:200; SC1350, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-IL-1 β do rato gerado em coelho (1:100; SC7884, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-IL-10 do rato gerado em cabra (1:100; SC1783, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-TGF- β 1 do rato gerado em coelho (1:200; SC146, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-TRAP do rato

gerado em cabra (1:100; SC30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Foram realizadas análises quantitativa de células TRAP-positivas e semi-quantitativas para as imunomarcações de TNF- α , IL-1 β , IL-10 e TGF- β 1, seguindo o estudo de Messora et al (2016). As células TRAP-positivas foram quantificadas em uma área de 1000 μm^2 , no centro do septo interradicular (aumento de 400 x). Os padrões de imunomarcação foram determinados dentro dos limites da TFA (aumento de 400 x), de acordo com escores de 0 a 3 (desde ausência total até alto padrão de imunomarcação).

Análise Histológica e Histométrica dos Tecidos Intestinais

Após processamento laboratorial de rotina, foram obtidos cortes seriados (6 μm de espessura) seguindo os critérios propostos por Messora et al. (2013). Dois cortes histológicos foram selecionados para as análises histológica e histométrica e avaliados por examinadores calibrados, que desconheciam os grupos experimentais. Os tecidos intestinais foram analisados de acordo com os seguintes parâmetros: grau de inflamação, padrão de celularidade e estruturação tecidual. As seguintes mensurações foram realizadas usando o *software* ImageJ (Rasband, WS, EUA): 1) Altura de Vilosidades (VH) - distância vertical do topo da vilosidade à junção vilosidade-cripta em 10 vilosidades por corte; 2) Profundidade de Cripta (CD) - distância vertical da junção cripta-vilosidade ao limite mais inferior da cripta em 10 criptas por corte.

Análise Estatística

Alterações na média de BV foram definidas como a variável resultante primária do estudo. Os outros parâmetros analisados foram considerados variáveis resultantes secundárias. A normalidade e homogeneidade dos dados foi verificada. O nível de significância considerado foi de 5%. Diferenças significativas entre todos os grupos para BV, Tb.N, Tb.Sp, ABL, PBF, TRAP, VH e CD foram avaliados por análise de variância (One-way ANOVA) seguido de teste *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas entre todos os grupos para o peso dos animais e para a quantidade de queijo consumido foram avaliados por análise de variância (Two-way ANOVA) seguido de teste *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas entre todos os grupos para os padrões de imunomarcação para TNF- α , IL-1 β , IL-10 e TGF- β 1 foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc*

Student-Newman-Keuls. Os resultados da contagem de bactérias probióticas e ácido-lácticas, da análise da composição e conteúdo mineral dos queijos CONV e PROB foram avaliados por ANOVA, seguido de teste *post hoc* Bonferroni.



Resultados

Análise Microbiológica, Composição, Conteúdo de Cálcio e Sódio do Queijo Prato

A contagem da cepa probiótica nas amostras de queijo Prato foi maior que 8 log de UFC / g. A adição da cultura probiótica *Lb. casei*-01 não influenciou a contagem da cultura de bactérias iniciadoras, com contagens similares de *Lc. lactis* nos queijos convencional e probiótico (8,87 x 9,01 log UFC / g, respectivamente; $p > 0,05$; Tabela 1). Portanto, o queijo Prato mostrou-se uma matriz adequada para carregar bactérias probióticas, uma vez que a contagem probiótica está de acordo com as recomendações do *Expert Consensus of the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (Hill et al., 2014) para proporcionar benefícios à saúde dos consumidores. Os queijos CONV e PROB apresentaram composição similar: os níveis de umidade, gordura e proteína variaram entre 50,2 a 51,6 %; 38,3 a 39,2 %; 26,3 a 26,8 % peso / peso ($p > 0,05$), respectivamente, dentro das variações regulatórias permitidas (Brasil, 1997). Além disso, os níveis de cálcio e sódio variaram entre 942,40 a 965,48 e 692,4 a 698,4 mg / 100 g de queijo, respectivamente ($p > 0,05$).

Tabela 1. Médias e desvios-padrão ($\pm$) da contagem de *Lc. lactis* e *Lb. casei*-01 dos queijos CONV e PROB, expressos em log UFC / g, com comparações intergrupos

Cepa bacteriana	Queijo convencional	Queijo probiótico
<i>Lactococcus lactis</i>	8,87 ^a $\pm$ 0,4	9,01 ^a $\pm$ 0,3
<i>Lactobacillus casei</i> -01	-	9,33 $\pm$ 0,1

^a Letras iguais significam não haver diferença estatística entre os queijos ($p > 0,05$)

Pesagem dos Animais e do Queijo Remanescente

Médias e desvios-padrão dos pesos de todos os animais de cada grupo (C, PROB, PE e PE-PROB) nos tempos 0, 28 e 42 dias, com comparações intragrupos, estão representadas na Figura 2A. Não houve diferenças intergrupos significativas nos três tempos experimentais. Médias e desvios-padrão do consumo total de queijo dos animais de cada grupo estão representados na Figura 2B. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

Análise por Micro-CT

Médias e desvios-padrão dos valores de BO, Tb.N, Tb.Th e ABL obtidos na análise microtomográfica, com comparações intergrupos, e as imagens representativas de reconstruções tridimensionais renderizadas estão apresentados na Figura 3.

Análise Histológica e Histométrica dos Tecidos Periodontais

Imagens histológicas dos tecidos periodontais de todos os grupos experimentais, bem como as médias e $\pm$ da PBF, com comparações intergrupos estão apresentados na Figura 4.

Tabela 3. Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de todos os grupos experimentais.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA				
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES			
	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	C	PROB	PE	PE-PROB
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL				
1) ausência de inflamação	100%	100%	-	-
2) inflamação discreta (até 1/3 das células são inflamatórias)	-	-	100%	100%
3) inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	-
4) inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	-
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO				
1) ausência de inflamação	100%	100%	-	-
2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	-	-	83%	100%
3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	-	-	17%	-
4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca	-	-	-	-

PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA

1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	100%	100%	-	-
2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	66%
3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	100%	34%
4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	-	-	-	-

PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA

1) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos	100%	100%	-	-
2) trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos	-	-	50%	67%
3) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	-	-	50%	33%
4) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos	-	-	-	-

Análise Imunoistoquímica dos Tecidos Periodontais

Imagens histológicas mostrando imunomarcações para TRAP na área de furca de todos os grupos experimentais, bem como as médias e desvios-padrão do número de células TRAP-positivas, com comparações intergrupos estão apresentados na Figura 5.

Imagens histológicas mostrando padrões de imunomarcações na área de furca de todos os grupos experimentais, bem como medianas e intervalos interquartis, com comparações intergrupos, para IL-10 e TGF β 1, TNF- α e IL-1 β , estão apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Análise Histológica e Histométrica dos Tecidos Intestinais

Médias e desvios-padrão dos valores e VH e CD do duodeno, jejuno e íleo obtidos na análise histométrica, com comparações intergrupos, e imagem histológica representativa do intestino delgado ao nível do duodeno do grupo PE-PROB, estão apresentados na Figura 8.

O aspecto histológico da mucosa intestinal ao nível do duodeno, jejuno e do íleo mostraram-se condizentes com quadro de normalidade em todos os grupos experimentais, os quais não apresentaram nenhuma diferença estatística significativa quando comparados entre si.



Discussão

Estudos realizados pela mesma equipe e que utilizaram exatamente a mesma metodologia do presente trabalho demonstraram, na análise de micro-CT, que animais controle (sem indução de PE e alimentados com RC) apresentaram média de BV de aproximadamente 76%. Já os animais com indução de PE e alimentados com RC apresentaram média de BV de aproximadamente 35% (Silva et al., 2019; Oliveira et al., 2016; Messoria et al., 2016; Ricoldi et al., 2017). O presente estudo avaliou o desenvolvimento de PE em animais alimentados com RC e queijo CONV ou PROB. A análise de micro-CT mostrou que todos os grupos experimentais apresentaram BV similares entre si e, também, similares aos controles históricos (Silva et al., 2019; Oliveira et al., 2016; Messoria et al., 2016; Ricoldi et al., 2017). No entanto, diferenças estatisticamente significativas foram observadas em outros parâmetros volumétricos da análise de micro-CT. Os grupos com PE (PE e PE-PROB) apresentaram Tb.N significativamente maior que os grupos sem PE (C e PROB). Contudo, o inverso ocorreu na análise de Tb.Th, onde os grupos com PE apresentaram valores significativamente menores que os grupos sem PE. Estes resultados demonstram que apesar do maior número de trabéculas ósseas presentes nos grupos PE e PE-PROB, essas eram significativamente mais finas quando comparadas às dos grupos C e PROB. Esses achados são compatíveis com os dados da análise imunoistoquímica, que mostrou que os grupos PE e PE-PROB apresentaram expressões das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α significativamente maiores que os grupos C e PROB. Expressões aumentadas dessas citocinas desencadeiam uma série de mecanismos biológicos que resultarão em potencialização da atividade do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) (Cenci et al., 2000; Lam et al., 2000), com consequente aumento da osteoclastogênese e do recrutamento de osteoclastos, resultando em aumento da expressão de TRAP. De fato, os grupos PE e PE-PROB apresentaram números de células TRAP-positivas significativamente maiores que os grupos C e PROB, indicando maior atividade osteoclástica nos grupos com PE. Os achados da análise histológica corroboram esses resultados, visto que os grupos PE e PE-PROB apresentaram trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos (50% e 33% dos espécimes, respectivamente), enquanto que 100% dos espécimes dos grupos C e PROB apresentaram trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos.

Uma possível hipótese para explicar os resultados similares de BV entre os grupos com e sem PE é a presença de bactérias ácido-láticas *Lc. lactis ssp lactis* e *Lc. lactis ssp cremoris* R-704 no queijo Prato consumido pelos animais de todos os grupos. O ácido láctico pode ajudar na inibição do crescimento bacteriano ou resultar na interferência das atividades de patógenos periodontais por diminuir o pH bucal (Haukioja, 2010). O *Lc. lactis* produz várias bacteriocinas, incluindo diacteina, lactococcina e nisina (Karpinski & Szkaradkiewicz, 2013; Kimoto-Nira et al., 2014; van Hylckama Vlieg et al., 2006), que exibem efeitos bactericidas ou bacteriostáticos em patógenos Gram-positivos e Gram-negativos no intestino e em produtos laticínios (Ali, Lacroix & Thuault, et al., 1995; Arques, Rodriguez & Langa, et al., 2015). O *Lc. lactis* antagoniza bactérias patogênicas no intestino do hospedeiro através de metabólitos antimicrobianos, tais como peróxido de hidrogênio, e ácidos acetaldeído e etanol orgânico (Enan et al., 2013/Shin et al., 2018). Estudos têm demonstrado efeitos positivos no tratamento e prevenção de doenças inflamatórias intestinais em camundongos, com a administração de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, nas mesmas concentrações utilizadas neste estudo (Liu et al., 2019; Luerce et al., 2014). Um estudo pré-clínico realizado pela mesma equipe do presente estudo, utilizando a mesma metodologia, foi o primeiro a demonstrar que a PE afeta a estrutura intestinal. Neste estudo, animais com PE e alimentados somente com RC, apresentaram defeitos das vilosidades, estratificação epitelial, degeneração da lâmina basal e infiltração com neutrófilos no intestino delgado. Os grupos sem PE apresentaram estrutura intestinal normal. Portanto, a PE parece encurtar e danificar pronunciadamente as vilosidades do jejuno de ratos (Messora et al., 2013). Mudanças na morfologia intestinal, tais como vilosidades mais curtas, têm sido associadas com a presença de toxinas (Yason, Summers & Schat, 1987) e contagens aumentadas de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal (Cook & Bird, 1973). Estudos prévios relataram um aumento da prevalência da doença periodontal em pacientes com doença inflamatória intestinal. (Habashneh et al., 2012; Koutsochristou et al., 2015; Vavricka et al., 2013; Van Dyke et al., 1986). Papageorgiou et al. (2017) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise e concluíram que a doença inflamatória intestinal estava associada com risco significativamente mais alto de periodontite e pior saúde bucal comparado a pacientes saudáveis. Tem sido demonstrado que probióticos podem melhorar a função da barreira da mucosa intestinal do hospedeiro levando à reatividade imunológica diminuída, deslocando micro-organismos deletérios da

superfície da mucosa e modulando o sistema imune da mucosa (Vanderpool, Yan & Polk, 2008; Veerappan, Betteridge & Young, 2012). De fato, a suplementação probiótica parece proteger o intestino delgado dos danos induzidos pela PE em ratos (Messora et al., 2013; Ricoldi et al., 2017). No presente estudo, a análise histométrica dos tecidos intestinais não mostrou diferenças significativas entre os grupos experimentais para VH e CD e a análise histológica mostrou padrões de normalidade nesses tecidos ao nível do duodeno, jejuno e íleo de todos os grupos experimentais. Considerando que os animais dos grupos PE e PE-PROB não apresentaram alterações no intestino delgado, é provável que o *Lc. lactis* subsp. *Lactis* e o *Lc. lactis* ssp *cremoris* R-704, presentes em ambos os queijos (CONV e PROB), tenham atuado protegendo o intestino delgado dos danos provocados pela PE.

