



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA (PPGO) - MESTRADO



PEDRO HENRIQUE DE CARLI RODRIGUES

Avaliação do efeito da terapia com probiótico nos tecidos periodontais de ratos
com periodontite induzida por ligadura

PEDRO HENRIQUE DE CARLI RODRIGUES

Avaliação do efeito da terapia com probiótico nos tecidos periodontais de ratos
com periodontite induzida por ligadura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do
Oeste do Paraná, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Odontologia

Área de concentração: Odontologia

Orientador: Prof. Dra. Patricia Oehlmeyer Nassar

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Rodrigues, Pedro Henrique De Carli
Avaliação do efeito da terapia com probiótico nos tecidos periodontais de ratos com periodontite induzida por ligadura / Pedro Henrique De Carli Rodrigues; orientador(a), Patricia Oehlmeier Nassar, 2019.
32 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Graduação em Odontologia Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2019.

1. Periodontite. 2. Inflamação. 3. Probióticos. I. Nassar, Patricia Oehlmeier. II. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-85
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



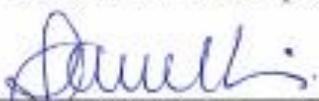
PEDRO HENRIQUE DE CARLI RODRIGUES

Avaliação do efeito da terapia com probiótico nos tecidos periodontais de ratos com periodontite induzida por ligadura

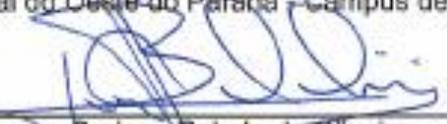
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Odontologia, linha de pesquisa Patologia Aplicada À Clínica Odontológica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientador(a) - Patrícia Oehlmeier Nassar

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Danielle Shima Luize Sottovia

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Greison Rabele de Oliveira
Centro Universitário Inga (UNINGA)

Cascavel, 27 de fevereiro de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo a meu avô, Waldemar De Carli, que partiu durante a produção deste trabalho e sempre me incentivou na busca do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela saúde e força, principalmente nos momentos de dificuldade durante a realização deste trabalho.

A meu pai, Solon Larré Rodrigues, minha mãe, Marisa Maria De Carli Rodrigues e minha irmã, Maria Eduarda De Carli Rodrigues, que nunca mediram esforços para proporcionar conforto e sempre estiveram presentes em todas as necessidades. Também a meus avós, paternos e maternos, que sempre torceram e me incentivaram na busca por estudo e realizações.

À minha namorada, Bruna Larissa Nascimento, por todo companheirismo e parceria fundamental, tanto nas horas alegres como nas difíceis.

À toda equipe colaboradora, que participou diretamente na realização e construção deste estudo nos laboratórios da Unioeste.

Por fim, à minha orientadora, Patricia Oehlmeyer Nassar, a qual me proporcionou o contato com a pesquisa desde meados da graduação e continuou até o final deste mestrado, sempre proporcionando o auxílio necessário e sendo uma grande inspiração pessoal e profissional.

Este estudo teve apoio financeiro da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE e CAPES.

Os autores deste estudo agradecem imensamente à Professora Doutora Luciana Oliveira de Fariña do Curso de Farmácia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE por ceder os microrganismos utilizados no probiótico.

Avaliação do efeito da terapia com probiótico nos tecidos periodontais de ratos com periodontite induzida por ligadura