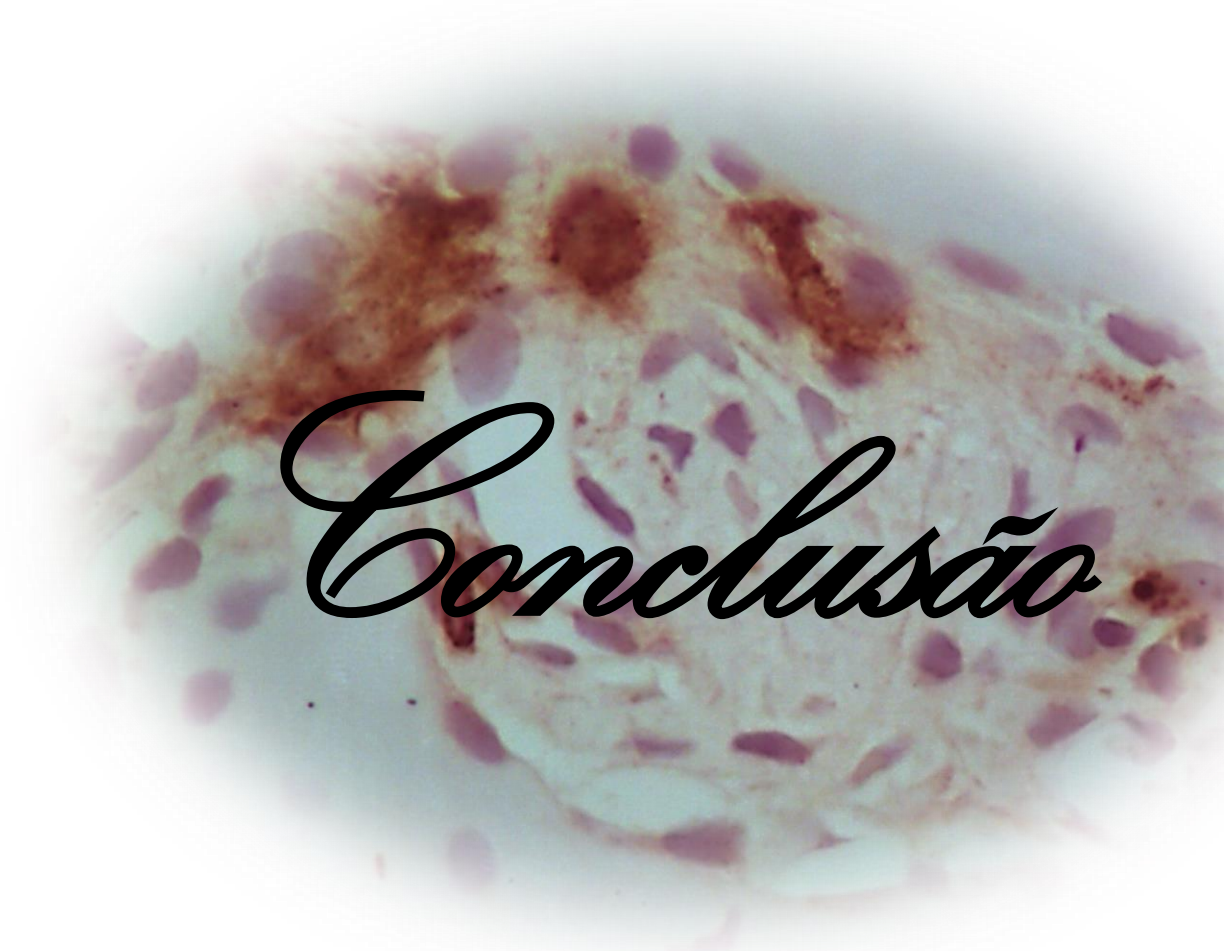
Os produtos laticínios têm sido propostos por ter efeito benéfico na doença periodontal devido a seus vários nutrientes e componentes alimentares (Park, 2009). Poucos estudos avaliaram a associação do consumo diário total de laticínios e a doença periodontal. Al-Zahrani et al. (2006) relataram que o aumento no consumo de produtos laticínios está inversamente associado com a prevalência da doença periodontal. Contudo, Shimazaki et al. (2008) constataram que o consumo diário de alimentos ácido-lácticos, mas não o consumo total de laticínios, tem efeitos benéficos na doença periodontal, corroborando os resultados do presente estudo.

A análise histométrica mostrou que o grupo PE apresentou PBF significativamente menor que os grupos C e PROB, e similar ao grupo PE-PROB. Uma das hipóteses para explicar essa discrepância de resultados com aqueles do BV é que a análise histométrica é bidimensional e foi realizada em dois cortes centrais na área de furca, diferentemente da análise de micro-CT, que é tridimensional e considera toda essa área. Na análise linear da micro-CT, constatou-se que os grupos PE e PE-PROB apresentaram ABL significativamente maior que os grupos C e PROB. Contudo, o grupo PE-PROB apresentou ABL significativamente menor que o grupo PE. Esses achados são corroborados pelas análises histológica e imunoistoquímica. O grupo PE-PROB apresentou melhor padrão de estruturação do tecido conjuntivo e do tecido ósseo, bem como menor extensão do processo inflamatório na região de furca quando comparado ao grupo PE. Esses achados são sustentados pela análise imunoistoquímica, que mostrou que o grupo PE-PROB apresentou

níveis de IL-10 e TGF- β 1 significativamente maiores que o grupo PE. Tem sido demonstrado que a administração de TGF- β 1 em feridas estimula o acúmulo de tecido de granulação e a celularização do leito da ferida, acelerando a resposta de cicatrização da mesma em modelos experimentais (Sporn et al. 1983; Roberts et al. 1986; Mustoe et al. 1987). Além disso, TGF- β 1 é um potente indutor da expressão das proteínas principais da matriz extracelular tais como fibronectina e colágenos (Ignatz and Massagué 1986; Roberts et al. 1986), promovendo, então, a deposição de matriz extracelular nos sítios de cicatrização de feridas. Considerando que a análise de composição bruta e de minerais dos queijos Prato CONV e PROB, realizadas no presente estudo, mostrou que ambos continham níveis de umidade, gordura, proteína, cálcio e sódio similares, o único diferencial entre esses queijos foi a presença das bactérias probióticas *Lb. casei*-01 no queijo PROB, confirmada pela análise microbiológica.

Os resultados favoráveis observados no grupo PE-PROB são corroborados por estudos que demonstraram que bactérias probióticas ácido-láticas, tais como *Lb.* e *Bifidobacterium*, podem ter efeito protetor na doença periodontal por inibir o crescimento excessivo de patógenos periodontais e estimular o sistema imune (Haukioja, 2010). Consistente com esses resultados, o estudo clínico de Imran et al. (2015) demonstrou que a administração oral de leite fermentado contendo *Lb. casei* reduziu a soma numérica de três bactérias periodontopatogênicas [*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)] e poderia contribuir para os efeitos benéficos nas condições periodontais. A inibição de patógenos periodontais por *Lb.* também foi demonstrada pelos estudos in vitro de van Essche et al. (2013) e Teanpaisan, Piwat & Dhalén (2011). Contudo, resultados contraditórios foram observados no estudo in vitro por Testa, Ruiz de Valladares & Benito de Cardenas (2013), que avaliaram as possíveis interações antagonísticas entre *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) e *P. intermedia* isolados de bolsas periodontais e vários *Lb.*, inclusive *Lb. casei*, isolados da saliva. Os autores demonstraram que o sobrenadante de *P. intermedia* não mostrou efeito inibitório no crescimento de *Lb.*, exceto pelo *Lb. casei*. O sobrenadante do *F. nucleatum* inibiu o crescimento de *Lb. casei*. Os resultados de estudos in vitro devem ser interpretados com cautela, devido às limitações intrínsecas dos mesmos. Deve-se ressaltar que, no presente estudo, as bactérias *Lb. casei*-01 foram adicionadas ao queijo, uma matriz alimentar com pH

mais alto que iogurtes e leites fermentados, o que a torna mais estável para a sobrevivência de micro-organismos probióticos (Cruz, Buriti & Souza, 2009). De fato, a ingestão de queijo suplementado como veículo para bactérias probióticas tem sido associada a vários benefícios à saúde humana (Ibrahim et al., 2010; Lahtinen et al., 2012; Medici, Vinderola & Perdígón, 2004; Modzelewska-Kapitula, Kobukowski & Klebukowska, 2010).



Conclusão

O consumo de queijo Prato, tanto CONV como PROB, teve efeito protetor nos tecidos periodontais durante o desenvolvimento da PE em ratos. Contudo, o queijo PROB parece ter estimulado principalmente a expressão de citocinas anti-inflamatórias, quando comparado ao queijo CONV, favorecendo o processo de reparo tecidual.



Referências Bibliográficas

Adegboye, A.R., Christensen, L.B., Holm-Pedersen, P., Avlund, K., Boucher, B.J. & Heitmann, B.L. (2012). Intake of dairy products in relation to periodontitis in older Danish adults. *Nutrients*, 4(9):1219–1229. doi: 10.3390/nu4091219.

Ali, D., Lacroix, C., Thuault, D., Bourgeois, C. M., & Simard, R. E. (1995). Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* UL720. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(9):832–841.

Al-Zahrani, M.S. (2006). Increased intake of dairy products is related to lower periodontitis prevalence. *Journal of Periodontology*, 77(2):289–294. doi: 10.1902/jop.2006.050082.

Andrade, E. F., Orlando, D. R., Gomes, J. A. S., Foureaux, R. C., Costa, R. C., Varaschin, M. S., ... Pereira, L. J. (2017). Exercise attenuates alveolar bone loss and anxiety-like behavior in rats with periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 44:1153–1163. doi: 10.1111/jcpe.12794.

Araújo, V. M. A., Melo, I. M. & Lima, V. (2015). Relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis: review of the literature. *Mediators of Inflammation*, 2015:259074. doi: 10.1155/2015/259074.

Arques, J. L., Rodriguez, E., Langa, S., Landete, J. M., & Medina, M. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed Research International*, 2015:584183. doi: 10.1155/2015/584183.

Balthazar, C.F., Silva, H. L. A., Esmerino, E. A., Rocha, R. S., Moraes, J., Carmo, M. A. V., ... Cruz, A. G. (2018). The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food Chemistry*, 246:464-472. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.002.