RESUMO

Define-se probióticos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do indivíduo. Bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bacillus* são exemplos de probióticos. Estes parecem ser uma alternativa biológica para alterar, pelo menos a curto prazo, a estrutura da placa bacteriana e ajudar a controlar a doença periodontal (DP). Portanto, os probióticos passaram a ser cogitados como uma nova modalidade terapêutica no tratamento da DP e estudos são necessários para avaliar seu efeito. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da terapia com probiótico nos tecidos periodontais e mucosa intestinal de ratos com periodontite induzida por ligadura trinta e dois ratos *Wistar* foram divididos aleatoriamente em 4 grupos com 8 animais cada, sendo): 1) Grupo controle (GC): sem doença periodontal e sem administração de probiótico; 2) Grupo doença periodontal (DP): com doença periodontal induzida e sem administração de probiótico; 3) Grupo probiótico (PROB): sem doença periodontal e com administração de probiótico; 4) Grupo doença periodontal + probiótico (DPPRO): com doença periodontal e com administração de probiótico. Os animais dos grupos DP e DPPRO receberam uma ligadura nos primeiros molares inferiores que atuou como irritante gengival por 44 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e desenvolvimento da DP. O probiótico a base de *Lactobacillus acidophilus* foi administrado oralmente por 44 dias ($8,0 \times 10^7$ UFC/mL), iniciando no mesmo dia da indução da DP. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. O sangue foi coletado para avaliar as concentrações de triglicerídeos e colesterol total. Foram coletadas as hemi-mandíbulas para análise histomorfométrica e radiográfica. O duodeno também foi retirado para avaliação morfológica e o tecido gengival ao redor dos molares foi coletado para análise da presença de interleucina 17 (IL-17). Os dados obtidos apresentaram normalidade e foram analisados através dos testes ANOVA e pós-teste de Tukey. Os resultados da dosagem de colesterol total e triglicerídeos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, assim como nas análises histomorfométricas do duodeno. Em relação às análises radiográficas e histomorfométricas da mandíbula, o grupo DPPRO teve uma perda óssea significativamente menor que o grupo DP, assim como menor número de osteoclastos no grupo DPPRO quando comparado ao DP. Em relação a IL-17 houve diminuição da mesma no grupo DPPRO quando comparado ao grupo DP. Baseado nos resultados obtidos sugere-se que a terapia com probiótico à base de *Lactobacillus acidophilus* foi efetiva na inibição do desenvolvimento da periodontite através da diminuição da perda óssea alveolar e modulação da inflamação. No entanto, não teve nenhum efeito sobre a morfologia intestinal do duodeno.

Palavras-chave: Periodontite, inflamação, probióticos.

Evaluation of the effect of probiotic therapy on periodontal tissues of rats with ligature-induced periodontitis

ABSTRACT

Probiotics are defined as living microorganisms which, when administered in suitable amounts, confer a benefit to the health of the individual. Bacteria of the genus *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Bacillus* are examples of probiotics. These appear to be a biological alternative to alter, at least in the short term, the plaque structure and help control periodontal disease (PD). Therefore, probiotics are now considered as a new therapeutic modality in the treatment of PD and studies are necessary to evaluate its effect. The objective of this study was to evaluate the effect of probiotic therapy on the periodontal and intestinal mucosa of rats with ligature-induced periodontitis. Thirty-two Wistar rats were randomly divided into 4 groups with 8 animals each: 1) Control group): without periodontal disease and without administration of probiotic; 2) Periodontal disease group (PD): with periodontal disease induced and without administration of probiotic; 3) Probiotic group (PROB): without periodontal disease and with administration of probiotic; 4) Group periodontal disease + probiotic (DPPRO): with periodontal disease and administration of probiotic. The animals of the DP and DPPRO groups received a ligature in the lower first molars that acted as a gingival irritant for 44 days, favoring the accumulation of plaque and development of PD. *Lactobacillus acidophilus* probiotic was given orally for 44 days (8.0×10^7 CFU / mL), starting the same day as DP induction. After the experimental period, the animals were euthanized by guillotine decapitation. Blood was collected to assess triglyceride and total cholesterol concentrations. Hemi-mandibles were collected for histomorphometric and radiographic analysis. The duodenum was also removed for morphological evaluation and the gingival tissue around the molars was collected for analysis of the presence of interleukin 17 (IL-17). The data obtained were normal and were analyzed through ANOVA and Tukey post-test. The results of the total cholesterol and triglycerides dosage did not present statistically significant differences between the groups, as well as histomorphometric analyzes of the duodenum. Regarding the radiographic and histomorphometric analyzes of the mandible, the DPPRO group had a significantly lower bone loss than the DP group, as well as a lower number of osteoclasts in the DPPRO group when compared to the DP. There was a decrease in IL-17 in the DPPRO group when compared to the DP group. Based on the results obtained, it is suggested that *Lactobacillus acidophilus*-based probiotic therapy was effective in inhibiting the development of periodontitis by decreasing alveolar bone loss and modulating inflammation. However, it had no effect on the intestinal morphology of the duodenum.