Bartold, P.M. & Van Dyke, T.E. (2017). Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontology 2000*, 75(1):317-329. doi: 10.1111/prd.12169.

Braga, F. S. F., Miranda, L. A., Miceli, V. C. & Áreas A. (2007). Chronic arthritis and periodontitis. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 47(4):276-280.

Cenci, S., Weitzmann, M. N., Roggia, C., Namba, N., Novack, D., Woodring, J., Pacifici, R. (2000). Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *Journal of Clinical Investigation*, 106(10):1229–1237. doi: 10.1172/JCI11066.

Cook, R. H. & Bird, F. H. (1973). Duodenal villus area and epithelial cellular migration in conventional and germ-free chicks. *Poultry Science*, 52(6):2276-2280. doi: 10.3382/ps.0522276.

Cruz, A. G., Buriti, F. C. A., Souza, C. H. B. & Faria, J. A. F. (2009). Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Sciences & Technology*, 20(8):344-354. doi: 10.1016/j.tifs.2009.05.001.

de Molon, R. S., de Avila, E. D., Boas Nogueira, A. V., Chaves de Souza, J. A., Avila-Campos, M. J., de Andrade, C. R., & Cirelli, J. A. (2014). Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *Journal of Periodontology*, 85:465–477. doi: 10.1902/jop.2013.130225.

Enan, G., Abdel-Shafi, S., Ouda, S. & Negm, S. (2013). Novel antibacterial activity of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* Z₁₁ isolated from zabady. *International Journal of Biomedical Science*, 9(3):174-180.

Forssten, S. D., Sindelar, C. W. & Ouwehand, A. C. (2011). Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, 17(6):410-413. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.04.014

Foureaux, R.C., Messoria, M. R., de Oliveira, L. F., Napimoga, M. H., Pereira, A. N., Ferreira, M. S., Pereira, L. J. (2014). Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. *Journal of Periodontology*, 85(7):975-983. doi: 10.1902/jop.2013.130356.

Furlaneto, F. A. C., Nunes, N. L., Oliveira Filho, I. L., Frota, N. P., Yamamoto, K. O., Lisboa, M. R., ... Messoria, M. R. (2014). Effects of locally administered tiludronic acid on experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 85(9):1291-1301. doi: 10.1902/jop.2014.130581

Galdeano, C. M. & Perdigón, G. (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical and Vaccine Immunology*: CVI, 13(2):219-226. doi: 10.1128/CVI.13.2.219-226.2006.

Gatej, S.M., Marino, V., Bright, R., Fitzsimmons, T. R., Gully, N., Zilm, P., ... Bartold, P. M. (2018). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(2):204-212. doi: 10.1111/jcpe.12838.

Granato, D., Nazzaro, F., Pimentel, T. C. & Esmerino, E. (2018). Probiotic food development: an updated review based on technological advancement. In: Geoffrey Smithers (Org.), *Reference Module in Food Science* (pp. 1-7). Amsterdam: Elsevier.

Gusman, D. J. R., Ervolino, E., Theodoro, L. H., Garcia, V. G., Nagata, M. J. H., Alves, B. E. S., ... de Almeida, J. M. (2019). Antineoplastic agents exacerbate periodontal inflammation and aggravate experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(4):457-469. doi: 10.1111/jcpe.13101.

Habashneh, R. A., Khader, Y. S., Alhumouz, M. K., Jadallah, K. & Ajlouni, Y. (2012). The association between inflammatory bowel disease and periodontitis among

Jordanians: a case-control study. *Journal of Periodontal Research*, 47(3):293-298. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01431.x.

Hasler, C.M. & Brown, A.C., American Dietetic Association. (2009). Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4):735-46. doi: 10.1016/j.jada.2009.02.023

Haukioja, A. (2010). Probiotics and oral health. *European Journal of Dentistry*, 4(3)348-355.

Ibrahim, F., Ruvio, S., Granlund, L., Salminen, S., Viitanen, M. & Ouwehand, A. C. (2010). Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(1):53-59. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00658.x.

Ignotz, R. A. & Massagué J. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 261(9):4337–4345.

Ikram, S., Hassan, N., Baig, S., Borges, K. J. J., Raffat, M. A., Akram, Z. (2019). Effect of local probiotic (*Lactobacillus reuteri*) vs systemic antibiotic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in chronic periodontitis. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 10(2):e12393. doi: 10.1111/jicd.12393.

Imran, F., Das, S., Padmanabhan, S., Rao, R., Suresh, A. & Bharath, D. (2015). Evaluation of the efficacy of a probiotic drink containing *Lactobacillus case* on the levels of periodontopathic bacteria in periodontitis: A clinic-microbiologic study. *Indian Journal of Dental Research*, 26(5):462-468. doi: 10.4103/0970-9290.172033.

İnce, G., Gursoy, H., İpçi, S. D., Cakar, G., Emekli-Alturfan, E., Yilmaz, S. (2015). Clinical and biochemical evaluation of *Lactobacillus reuteri* containing lozenges as an

adjunct to non-Surgical periodontal therapy in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 86(6):746-754. doi: 10.1902/jop.2015.14061.

Invernici, M. M., Salvador, S. L., Silva, P. H. F., Soares, M. S. M., Casarin, R., Palioto, D. B., ... Messori, M. R. (2018). Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(10):1198-1210. doi: 10.1111/jcpe.12995.

Isolauro, E. (2007). Probiotics in preterm infants: a controversial issue. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 45(3):S188-S189. doi: 10.1097/01.mpg.0000302970.67997.db.

Ivanovska, T. P., Mladenovska, K., Zhivikj, Z., Pavlova, M. J., Gjurovski, I., Ristoski, T. & Petrushevska-Tozi, L. (2017). Synbiotic loaded chitosan-Ca-alginate microparticles reduces inflammation in the TNBS model of rat colitis. *International Journal of Pharmaceutics*, 527(1-2):126-134. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.049.

Karpinski, T. M. & Szkaradkiewicz, A. K. (2013). Characteristic of bacteriocins and their application. *Polish Journal of Microbiology*, 62(3):223–235.

Katan, M.B. (2004). Health claims for functional foods. *British Medical Journal*, 328(7433):180-181. doi: 10.1136/bmj.328.7433.180

Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M. & Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 8(6):e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.

Kim, H. S., Chae, S. G., Jeong, S. G., Ham, J. S., Im, S. H., Ahn, C. N. & Lee J. M. (2005). Antioxidant activity of some yogurt starter cultures. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(2):255-258.

Kimoto-Nira, H., Nagakura, Y., Kodama, C., Shimizu, T., Okuta, M., Sasaki, K., ... Suzuki, Y. (2014). Effects of ingesting milk fermented by *Lactococcus lactis* H61 on skin health in young women: a randomized double-blind study. *Journal of Dairy Science*, 97(9):5898–5903. doi: 10.3168/jds.2014-7980.

Klausen, B. (1991). Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: A review article. *Journal of Periodontology*, 62:59–73. doi: 10.1902/jop.1991.62.1.59

Krasse, P., Carlsson, B., Dahl, C., Paulsson, A., Nilsson, A. & Sinkiewicz, G. (2006). Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swedish Dental Journal*, 30(2):55-60.

Lahtinen, S. J., Forssten, S., Aakko, J., Granlund, L., Rautonen, N., Salminen, S., Viitanen, M. & Ouwehand, A. C. (2012). Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM(®) modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age* (Dordrecht, Netherlands), 34(1):133-143. doi: 10.1007/s11357-011-9208-6.

Lam, J., Takeshita, S., Barker, J. E., Kanagawa, O., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L. (2000) TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *Journal of Clinical Investigation*, 106(12):1481–1488. doi: 10.1172/JCI11176.

Lee, K. & Kim J. (2019) Dairy food consumption is inversely associated with the prevalence of periodontal disease in Korean adults. *Nutrients*, 11(5):1035. doi: 10.3390/nu11051035.

Liong, M. T. & Shah, N. P. (2005). Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotic by using a response surface method. *Applied Environmental Microbiology*, 71(4):1745-1753. doi: 10.1128/AEM.71.4.1745-1753.2005.

Listgarten, M. A. (1975). Similarity of relationships in the gingiva of rats and man. *Journal of Periodontology*, 46:677–680.

Liu, C. T., Chu, F. J., Chou, C. C. & Yu, R. C. (2011). Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutation Research* 721(2):157- 162. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.01.005.

Luerce, T. D., Gomes-Santos, A. C., Rocha, C. S., Moreira, T. G., Cruz, D. N., Lemos, L., ... Miyoshi, A. (2014). Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. *Gut Pathogens*, 6:33. doi: 10.1186/1757-4749-6-33.

Markowiak, P. & Slizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9):1-30. doi: 10.3390/nu9091021.

Matsuoka, T., Sugano, N., Ito, K. & Koga, Y. (2006). Effect of oral *Lactobacillus salivarius* TS 2711 (LS1) administration on periodontal status and periodontopathic bacteria in subgingival plaque. *Journal of the Japanese Society of Periodontology*, 47(3):194-202. doi: 10.2329/perio.47.194.

Medici, M, Vinderola, C. G. & Perdígón, G. (2004). Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *International Dairy Journal*. 2004; 14(7):611-618. doi: 10.1016/j.idairyj.2003.10.011.

Messoria, M. R., Oliveira, L. F., Foureaux, R. C., Taba, M. Jr., Zangerônimo, M. G., Furlaneto, F. A. & Pereira, L. J. (2013). Probiotic therapy reduces periodontal tissue

destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontology*, 84(12):1818-1826. doi: 10.1902/jop.2013.120644.

Messora, M. R., Pereira, L. J., Foureaux, R. C., Oliveira, L. F., Sordi, C. G., Alves, A. J., ... Furlaneto, F. A. (2016). Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 66:108-119. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.02.014.

Messora, M. R., Pereira, L. J., Foureaux, R., Oliveira, L. F., Sordi, C. G., Alves, A. J., ... Furlaneto, F. A. (2016). Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 66:108-119. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.02.01

Messora, M., Silva, P., Invernici, M. & Furlaneto, F. (2017). Probióticos na terapia periodontal. In Romito, G.A., Holzhausen, M., Saraiva L., Pannuti, C. M., Villar, C. C. Estratégias terapêuticas atuais no manejo da doença periodontal e periimplantar. (pp. 5-29). Nova Odessa: Editora Napoleão.

Modzelewska-Kapitula, M., Kobukowski, J. A. N. & Klebukowska, L. (2010). The influence of feeding diets containing white cheese, produced prebiotics and the potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain, on the gastrointestinal microflora of rats. *Czech Journal of Food Science*, 28(2):139-145. doi: 10.17221/187/2008-cjfs.

Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M. B. & Deuel, T. F. (1987). Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science*, 237(4820):1333-1336. doi: 10.1126/science.2442813.

Oliveira, L. F., Salvador, S. L., Silva, P. H., Furlaneto, F. A., Figueiredo, L., Casarin, R., ... Messora, M. R. (2016). Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* probiotic in

experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*, 88(2):197-208. doi: 10.1902/jop.2016.160217.

Papageorgiou, S. N., Hagner, M., Nogueira, A. V. B., Franke, A., Jager, A. & Deschner, J. (2017). Inflammatory bowel disease and oral health: systematic review and a meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(4):382-393. doi: 10.1111/jcpe.12698.

Park, Y.W. (2009). *Bioactive components in milk and dairy products*. New York, United States: John Wiley & Sons.

Pimentel, T. C., Garcia, S. & Prudencio, S.H. (2012) Effect of long-chain inulin on the texture profile and survival of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in set yoghurts during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1):104-110. doi: 10.1111/j.1471-0307.2011.00739.x.