Keywords: Periodontitis, inflammation, probiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema dos procedimentos para coleta de dados e representação da linha de tempo contendo os 50 dias do experimento	13
Tabela 1	Valores da dosagem de colesterol e triglicérides.....	17
Tabela 2	Medidas da distância da junção cimento-esmalte até a crista alveolar.	17
Tabela 3	Quantidade de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos	18
Tabela 4	Valores da expressão de IL-17em todos os grupos estabelecidos.	18
Tabela 5	Medidas das alturas das vilosidades (AV) e das alturas das cristas (AC).	19

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas das publicações científicas: *Journal
of Periodontology* disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/19433670/homepage/forauthors.html>

SUMÁRIO

1 Introdução.....	10
2 Metodologia.....	12
3 Resultados.....	17
4 Discussão.....	20
5 Conclusão	23
6 Referências bibliográficas	24
8. Anexos.....	27

Introdução

Caracterizada como uma doença inflamatória que afeta os tecidos periodontais e originada por biofilmes patogênicos, a periodontite afeta principalmente as estruturas do periodonto de sustentação, gerando perda de inserção do tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar.^{1,2} O Ministério da Saúde realizou um levantamento epidemiológico no ano de 2012 e revelou que 99,2% dos idosos na faixa etária de 65 a 74 anos evidenciaram alguma alteração no periodonto, e destes, 90,5 % não apresentaram nenhum dente funcional em alguma arcada.³

A alta prevalência da periodontite e sua capacidade de afetar as funções mastigatórias, estéticas e conseqüentemente a qualidade de vida do hospedeiro contribuíram para que a doença fosse apontada como um relevante problema de saúde pública, e, além disso, patologias sistêmicas comuns como diabetes *mellitus* também podem potencializar a progressão da periodontite.^{4,5} Alterações no perfil lipídico e desequilíbrios metabólicos em relação aos níveis de triglicérides, colesterol total e lipoproteínas de alta densidade também são influenciadas pela instalação de doenças periodontais.⁶

A resposta inflamatória que o organismo hospedeiro desenvolve contra os micro-organismos invasores pode tanto resultar em efeitos protetores como em destrutivos no periodonto.^{7,8} Os leucócitos são células que se destacam através da ação contra patógenos invasores e são guiados ao local pela atividade de citocinas e quimiocinas, além de produzirem mediadores inflamatórios, como a interleucina 17 (IL-17) que favorece e contribui para o processo da inflamação e possível dano tecidual.^{9,10}

Novas alternativas de controle da periodontite vêm sendo estudadas para possibilitar um tratamento com menos riscos de efeitos colaterais aos pacientes, e neste contexto a terapia probiótica surge como um novo meio de atuação em função de sua atividade oral ser semelhante à da mucosa intestinal.^{11,12}

De acordo com a resolução 243/2018 da ANVISA, define-se probiótico como micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo.¹³ Os leites fermentados, produzidos através da fermentação microbiológica do leite são os produtos mais relevantes no mercado que apresentam comunidades probióticas em sua composição e atualmente são indicados para auxiliar no controle da gastrite, colesterol, hipertensão e outras doenças.¹⁴⁻¹⁶

A maioria das pesquisas avalia o efeito dos probióticos no trato intestinal, mas, recentemente, a cavidade oral também se tornou foco de investigação e interesse em relação ao uso destes micro-organismos. Para que eles consigam agir na cavidade oral, é necessário

que os mesmos sobrevivam às condições ambientais, aos processos de defesa e não ofereçam risco ao hospedeiro. A ação dos probióticos tem sido investigada no tratamento da cárie, da candidíase oral, da halitose e também como sua relação com a saúde do periodonto.¹⁵

Em função da periodontite ser causada por bactérias patogênicas, acredita-se que a terapia probiótica pode agir sobre o controle da mesma em função dos mecanismos de adesão e colonização, competindo com os micro-organismos invasores, além de possibilitar uma melhora na resposta imune e também produzir substâncias antimicrobianas.¹⁷ Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da ação probiótica sobre os tecidos periodontais e mucosa intestinal de ratos submetidos ou não a periodontite experimental, analisando a capacidade do mesmo em reduzir o desenvolvimento da periodontite através da diminuição da perda óssea alveolar e modulação da inflamação, bem como na morfologia intestinal destes animais.

Metodologia

População do estudo, amostra e grupos

Foram utilizados 32 ratos Wistar machos adultos, pesando em média 200 g, provenientes do Biotério Central da Unioeste. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial de Fisiologia, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro – 07:00 – 19:00 h) e receberam água e ração comercial à vontade. Os 32 animais foram randomizados aleatoriamente e alocados em quatro grupos (n=8), baseado em estudos preliminares.¹² Os animais foram divididos em: 1) Grupo controle (GC): sem doença periodontal e sem administração de probiótico; 2) Grupo doença periodontal (DP): com doença periodontal induzida e sem administração de probiótico; 3) Grupoprobótico (PRO): sem doença periodontal e com administração de probiótico; 4) Grupo doença periodontal + probiótico (DPPRO): com doença periodontal e com administração de probiótico. Os ratos dos grupos DP e DPPRO receberam uma ligadura de fio de algodão número 40, nos primeiros molares inferiores, direito e esquerdo, que atuou como irritante gengival por 44 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e desenvolvimento da DP, e os grupos PROB e DPPRO receberam o probiótico a base de *Lactobacillus acidophilus* ($8,0 \times 10^7$ UFC/mL) administrado oralmente em forma de iogurte iniciado no mesmo dia da indução da DP, por 44 dias 2 ml 1x ao dia. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE.