Pimentel, T.C., Oliveira, M. N. & Cruz, A. G. (2017) Premiunização e sensorialidade. In: Zacarchenco, P. B., Van Dender, A. G. F. & Rego, R. A. (Eds.), *Brasil Dairy Trends 2020 - Tendências do mercado de produtos lácteos* (pp. 212-241). Campinas: Ital.

Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (2002). *Microbiology*. Boston, MA: McGraw-Hill.

Ridoldi, M. S. T., Furlaneto, F. A. C., Oliveira, L. F. F., Teixeira, G. C., Pischiotini, J. P., Moreira, A. L., ... Messori, M. R. (2017). Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS one*, 12(6):e0179946. doi: 10.1371/journal.pone.0179946.

Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., ... Kehrl, J.H. (1986) . Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings*

of the National Academy of Science of the United States of America, 83(12): 4167–4171. doi: 10.1073/pnas.83.12.4167.

Shimazaki, Y., Shiota, T., Uchida, K., Yonemoto, K., Kiyohara, Y., Iida, ... Yamashita, Y. (2008). Intake of dairy products and periodontal disease: The Hisayama Study. *Journal of Periodontology*, 79(1):131–137. doi: 10.1902/jop.2008.070202.

Shin, H. S., Baek D. H. & Lee, S. H. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* on the bioactivity of periodontopathogens. (2018). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 64(2):55-61. doi: 10.2323/jgam.2017.06.003.

Silva, H. L. A., Balthazar, C. F., Esmerino, E. A., Neto, R. P. C., Rocha, R. S. & Moraes, J., ... Cruz, A. G. (2018)a. Partial substitution of NaCl by KCl and addition of flavor enhancers on probiotic Prato cheese: a study covering manufacturing, ripening and storage time. *Food Chemistry*, 248:192–200. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.064.

Silva, H. L. A., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Moraes, J., Esmerino, E. A., Silva, M. C., ... Cruz, A. G. (2018)b. Sodium reduction and flavor enhancers addition: is there an impact on the availability of minerals from probiotic Prato cheese? *Lebensmittel-Wissenschaft- Technologie Food Science and Technology*, 93:287- 292. doi: 10.1016/j.lwt.2018.03.053.

Silva, P. H. F., Oliveira, L. F. F., Cardoso, R. S., Ricoldi, M. S. T., Figueiredo, L. C., Salvador, S. L., ... Messoria, M. R. (2019). The impact of predatory bacteria on experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*, 90(9):1053-1063. doi: 10.1002/JPER.18-0485.

Sporn, M. B., Roberts, A. B., Shull, J. H., Smith, J. M., Ward, J. M. & Sodek, J. (1983). Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science*, 219(4590):1329–1331. doi: 10.1126/science.6572416.

Teanpaisan, R., Piwat, S. & Dahlén, G. (2011). Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4):452-459. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03132.x.

Teanpaisan, R., Piwat, S. & Dahlén, G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4):452-459. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03132.x.

Testa, M. M., Ruiz de Valladares, R. & Benito de Cardenas, I. L. (2003). Antagonistic interactions among *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* with oral lactobacilli. *Research in Microbiology*, 154(10):669-675. doi: 10.1016/j.resmic.2003.09.007.

Teughels, W., Durukan, A., Ozcelik, O., Pauwels, M., Quirynen, M., Haytac, M. C. (2013). Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(11):1025–1035. doi: 10.1111/jcpe.12155.

Vaghef-Mehrabany, E., Alipour, B., Homayouni-Rad, A., Sharif, S. K., Asghari-Jafarabadi, M. & Zawari, S. (2014). Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition*, 30(4):430-435. doi: 10.1016/j.nut.2013.09.00.

Van Dyke, T. E., Dowell Jr, V. R., Offenbacher, S., Snyder, W. & Hersh, T. (1986). Potential role of microorganisms isolated from periodontal lesions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*, 53(3):671-677.

van Essche, M., Loozen, G., Godts C., Boon, N., Pauwels, M., Quirynen, M. & Teughels, W. (2013). Bacterial antagonism against periodontopathogens. *Journal of Periodontology*, 84(6):801-811. doi: 10.1902/jop.2012.120261.

Van Essche, M., Loozen, G., Godts, C., Boon, N., Pauwels, M., Quirynen, M. & Teughels, W. (2013). Bacterial antagonism against periodontopathogens. *Journal of Periodontology*, 84(6):801-811. doi: 10.1902/jop.2012.120261.

van Hylckama Vlieg, J. E., Rademaker, J. L., Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W. J. & Siezen, R. J. (2006). Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2):183–190. doi: : 10.1016/j.copbio.2006.02.007.

Vanderpool, C., Yan, F. & Polk, D. B. (2008). Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(11):1585-1596. doi: 10.1002/ibd.20525.

Vasconcelos, F. M., Silva, H. L. A., Poso, S. M. V., Barroso, M. V., Lanzetti, M., Rocha, R. S., ... Valença, S. S. (2019). Probiotic Prato cheese attenuates cigarette smoke-induced injuries in mice. *Food Research International*, 123:697-703. doi: 10.1016/j.foodres.2019.06.001.

Vavricka, S. R., Manser, C. N., Hediger, S., Vogelin, M., Scharl, M., Biedermann, L., ... Frei, P. (2013). Periodontitis and gingivitis in inflammatory bowel disease: a case-control study. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(13):2768-2777. doi: 10.1097/01.MIB.0000438356.84263.3b.

Veerappan, G. R., Betteridge, J. & Young, P. E. (2012). Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports*, 14(4):324-333. doi: 10.1007/s11894-012-0265-5.

World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006). Probiotics in foods: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Italy: Rome.

Yamaguchi, P. (2006, Março 16). Japan's nutraceuticals today— Functional foods Japan 2006. Retirado de: <https://www.newhope.com/supply-news-amp-analysis/japan-s-nutraceuticals-today-functional-foods-japan-2006>.

Yason, C. V., Summers, B. A. & Schat, K. A. (1987). Pathogenesis of rotavirus infection in various age of groups of chickens and turkeys: pathology. *American Journal of Veterinary Research*, 48(6):927-938.

Yuki, O., Furutani, C., Mizota, Y., Wakita, A., Mimura, S., Kihara, T., ... Nikawa, H. (2019). Effect of bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* L8020 on periodontal disease in individuals with intellectual disability: a randomized clinical trial. *Journal of Applied Oral Science*, 27:e20182564. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0564.



Figuras

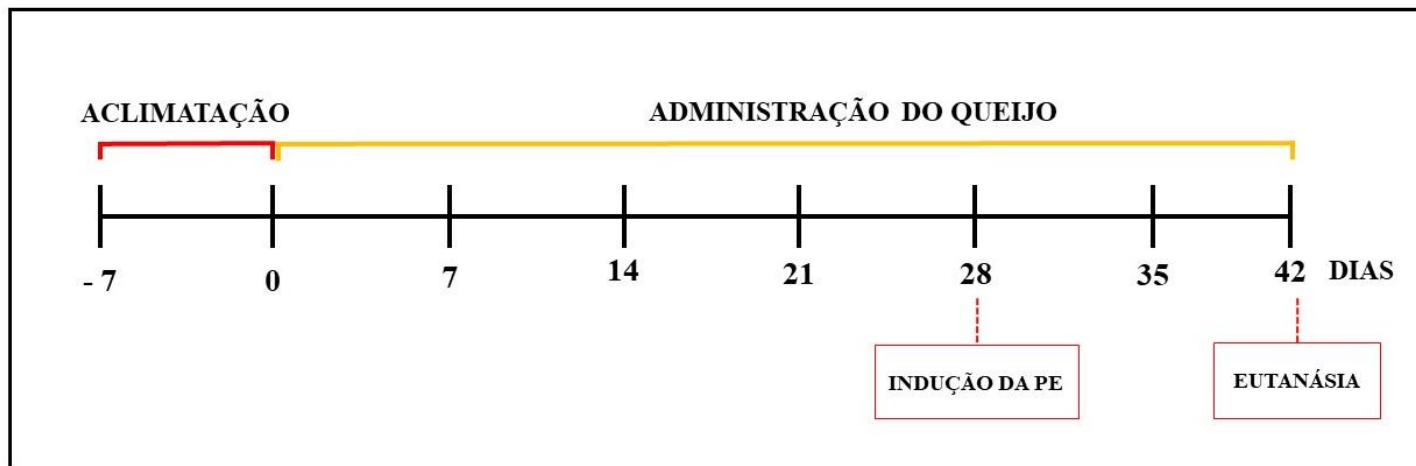


Figura 1. Delineamento experimental. Dia 0: início da administração do queijo para os animais de todos os grupos. Dia 28: indução da PE nos animais dos grupos PE e PE-PROB. Dia 42: eutanásia de todos os animais.

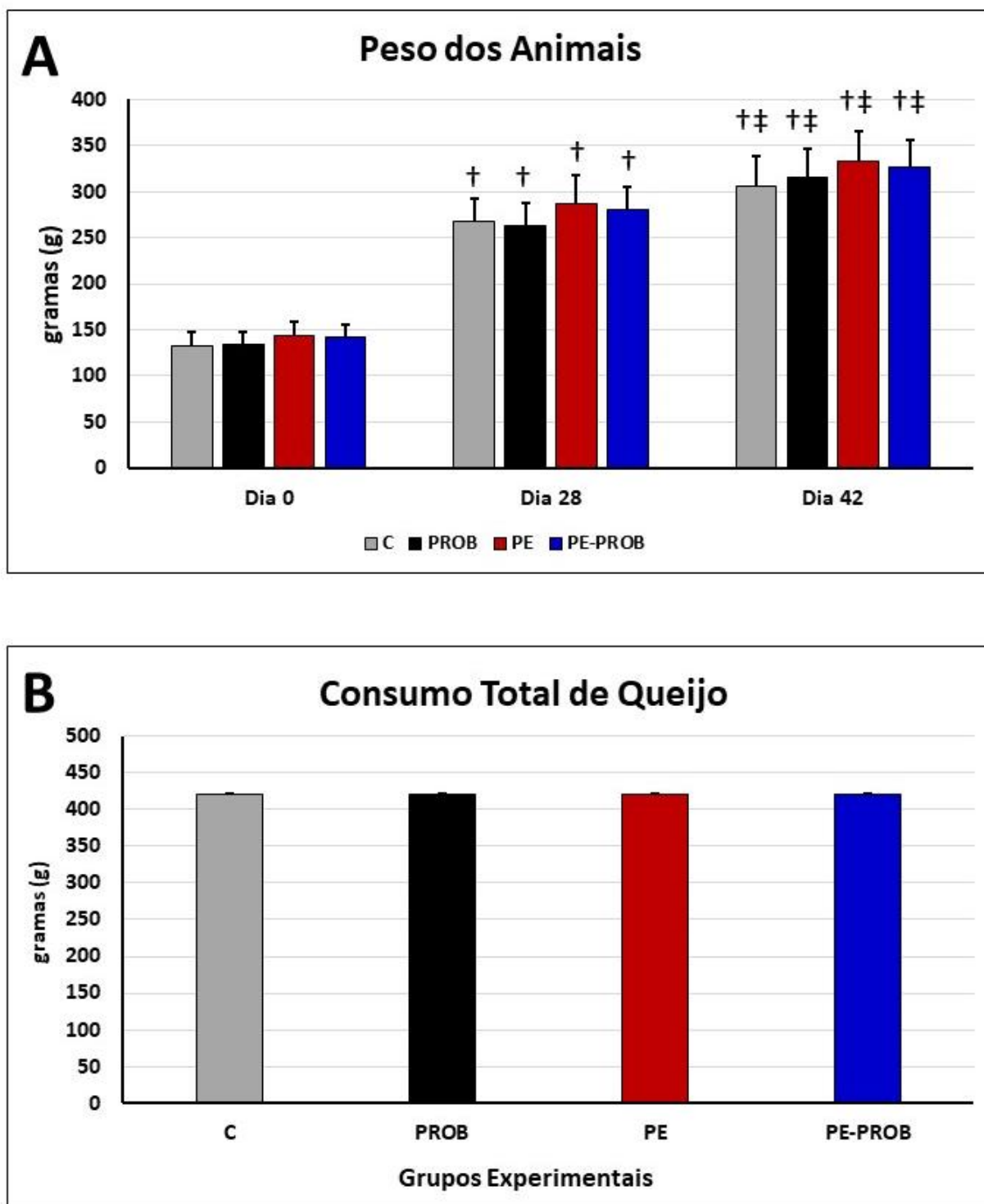


Figura 2. Médias e desvios-padrão dos pesos de todos os animais de cada grupo nos dias 0, 28 e 42 do experimento, com comparações intragrupos (A). Médias e desvios-padrão da quantidade de queijo consumido pelos animais de cada grupo durante todo o período experimental (B). Símbolos: †, diferença estatística comparado ao mesmo grupo no dia 0; ‡, diferença estatística comparado ao mesmo grupo no dia 28.