Procedimentos de coleta de dados

No primeiro dia de experimento, os animais foram recebidos e iniciaram o processo de aclimação. Após 7 dias, realizou-se a indução da periodontite por ligadura e também deu-se início à administração probiótica, que manteve-se por mais 44 dias. No quinquagésimo dia de experimento, a eutanásia dos animais foi realizada, assim como a coleta dos materiais para as análises (Figura 1).

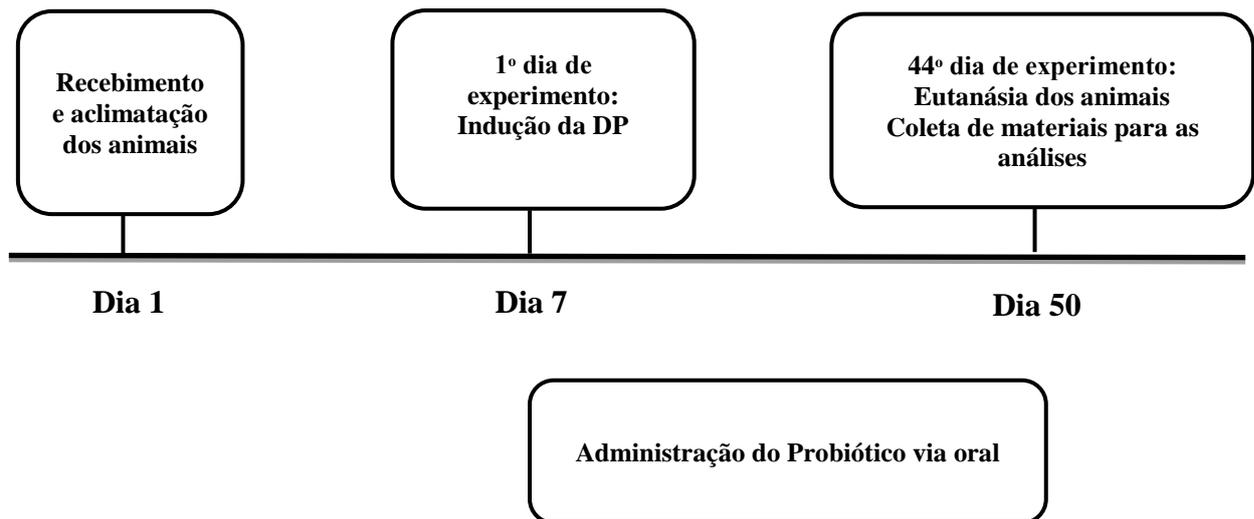


Figura 1 –Esquema dos procedimentos para coleta de dados e representação da linha de tempo contendo os 50 dias do experimento.

Indução da doença periodontal

Após 7 dias de aclimação, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 0,04 mg/kg (ANASEDAN, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia-SP) e cloridrato de quetamina 0,08 mg/kg (DOPALEN, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia-SP), por via peritoneal e posicionados em mesa operatória adaptada com duas argolas, superior e inferior, que afastavam os incisivos promovendo manutenção da abertura bucal e facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, colocou-se um fio de algodão número 40 ao redor dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo. Esta ligadura atuou como irritante gengival e foi mantida por 44 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e consequente desenvolvimento da DP.¹⁸ O probiótico a base de *Lactobacillus acidophilus* foi administrado oralmente por 44 dias através de uma seringa plástica diretamente na boca dos animais, sendo 2ml, 1x ao dia, na concentração de $8,0 \times 10^7$ UFC/mL.

Eutanásia dos animais

Após os 44 dias da indução da DP e administração do probiótico, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina, sendo previamente condicionados em CO₂ para redução de estresse, com posterior coleta de suas hemi-mandíbulas para análise radiográfica e histológica dos tecidos periodontais e sangue para análise de colesterol e triglicerídeos.