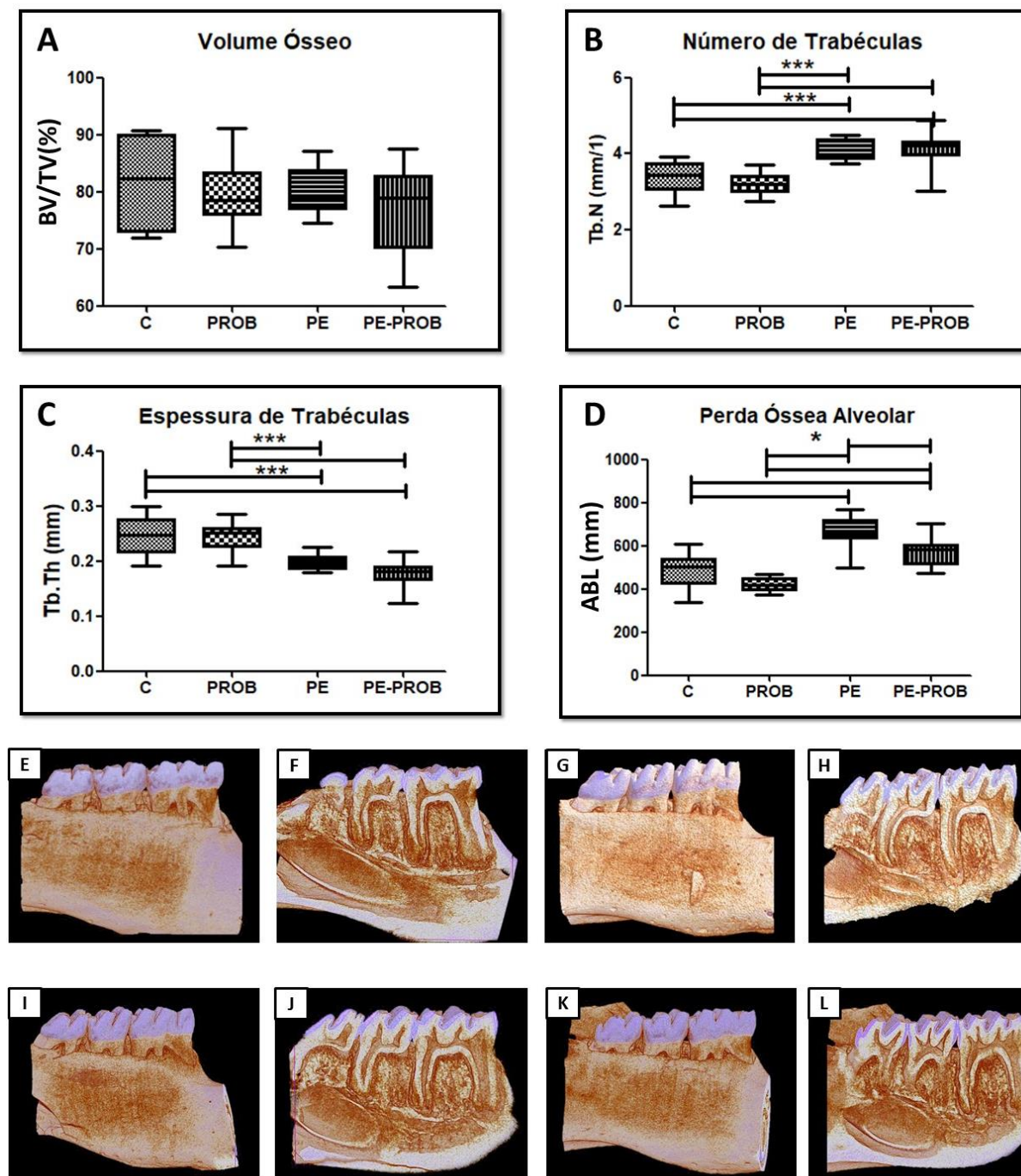


Figura 3. Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos BV (A), Tb.N (B), Tb.Th (C) e lineares ABL (D), com comparações intergrupos. Imagens representativas de reconstruções tridimensionais renderizadas de secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais dos grupos C (E e F), PE (G e H), PROB (I e J) e PE-PROB (K e L). Vista da superfície vestibular externa (E, G, I e K). Secção sagital da superfície interna (F, H, J e L). Tamanho de pixel = 7,96 mm. Símbolos: * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

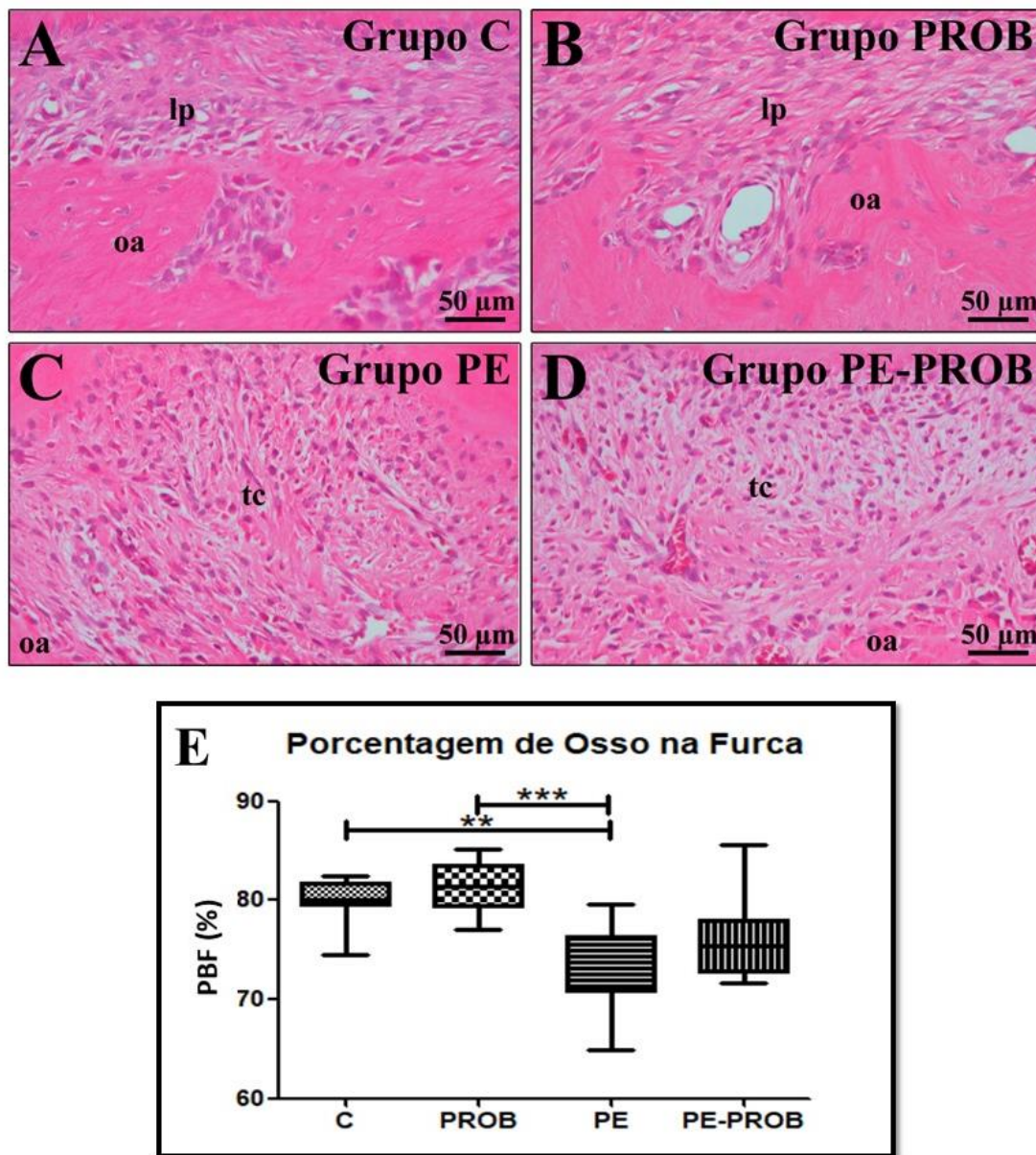


Figura 4. Fotomicrografias evidenciando a magnitude da resposta inflamatória periodontal nos grupos C (A), PROB (B), PE (C) e PE-PROB (D). Médias e desvios-padrão da PBF, com comparações intergrupos (E). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; lp, ligamento periodontal; tc, tecido conjuntivo; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Aumento original: 400 x. Barras de escala: 50 µm. Coloração: H&E.