Coleta das amostras de sangue para colesterol total e triglicerídeos

No momento da eutanásia, o sangue foi coletado em tubos contendo heparina. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm e o plasma foi separado e estocado a -20°C para dosagem das concentrações de Colesterol Total e Triglicerídeos, que foram

realizadas por radioimunoensaio, utilizando-se *kits* específicos (Colesterol Liquiform – Labtest e Triglicérides Liquiform – Labtest).

Análise radiográfica

Após a eutanásia e a remoção do tecido gengival ao redor do primeiro molar, realizou-se a dissecação das hemi-mandíbulas do lado esquerdo. Em seguida, foram realizadas tomadas radiográficas com o uso de um aparelho de R-X da marca Dabi-Atlante, modelo Spectro com 70 Kvp e 8mA, mantendo-se uma distância foco/filme de 50 cm e tempo de exposição de 0,3 segundos. As hemi-mandíbulas foram colocadas com o lado lingual sobre o filme radiográfico periapical e posicionados para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares ficassem no mesmo plano vertical.

As imagens foram digitalizadas e inseridas no programa Sigma-Scan 2.9 para obtenção da medida linear, em centímetros, delimitada pela junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior dos ratos. Foram realizadas três medidas, em dias diferentes, por um mesmo pesquisador previamente calibrado e a média das mesmas foi analisada.¹⁹

Análise histomorfométrica das mandíbulas

As hemi-mandíbulas do lado direito obtidas foram fixadas em solução de formol a 10% por 24 horas. Após este período, passaram por lavagem em água corrente por 1 hora e foram imersas em solução de ácido tricloroacético (TCA) 5%, 10°C, por trinta dias. As peças foram avaliadas para verificar o grau de descalcificação esperado, com renovação da solução de TCA a cada cinco dias. Após a descalcificação, os tecidos foram imersos em sulfato de sódio 5% durante aproximadamente duas horas para neutralizar o TCA, lavados em água corrente por duas horas, mantidos em álcool 70% até o processamento histológico para inclusão em parafina (Purified Paraffin, code 1228, lot 1008459, Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil). Os fragmentos das hemimandíbulas foram desidratados em série alcoólica ascendente, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo manual (Olympus, CUT 4055 - Charleston, Carolina do Sul, EUA) para obtenção de secções de 7µm de espessura, que foram montadas em lâminas histológicas e coradas pela técnica Hematoxilina e Eosina (HE).

A análise microscópica dos cortes histológicos obtidos foi realizada por um único examinador treinado através com auxílio de um microscópio de luz transmitida comumente (Leica Microsystems, Switzerland).

Análise histológica e contagem de células

Após a obtenção das lâminas histológicas foi realizada a quantificação de osteoblastos,

osteócitos e osteoclastos presentes em cinco campos consecutivos da crista óssea alveolar vestibular partindo do ponto mais alto da crista. Para a observação foi utilizado o aumento de 100 vezes em imersão no microscópio, sendo feitas duas observações por campo, e então, feita a média dos valores para cada animal e para cada grupo.

A imagem histológica da crista óssea foi capturada por um microscópio acoplado a um computador e através do software LazEz®, foi obtida a medida da distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular e a junção cimento-esmalte. Essa medida foi repetida por 3 dias diferentes e, então, realizada a média entre elas.

Análise da Expressão de IL-17 (ELISA)

Uma porção do tecido gengival ao redor dos dentes, da hemimandíbula do lado esquerdo, submetidos ou não a colocação de ligadura, foi removida e utilizada para análise por Ensaio de Imunoabsorção Acoplado a Enzimas (ELISA) da presença da citocina IL-17. Para a dosagem, foram utilizadas placas previamente sensibilizadas com anticorpos monoclonais (Biosource, INVITROGEN®, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas com os sobrenadantes do tecido gengival ou com diferentes concentrações da citocina IL-17 recombinantes, nas concentrações indicadas pelo fabricante. O anticorpo de detecção conjugado à peroxidase específico da citocina foi adicionado às placas, sendo então, posteriormente ao tempo de incubação, lavadas e a reatividade revelada pela adição da solução de revelação, seguindo as orientações do fabricante. A reação foi bloqueada com solução de parada e a leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas. A concentração da citocina foi calculada utilizando-se a curva de regressão linear, a partir de curva padrão realizada para a respectiva citocina. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Análise histomorfométrica do duodeno

O duodeno localiza-se na primeira porção do intestino delgado, estando diretamente ligado ao piloro do estômago e é responsável pela finalização da absorção de nutrientes.²⁰ A remoção do mesmo foi realizada após eutanásia do animal.

Imediatamente após a coleta do duodeno, as amostras do tecido foram abertas na borda mesentérica e fixadas em Bouin (750 ml de solução saturada de ácido pícrico, 250 ml de formol e 50 ml de ácido acético glacial). A fixação visa interromper o metabolismo celular, estabilizando as estruturas e os componentes bioquímicos intra e extracelulares, preservando e conservando os elementos teciduais, além de permitir a penetração de outras substâncias subsequentes à fixação.²¹ Posterior à fixação, as amostras ainda passaram por desidratação em séries de concentrações crescentes de álcool.

Após a desidratação, removeu-se o álcool utilizando xilol, preparando o tecido para penetração em parafina. Com a parafina previamente aquecida em 60°C, os elementos teciduais da amostra foram infiltrados pela parafina, e, quando em temperatura ambiente, a parafina se solidifica facilitando os cortes histológicos semi-seriados com 6 mm de espessura, os quais foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE).

A análise morfométrica foi realizada por amostragem de imagens capturadas em objetiva de 20X no microscópio óptico Olympus com kit para captura de imagens Axioscop 2 Plus Zeiss. Após a digitalização das imagens, as mesmas foram analisadas com a utilização do programa Sigma-Scan 2.0 e realizou-se a medição da altura das vilosidades através da distância vertical entre a ponta vilosa e o nível de junção vilosidade-cripta de 10 vilosidades em cinco campos diferentes de cada amostra. Posteriormente, também estimou-se a profundidade das criptas intestinais, medindo-se a distância vertical entre a junção vilosidade-cripta e o limite inferior da mesma de 10 criptas em cinco campos diferentes de cada amostra.²²

Análise Estatística

Os resultados foram analisados através do Bioestat[®] - versão 5.3 (Instituto de Desenvolvimento sustentável Mamirauá, Brasil, AM). Em todas as variáveis foi realizado teste de distribuição normal e a variância homogênea. Como a distribuição foi considerada normal e a variância homogênea, utilizou-se os testes paramétricos ANOVA –Onewayseguido por teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

Resultados

Análise de colesterol total e triglicerídeos

Conforme a tabela 1 verificou-se que tanto para dosagem de colesterol total como para dosagem de triglicerídeos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 1 – Valores da dosagem de colesterol e triglicerídeos, respectivamente, em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em mg/dL.

COLESTEROL		TRIGLICERÍDEOS	
GRUPOS	MÉDIAS	GRUPOS	MÉDIAS
GC	203.33 \pm 30.56	GC	210.00 \pm 38.05
DP	224.33 \pm 27.95	DP	227.67 \pm 34.85
PROB	215.67 \pm 22.26	PROB	214.50 \pm 43.00
DPPRO	209.50 \pm 42.56	DPPRO	179.00 \pm 45.90

Dados não significantes estatisticamente ($p > 0,05$) entre os grupos. Teste ANOVA um critério.

Análise radiográfica e histomorfométrica da medida da JCE à crista óssea alveolar

Através das avaliações radiográficas e histomorfométricas descritas na tabela 2, constatou-se que os animais dos grupos DP e DPPRO apresentaram maior perda óssea alveolar quando comparados aos grupos GC e PROB ($p < 0,05$), sendo que no grupo DPPRO a perda óssea foi significativamente menor quando comparado ao grupo DP.

Tabela 2– Medidas da distância da junção cimento-esmalte até a crista alveolar em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em cm.

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA		AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA	
GRUPOS	MÉDIAS	GRUPOS	MÉDIAS
GC	0.28 \pm 0.03 A	GC	0.25 \pm 0.006 A
DP	0.41 \pm 0.06 B	DP	0.61 \pm 0.01 B
PROB	0.27 \pm 0.02 A	PROB	0.28 \pm 0.008 A
DPPRO	0.35 \pm 0.04 C	DPPRO	0.46 \pm 0.007 C

Letras diferentes – Dados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos. Teste. Anova e pós-teste de Tukey.

Análise histomorfométrica para quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos

Conforme a tabela 3, os grupos GC e PROB não obtiveram diferenças significativas, enquanto os grupos DP e DPPRO foram significativamente diferentes do GC e PROB e entre

si($p < 0,05$) na contagem de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. No entanto, o grupo DPPRO apresentou menor atividade osteoclástica em relação ao grupo DP.

Tabela 3- Quantidade de osteócitos, osteoblastos e osteoclastosem todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em unidades.