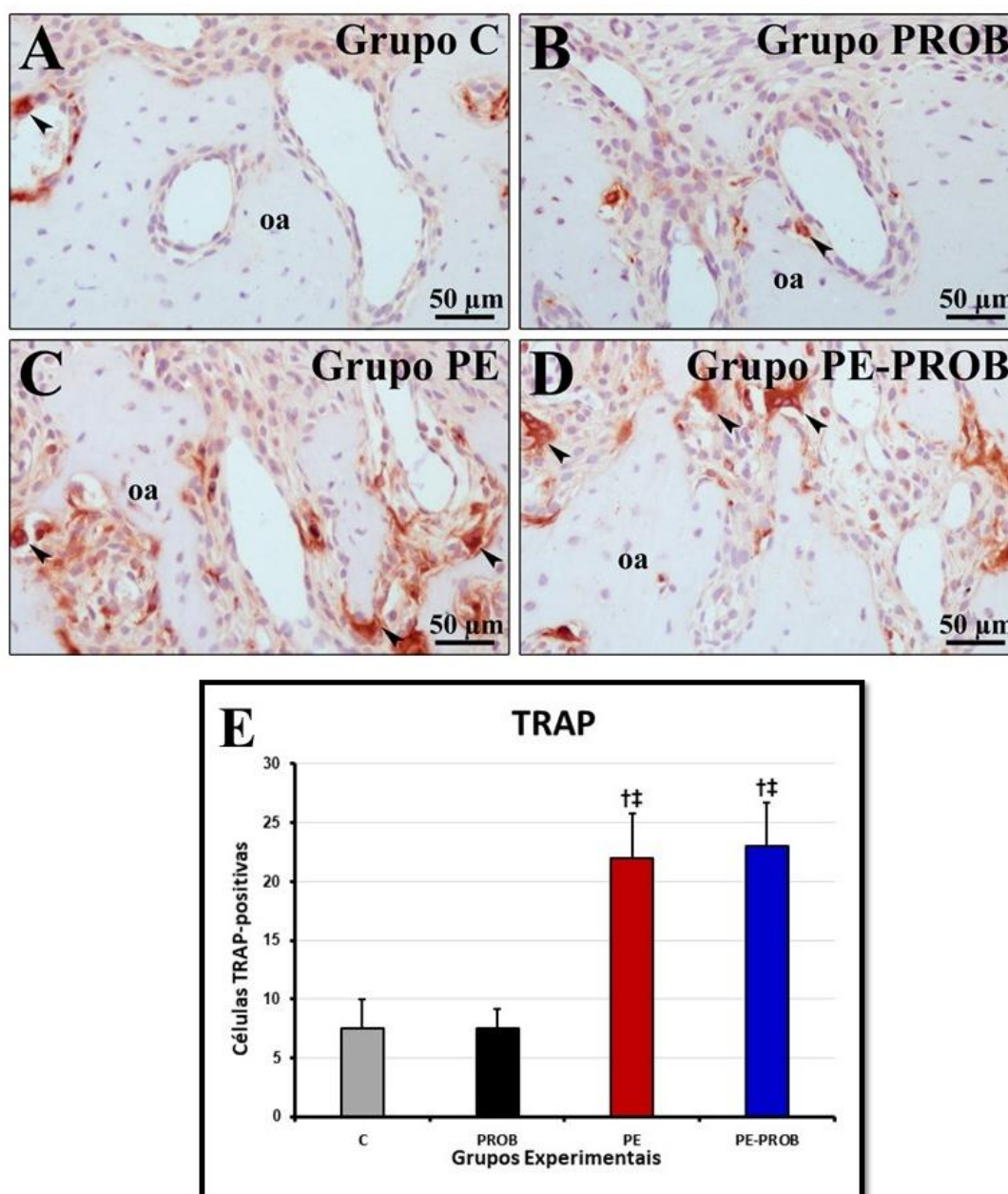


Figura 5. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TRAP na área de furca do primeiro molar inferior esquerdo nos grupos C (A), PROB (B), PE (C) e PE-PROB (D). Médias e desvios-padrão do número de células TRAP-positivas, com comparações intergrupos (E). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; setas, osteoclastos; †, diferença estatística comparado ao grupo C; ‡, diferença estatística comparado ao grupo PROB. Aumento original: 1000 x. Barra de escala: 50 μ m. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

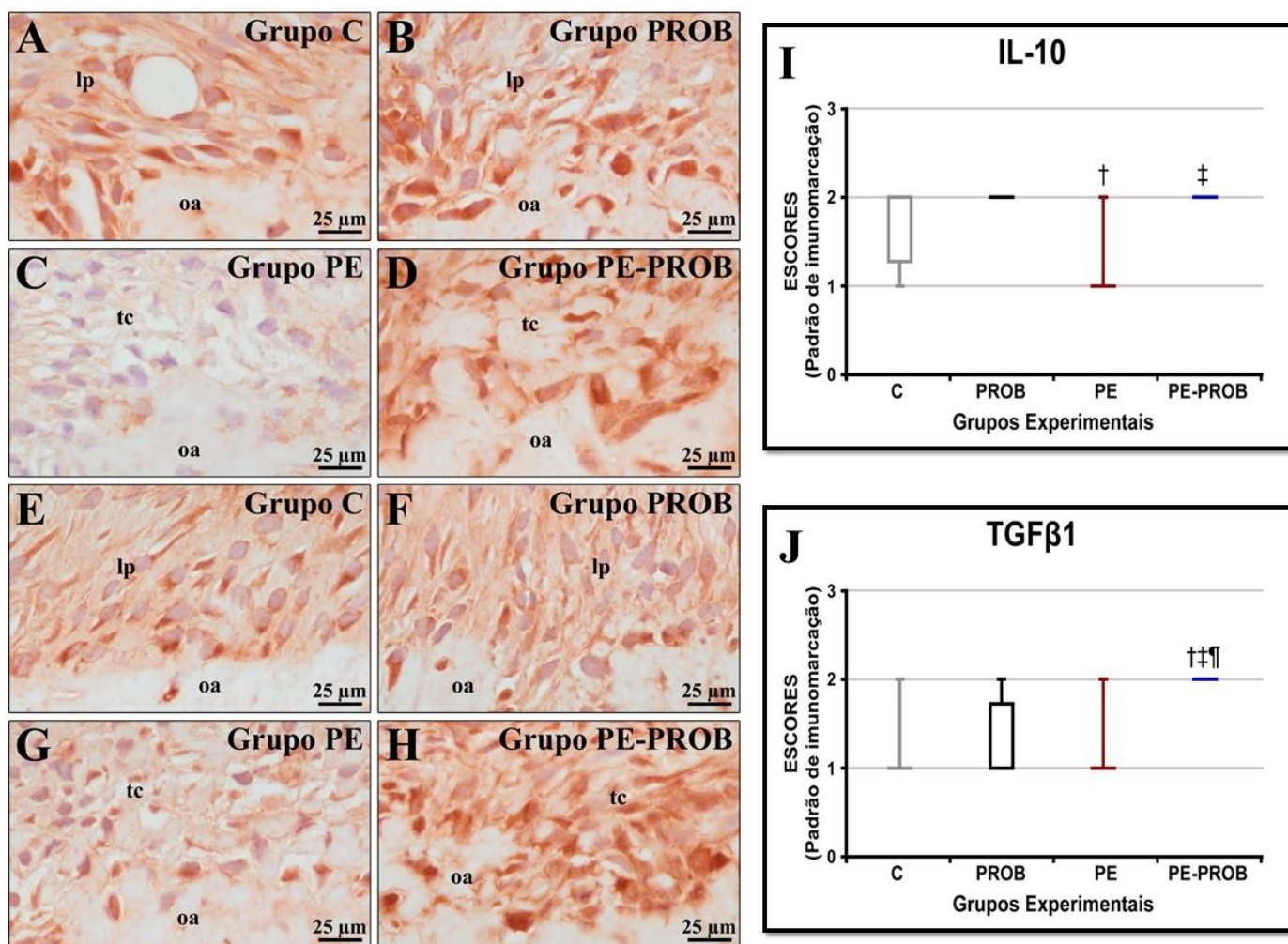


Figura 6. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para IL-10 (A-D) e TGF-β1 (E-H) na área de furca do primeiro molar inferior esquerdo nos grupos C (A, E), PROB (B, F), PE (C, G) e PE-PROB (D, H). Medianas, intervalos interquartis e valores máximos e mínimos dos padrões de imunomarcções para IL-10 (I) e TGF-β1 (J). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; lp, ligamento periodontal; tc, tecido conjuntivo; †, diferença estatística comparado ao grupo PROB; ‡, diferença estatística comparado ao grupo PE; ¶, diferença estatística comparado ao grupo C. Aumento original: 1000 x. Barra de escala: 25 μm. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.

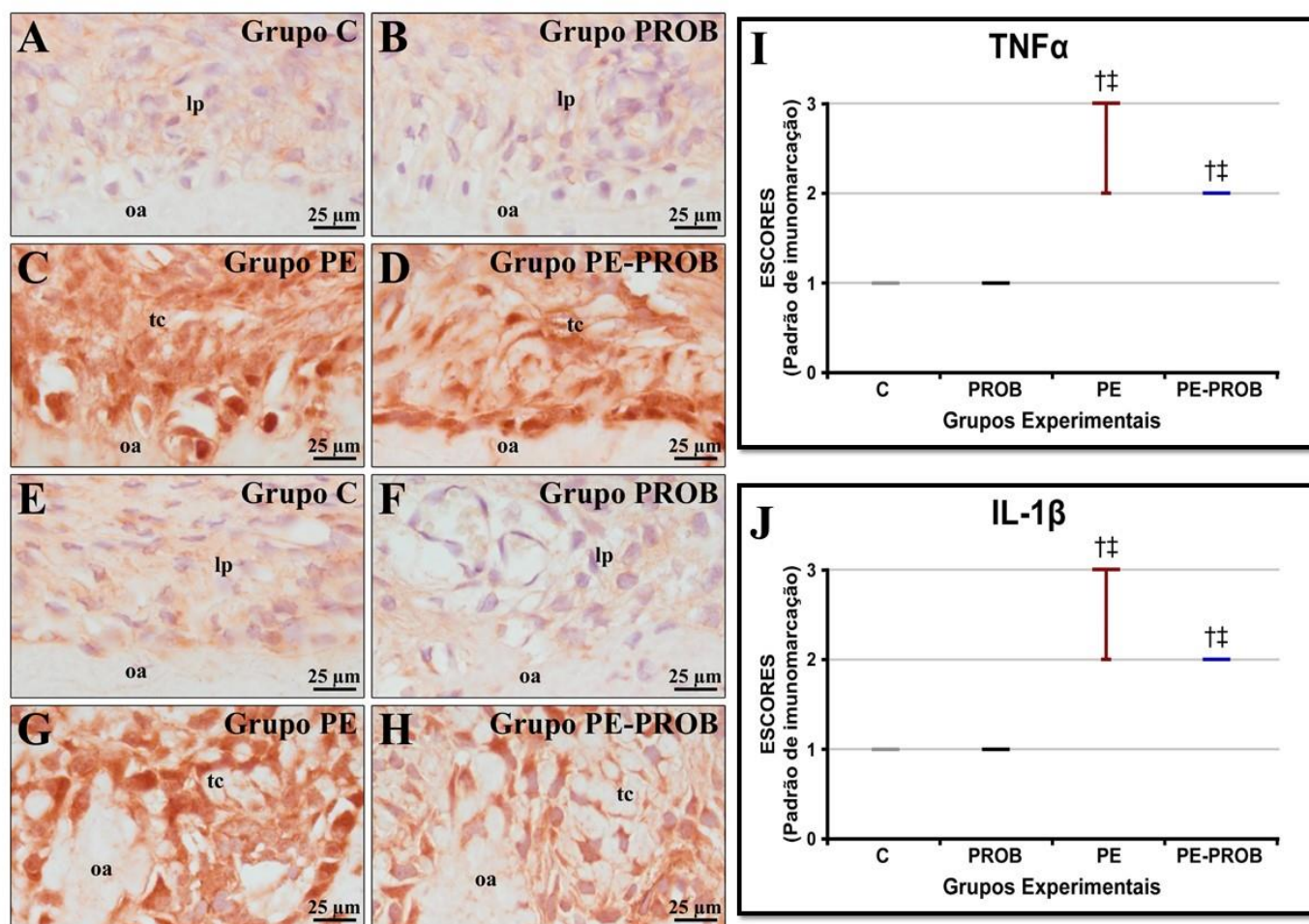


Figura 7. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TNF α (A-D) e IL-1 β (E-H) na área de furca do primeiro molar inferior esquerdo nos grupos C (A, E), PROB (B, F), PE (C, G) e PE-PROB (D, H). Medianas, intervalos interquartis e valores máximos e mínimos dos padrões de imunomarcacões para TNF α (I) e IL-1 β (J). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; lp, ligamento periodontal; tc, tecido conjuntivo; †, diferença estatística comparado ao grupo C; ‡, diferença estatística comparado ao grupo PROB. Aumento original: 1000 x. Barra de escala: 25 μ m. Contra-coloraçao: Hematoxilina de Harris.