GRUPOS	OSTEOBLASTOS	OSTEOCLASTOS	OSTEÓCITOS
GC	22.16 \pm 3.18 A	0.83 \pm 0.40 A	135.0 \pm 14.79 A
DP	9.33 \pm 2.58B	4.50 \pm 1.90B	82.66 \pm 7.20B
PROB	21.60 \pm 3.13 A	0.80 \pm 0.44 A	120.80 \pm 14.72A
DPPRO	16.16 \pm 3.92 C	1.83 \pm 0.75C	90.00 \pm 3.52 C

Análise da Expressão de IL-17 (ELISA)

Na tabela 4, foi possível verificar diferença estatisticamente significantes entre os grupos DP e DPPRO ($p < 0,05$) na expressão de IL-17, onde a mesma foi significamente menor no grupo DPPRO.

Tabela 4 – Valores da expressão de IL-17em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão. Os resultados são expressos em pg/mL.

GRUPOS	IL-17
GC	61.97 \pm 8.63 A
DP	96.11 \pm 6.86 B
PROB	71.77 \pm 6.56 A
DPPROB	80.76 \pm 4.36 C

Letras diferentes – Dados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos. Teste Anova e Tukey.

Análise histomorfométrica do duodeno

Através da análise do duodeno, constatou-se que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos em relação à medição das alturas das vilosidades e das cristas, demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 – Medidas das alturas das vilosidades (AV) e das alturas das cristas (AC) em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em cm.

GRUPOS	AV	AC
GC	0.0117 \pm 0.002	0.0100 \pm 0.002
DP	0.0106 \pm 0.001	0.0101 \pm 0.001
PROB	0.0111 \pm 0.002	0.0103 \pm 0.002
DPPROB	0.0119 \pm 0.001	0.0105 \pm 0.001

Dados não significantes estatisticamente ($p > 0,05$) entre os grupos. Teste ANOVA um critério.

Discussão

Os probióticos têm sido introduzidos nos cuidados da saúde periodontal. A razão para isso está relacionada à visão atual da etiologia da inflamação periodontal associada ao biofilme dental. São considerados três fatores etiológicos que podem determinar se um indivíduo desenvolverá periodontite: 1) suscetibilidade do hospedeiro; 2) a presença de espécies patogênicas; e 3) redução ou ausência das chamadas bactérias benéficas. Do ponto de vista teórico, restabelecer o número reduzido de bactérias simbióticas por meio de probióticos pode ser de considerável interesse na prevenção e tratamento da doença periodontal. No entanto, ainda há evidência científica insuficiente para apoiar a eficácia de probióticos no tratamento da doença periodontal.²²

Dois aspectos são importantes neste estudo em relação ao modo de administração do probiótico. O primeiro refere-se ao período experimental estabelecido para administração probiótica. Em alguns estudos, o uso de probióticos foi avaliado em um modelo que apresentava um ambiente microbiano já maduro.^{23,24} De acordo com Teughels et al.²⁵, baseado no uso de antibióticos e anti-sépticos no biofilme, e de acordo com os resultados de Pham et al.²⁶, parece lógico que os probióticos irão atuar para colonizar a cavidade oral e exercer efeitos clínicos benéficos na presença de um biofilme maduro. No presente estudo, a terapia probiótica iniciada junto com a indução da periodontite foi útil no controle do desenvolvimento da periodontite em si, mas não sobre um biofilme maduro especificamente. O segundo aspecto refere-se ao tipo de probiótico utilizado. Neste estudo, o probiótico à base de *Lactobacillus acidophilus* foi efetivo na inibição do desenvolvimento da periodontite através da diminuição da perda óssea no grupo DPPRO, tanto radiográfica quanto histologicamente (Tabela 2), demonstrando também uma efetividade na melhora do padrão ósseo com uma diminuição significativa de osteoclastos e aumento de osteoblastos e osteócitos do grupo DPPRO quando comparado ao grupo DP (Tabela 3). Teughels *et al.* (2011) utilizaram *Lactobacillus reuteri*, enquanto Foureaux et al.¹² fizeram uso de *Bacillus subtilis* e Maekawa e Hajishengallis²⁷ *Lactobacillus brevis* e todos eles também obtiveram resultados que demonstram a eficácia da terapia probiótica sobre a periodontite através da diminuição da perda óssea, apesar de utilizarem metodologias diferentes.