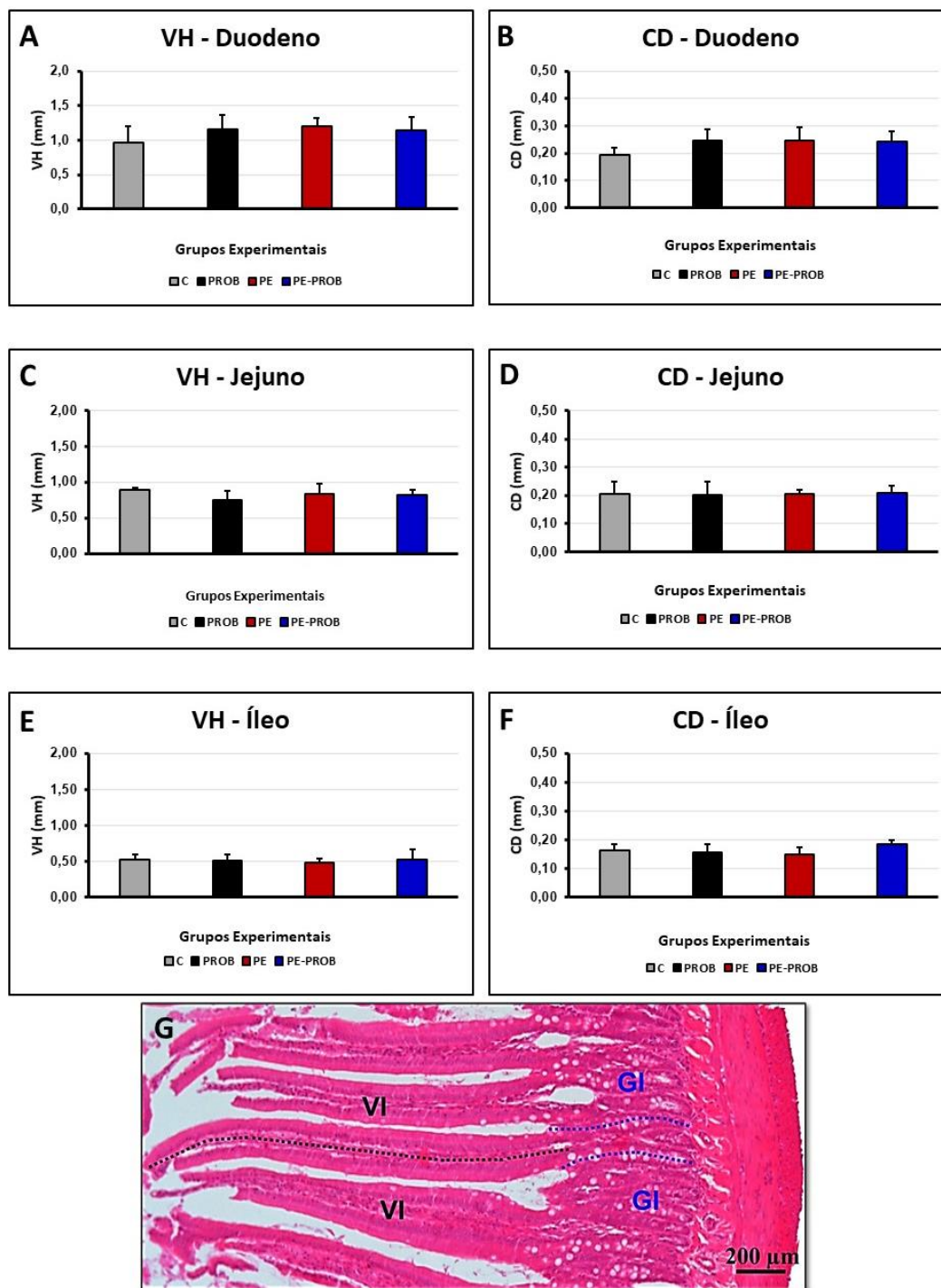
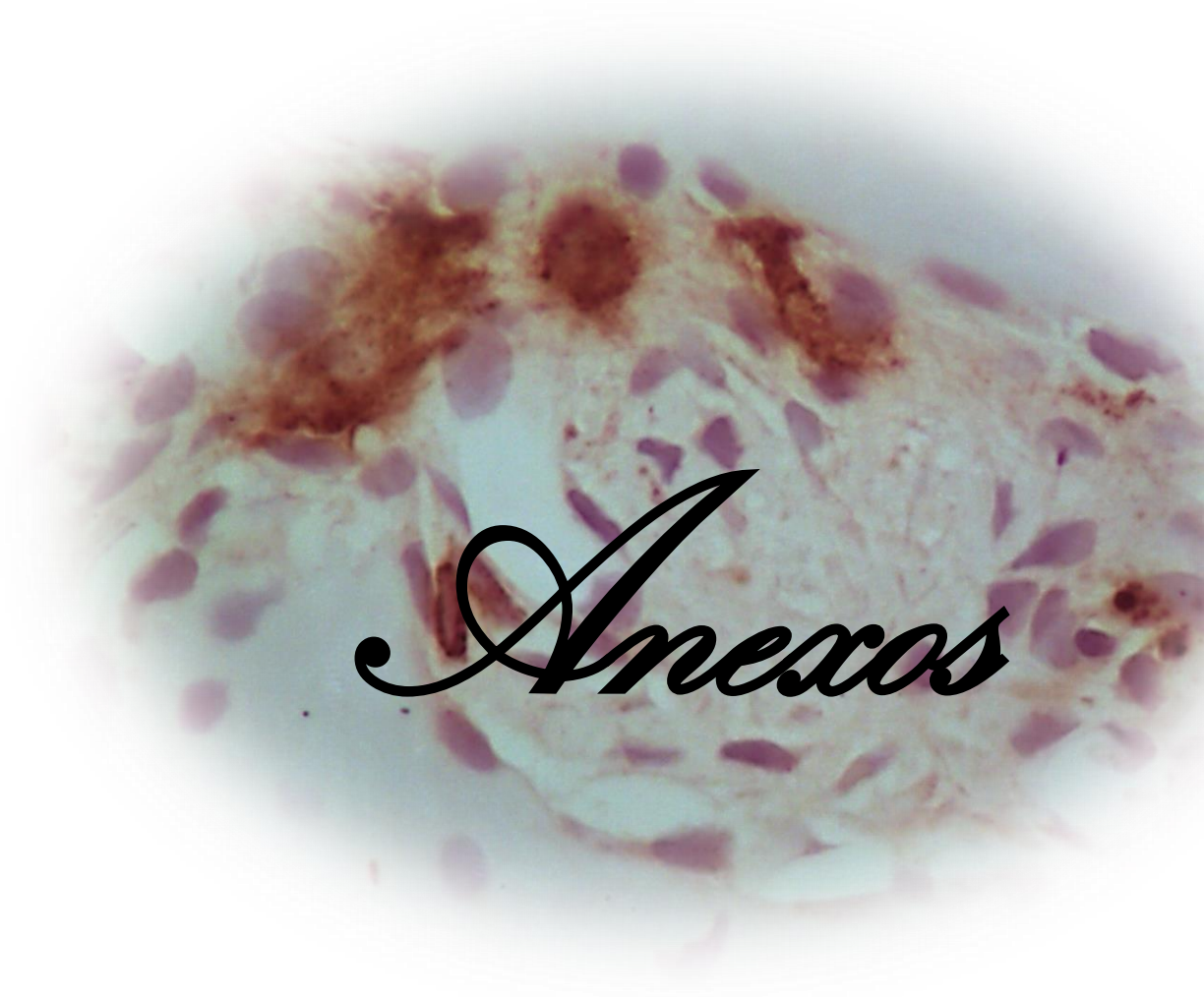


Figura 8. Médias e desvios-padrão dos valores de VH (A, C e E) e CD (B, D e F) de todos os grupos experimentais. Fotomicrografia evidenciando o aspecto histológico do intestino delgado ao nível do duodeno no grupo PE-PROB (G). O pontilhado preto mostra o comprimento da vilosidade intestinal (VI) e o pontilhado azul mostra a profundidade das glândulas intestinais (GI). Abreviações e símbolos: GI, glândulas intestinais; VI, vilosidades intestinais. Aumento original: 50 x. Barra de escala: 200 μ m. Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE).



Anexos

Anexo A – Normas para publicação no periódico “*Journal of Clinical Periodontology*”

Author Guidelines

Sections

- [1. Submission](#)
- [2. Aims and Scope](#)
- [3. Manuscript Categories and Requirements](#)
- [4. Preparing the Submission](#)
- [5. Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
- [6. Author Licensing](#)
- [7. Publication Process After Acceptance](#)
- [8. Post Publication](#)
- [9. Editorial Office Contact Details](#)

1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at <https://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>

[Click here](#) for more details on how to use ScholarOne.

Data protection

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed.

You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

Preprint policy

This journal will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Authors may also post the submitted version of a manuscript to non-commercial servers at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

For help with submissions, please contact: cpeedoffice@wiley.com

2. AIMS AND SCOPE

The aim of the *Journal of Clinical Periodontology* is to provide the platform for exchange of scientific and clinical progress in the field of Periodontology and allied disciplines, and to do so at the highest possible level. The Journal also aims to facilitate the application of new scientific knowledge to the daily practice of the concerned disciplines and addresses both practicing clinicians and academics. The Journal is the official publication of the European Federation of Periodontology but wishes to retain its international scope.

Journal of Clinical Periodontology publishes original contributions of high scientific merit in the fields of periodontology and implant dentistry. Its scope encompasses the physiology and pathology of the periodontium, the tissue integration of dental implants, the biology and the modulation of periodontal and alveolar bone healing and regeneration, diagnosis, epidemiology, prevention and therapy of periodontal disease, the clinical aspects of tooth replacement with dental implants, and the comprehensive rehabilitation of the periodontal patient. Review articles by experts on new developments in basic and applied periodontal science and associated dental disciplines, advances in periodontal or implant techniques and procedures, and case reports which illustrate important new information are also welcome.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

Journal of Clinical Periodontology publishes original research articles, reviews, clinical innovation reports and case reports. The latter will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. It is expected that any manuscript submitted represents unpublished original research.

i. Original Research Articles

Original Research articles must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

Word limit: 3,500 words maximum, excluding references.

Abstract: 200 words maximum; must be structured, under the sub-headings: Aim(s),

Materials and methods, Results, Conclusion(s).

Figures/Tables: Total of no more than 7 figures and tables.

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

Material and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The discussion section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

The discussion may usefully be structured with the following points in mind (modified from the proposal by [Richard Horton \(2002\), The Hidden Research Paper, The Journal of the American Medical Association, 287, 2775-2778](#)). Not all points will apply to all studies and its use is optional, but we believe it will improve the discussion section to keep these points in mind.

Summary of key finding

- Primary outcome measure(s)
- Secondary outcome measure(s)
- Results as they relate to a prior hypothesis

Strengths and Limitations of the Study

- Study Question
- Study Design
- Data Collection
- Analysis
- Interpretation
- Possible effects of bias on outcomes

Interpretation and Implications in the Context of the Totality of Evidence

- Is there a systematic review to refer to?
- If not, could one be reasonably done here and now?
- What this study adds to the available evidence
- Effects on patient care and health policy
- Possible mechanisms

Controversies Raised by This Study Future Research Directions

- For this particular research collaboration
- Underlying mechanisms
- Clinical research

ii. Clinical Innovation Reports

Clinical Innovation Reports are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

Word limit: 3,000 words maximum, excluding references.

Main text: should be organized with Introduction; Clinical Innovation Report; Discussion and Conclusion.

Figures/Tables: Total of no more than 12 figures and tables.

iii. Case Reports

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable, but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

Main text: should be organised with Introduction; Case report; Discussion and Conclusion.

iv. Reviews and Systematic Reviews

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged.

Wherever possible, reviews should be constructed and submitted as Systematic Reviews, or at the very least provide robust descriptions of the methods that would allow readers to reproduce these. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected.

Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

Note: For Systematic Reviews, the Journal adheres to the PRISMA reporting guidelines - PRISMA checklists should be included in submissions.

Word limit: 4,000 words maximum, excluding references.

Main text: should be organized with Introduction; Review; Discussion and Conclusion.

Revisions and Resubmissions

Please note that all revisions and resubmissions of papers should also include a separate rebuttal and a tracked changes document to assist in peer review.

4. PREPARING THE SUBMISSION

Cover Letters

Cover letters are not mandatory; however, they may be supplied at the author's discretion.

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- i. A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#));
- ii. A short running title of less than 40 characters;
- iii. The full names of the authors;
- iv. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- v. Acknowledgments;
- vi. Abstract and keywords;
- vii. Clinical Relevance
- viii. Main text;
- ix. References;
- x. Tables (each table complete with title and footnotes);
- xi. Figure legends;
- xiii. Appendices (if relevant).

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the [Editorial Policies and Ethical Considerations section](#) for details on eligibility for author listing.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in the [Editorial Policies and Ethical Considerations section](#) below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

The abstract is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper.

For Original Research Articles the abstract should be organized with aim, materials and methods, results and conclusions.

For clinical trials, it is encouraged that the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as clinicaltrials.gov.

Keywords

Please provide 1-5 keywords. When appropriate keywords are available, they should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at www.nlm.nih.gov/mesh. Authors may add specific keywords.

Main Text

All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is unavoidable.

Clinical Relevance

This section is aimed at giving clinicians a reading light to put the present research in perspective. It should be no more than 100 words and should not be a repetition of the abstract. It should provide a clear and concise explanation of the rationale for the study, of what was known before and of how the present results advance knowledge of this field. If appropriate, it may also contain suggestions for clinical practice.

It should be structured with the following headings: Scientific rationale for study; Principal findings; Practical implications.

Authors should pay particular attention to this text as it will be published in a highlighted box within their manuscript; ideally, reading this section should leave clinicians wishing to learn more about the topic and encourage them to read the full article.

References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the [APA FAQ](#). Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Beers, S. R. , & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486. doi:[10.1176/appi.ajp.159.3.483](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483)

Book

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

Chapter in an Edited Book

Borstrøm, I., & Elbro, C. (1997). Prevention of dyslexia in kindergarten: Effects of phoneme awareness training with children of dyslexic parents. In C. Hulme & M. Snowling (Eds.), *Dyslexia: Biology, cognition and intervention* (pp. 235–253). London: Whurr.

Internet Document

Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from <http://www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs>

Please note that all unpublished papers (submitted or in press) included in the reference list should be provided in a digital version at submission. The unpublished paper should be uploaded as a supplementary file for review.

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted.

[Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Color Figures. Figures submitted in color may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

Reproduction of Copyright Material

If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, credit must be shown in the contribution. It is the author's responsibility to also obtain written permission for reproduction from the copyright owners. For more information visit Wiley's Copyright Terms & Conditions FAQ at http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-terms--conditions_301.html

Data Citation

In recognition of the significance of data as an output of research effort, Wiley has endorsed [the FORCE11 Data Citation Principles](#) and is implementing a mandatory data

citation policy. Wiley journals require data to be cited in the same way as article, book, and web citations and authors are required to include data citations as part of their reference list.

Data citation is appropriate for data held within institutional, subject focused, or more general data repositories. It is not intended to take the place of community standards such as in-line citation of GenBank accession codes.

When citing or making claims based on data, authors must refer to the data at the relevant place in the manuscript text and in addition provide a formal citation in the reference list. We recommend the format proposed by the [Joint Declaration of Data Citation Principles](#):

[dataset] Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI)

Additional Files

Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

[Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Abbreviations, Symbols and Nomenclature:** *Journal of Clinical Periodontology* adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

Resource Identification Initiative

The journal supports the [Resource Identification Initiative](#), which aims to promote research resource identification, discovery, and reuse. This initiative, led by the [Neuroscience Information Framework](#) and the [Oregon Health & Science University Library](#), provides unique identifiers for antibodies, model organisms, cell lines, and tools including software and databases. These IDs, called Research Resource Identifiers (RRIDs), are machine-readable and can be used to search for all papers where a particular resource was used and to increase access to critical data to help researchers identify suitable reagents and tools.

Authors are asked to use RRIDs to cite the resources used in their research where applicable in the text, similar to a regular citation or Genbank Accession number. For antibodies, authors should include in the citation the vendor, catalogue number, and RRID both in the text upon first mention in the Methods section. For software tools and databases, please provide the name of the resource followed by the resource website, if available, and the RRID. For model organisms, the RRID alone is sufficient.

Additionally, authors must include the RRIDs in the list of keywords associated with the manuscript.

To Obtain Research Resource Identifiers (RRIDs)

1. Use the [Resource Identification Portal](#), created by the Resource Identification Initiative Working Group.
2. Search for the research resource (please see the section titled “Search Features and Tips” for more information).
3. Click on the “Cite This” button to obtain the citation and insert the citation into the manuscript text.

If there is a resource that is not found within the [Resource Identification Portal](#), authors are asked to register the resource with the appropriate resource authority. Information on how to do this is provided in the “Resource Citation Guidelines” section of the Portal.

If any difficulties in obtaining identifiers arise, please contact rii-help@scicrunch.org for assistance.

Example Citations

Antibodies: "Wnt3 was localized using a rabbit polyclonal antibody C64F2 against Wnt3 (Cell Signaling Technology, Cat# 2721S, RRID: AB_2215411)"

Model Organisms: "Experiments were conducted in *c. elegans* strain SP304 (RRID:CGC_SP304)"

Cell lines: "Experiments were conducted in PC12 CLS cells (CLS Cat# 500311/p701_PC-12, RRID:CVCL_0481)"

Tools, Software, and Databases: "Image analysis was conducted with CellProfiler Image Analysis Software, V2.0 (<http://www.cellprofiler.org>, RRID:nif-0000-00280)"

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

Editing, Translation, and Formatting Support: [Wiley Editing Services](#) can greatly improve the chances of a manuscript being accepted. Offering expert help in English language editing, translation, manuscript formatting, and figure preparation, Wiley Editing Services ensures that the manuscript is ready for submission.

Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Guidelines for Cover Submission

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, [please follow these guidelines](#).

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Manuscripts are single-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is [available here](#).

Appeal of Decision

Under exception circumstances, authors may appeal the editorial decision. Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office at cpeedoffice@wiley.com with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

Please note that all revisions and resubmissions of papers should also include a separate rebuttal and a tracked changes document to assist in peer review.

Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: [Declaration of Helsinki](#); [US Federal Policy for the Protection of Human Subjects](#); or [European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice](#). It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Patient anonymity should be preserved. When detailed descriptions, photographs, or videos of faces or identifiable body parts are used that may allow identification, authors should obtain the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a [standard patient consent form](#) available for use. Where photographs are used they need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized; black eye bars should not be used as they do not sufficiently protect an individual's identity).

Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the [ARRIVE guidelines](#) for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the [US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#), the [US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals](#), and [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#).
- UK authors should conform to UK legislation under the [Animals \(Scientific Procedures\) Act 1986 Amendment Regulations \(SI 2012/3039\)](#).
- European authors outside the UK should conform to [Directive 2010/63/EU](#).

Clinical Trial Registration

The journal requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are required to adhere to recognised research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

- [Randomised trials](#) : [CONSORT](#)
Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A.
- [Observational studies](#) : [STROBE](#)
- [Systematic reviews](#) : [PRISMA](#)
- [Case reports](#) : [CARE](#)
- [Qualitative research](#) : [SRQR](#)
- [Diagnostic / prognostic studies](#) : [STARD](#)
- [Quality improvement studies](#) : [SQUIRE](#)
- [Economic evaluations](#) : [CHEERS](#)
- [Animal pre-clinical studies](#) : [ARRIVE](#)
- [Study protocols](#) : [SPIRIT](#)
- [Clinical practice guidelines](#) : [AGREE](#)

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from:

- [Future of Research Communications and e-Scholarship \(FORCE11\)](#)
- [National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines](#)
- [The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues](#)
- [Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities \(MIBBI\) website](#)
- [FAIRsharing website](#)

Species Names

Upon its first use in the title, abstract, and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species, and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see varnomen.hgvs.org, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: ‘These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345’. Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ): www.ddbj.nig.ac.jp
- EMBL Nucleotide Archive: ebi.ac.uk/ena
- GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories:

- Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu
- SWISS-PROT: expasy.ch/sprot/sprot-top

Structural Data

For papers describing structural data, atomic coordinates and the associated experimental data should be deposited in the appropriate databank (see below). **Please note that the data in databanks must be released, at the latest, upon publication of the article.** We trust in the cooperation of our authors to ensure that atomic coordinates and experimental data are released on time.

- **Organic and organometallic compounds:** Crystallographic data should not be sent as Supporting Information, but should be deposited with the *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC) at ccdc.cam.ac.uk/services/structure%5Fdeposit.
- **Inorganic compounds:** *Fachinformationszentrum Karlsruhe* (FIZ; fiz-karlsruhe.de).
- **Proteins and nucleic acids:** *Protein Data Bank* (rcsb.org/pdb).
- **NMR spectroscopy data:** *BioMagResBank* (bmrb.wisc.edu).

Statistical Analysis

As papers frequently provide insufficient detail as to the performed statistical analyses, please describe with adequate detail. For clinical trials intention to treat analyses are encouraged (the reasons for choosing other types of analysis should be highlighted in the submission letter and clarified in the manuscript).

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Source of Funding](#) and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms together with the manuscript on submission. The disclosure statement should be included under Acknowledgements. Please find the form below:

[Conflict of Interest Disclosure Form](#)

Funding

Authors should list all funding sources at submission. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Authorship

The journal follows the [ICMJE definition of authorship](#), which indicates that authorship be based on the following 4 criteria:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- Final approval of the version to be published; AND
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

In addition to being accountable for the parts of the work he or she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of the work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors.

All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged. These authorship criteria are intended to reserve the status of authorship for those who deserve credit and can take responsibility for the work. The criteria are not intended for use as a means to disqualify colleagues from authorship who otherwise meet authorship criteria by denying them the opportunity to meet criterion #s 2 or 3. Therefore, all individuals who meet the first criterion should have the opportunity to participate in the review, drafting, and final approval of the manuscript.

Data Sharing and Data Accessibility

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

Human subject information in databases. The journal refers to the [World Health Medical Association Declaration of Taipei on Ethical Considerations Regarding Health Databases and Biobanks](#).

Publication Ethics

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

ORCID

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. [Find more information here](#).

6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click [here](#).)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please [click here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: If you choose to publish using OnlineOpen you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with [Wiley Author Services](#). The author will be asked to sign a publication license at this point.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance and appear in PDF format only. They are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked and are indexed by PubMed. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is accurate for indexing. Subsequently, the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

Proofs

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Page proofs should be carefully proofread for any copyediting or typesetting errors. Online guidelines are provided within the system. No special software is required, all common browsers are supported. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email. Return of proofs via e-mail is possible in the event that the online system cannot be used or accessed.

Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early

View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

8. POST PUBLICATION

Access and sharing

When the article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Promoting the Article

To find out how to best promote an article, [click here](#).

Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

For queries about submissions, please contact cpeedoffice@wiley.com

Author Guidelines Updated 08 March 2019

Anexo B – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 105/2018
Ribeirão Preto, 19 de setembro de 2018.

Ref. processo nº 2018.1.561.58.3

Senhor(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em sua 60ª Sessão, realizada em 19/09/2018, **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Efeitos do queijo probiótico com adição de Lactobacillus casei-01 na periodontite experimental em ratos" emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 19/10/2020**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr.(a)
Prof. Dr. Michel Reis Messor
Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia
desta Faculdade

/aafn

AVENIDA DO CAFÉ S/Nº - TEL: (16) 3602-0251/4123- FAX: (16) 3602-4102
14040-904 - RIBEIRÃO PRETO - SP- BRASIL

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “Efeitos do queijo probiótico com adição de *Lactobacillus casei-01* na periodontite experimental em ratos”, Protocolo nº 2018.1.561.58.3, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Michel Reis Messora – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 19/09/2018.

Vigência do Projeto	19/09/2018 a 19/09/2020
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Wistar Hannover
Nº de animais	44
Peso/Idade	300-350g / 3-4 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 19 de setembro de 2018.


Prof. Dr. Fabricio Kitazono de Carvalho
 Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA - FORP/USP