Além disso, devido ao seu potencial de combate contra bactérias patogênicas através do controle da adesão dos mesmos, bem como a produção de substâncias como ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio tóxicos a estes micro-organismos²⁸, muitos estudos buscam compreender precisamente a atuação probiótica. Reddy e Babu²⁹ sugerem em seu estudo que para as espécies probióticas atuarem sobre a doença periodontal, são necessários,

no mínimo, 12 meses. Neste estudo, a administração probiótica se deu por 44 dias, baseado no estudo de Foureaux et al.¹², o qual ressalta em seu estudo que os probióticos administrados por via oral podem produzir benefícios, tanto pela passagem pela a cavidade oral, quanto por modular a imunidade da mucosa oral sistemicamente. Assim também, Maekawa e Hajishengallis²⁷, observaram inibição da inflamação periodontal e da perda óssea e modulação da microbiota oral, de forma a favorecer o crescimento de bactérias aeróbias em detrimento das bactérias anaeróbias que estão fortemente associadas à periodontite. Camundongos com periodontite induzida por ligadura e tratados com *L. brevis* CD2, neste estudo, exibiram expressão significativamente diminuída de todas as citocinas pró-inflamatórias testadas (TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-17A), as quais estão envolvidas na perda óssea periodontal inflamatória. Em conjunto, estes dados mostram que o tratamento tópico com o probiótico de *L. brevis* CD2 inibe a inflamação periodontal e a perda óssea. Esses dados corroboram com os achados do presente estudo, que apresentou uma diminuição estatisticamente significativa de IL-17 no grupo DPPRO quando comparado ao grupo DP (Tabela 4), sugerindo assim, uma inibição da inflamação periodontal.

Vários estudos têm demonstrado o efeito benéfico dos probióticos sobre os lipídeos sanguíneos.³⁰⁻³³ e sobre os triglicerídeos.^{31,33} Porém, nesta pesquisa não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nestes parâmetros (Tabela 1). Portanto, apesar de o uso dos probióticos ter sido recomendado para várias patologias como diabetes, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares, o seu potencial redutor de colesterol e triglicerídeos, deve ser avaliado com mais estudos clínicos para uso com maior propriedade sobre dosagens e assim atingir melhores resultados.³⁴

Por fim, evidências sugerem que o efeito da periodontite pode não se limitar à cavidade oral, mas sim ter consequências sistêmicas. Alterações na morfologia intestinal, como vilosidades mais curtas, têm sido associadas com a presença de toxinas e aumento nas contagens de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal.²² Neste estudo, a análise histomorfométrica do duodeno dos animais não mostrou alterações na altura das vilosidades e na altura das cristas no grupo DP (Tabela 5). Por outro lado, ainda em relação à estrutura intestinal, relata-se um efeito protetor da suplementação com probiótico no jejuno de animais com periodontite induzida por ligadura²², achados estes que também não foram encontrados no presente estudo, onde a utilização do probiótico não teve um efeito protetor nestas estruturas do duodeno quando associado à periodontite experimental (Tabela 5). De fato, há muita heterogeneidade entre os estudos que avaliaram os efeitos dos probióticos,

possivelmente porque diferentes doses, durações de tratamento, espécies bacterianas e formulários de aplicação foram usados, o que pode justificar os resultados deste estudo.²²

Conclusão

A probioticoterapia à base de *Lactobacillus acidophilus* foi efetiva na diminuição da velocidade de progressão da DP induzida, com evidente diminuição da perda óssea alveolar, modulação da inflamação e da histopatologia da crista óssea em dentes de ratos com DP. No entanto, não teve nenhum efeito sobre a morfologia intestinal do duodeno.

Referências bibliográficas

- 1- Ebersole JL, Kirakodo S, Novak MJ, et al. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2014 41 (9): 853-861.
- 2- Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella intermedia* Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. *Plos One* 2015 10 (8):1-13.
- 3- Brasil. Ministério da Saúde. SB Brasil 2010: pesquisa nacional de saúde bucal: resultados principais. Brasília: MS, 2012. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2019.
- 4- Gusmão ES, Santos, RL, Silveira RCJ, Souza, HA. Avaliação Clínica e sistêmica em pacientes em que procuram tratamento periodontal. *Rev. Odonto Ciênc.* 2005 20 (49): 199-203.
- 5- Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 2018 89:173-182.
- 6- Penumarthy S, Penmetsa GS, Mannem S. Assessment of serum levels of triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein in cholesterol in periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol* 2013 17 (1): 30-35.
- 7- Da Costa TA, Silva MJB, Alves PM. Inflammation biomarkers of advanced disease in nongingival tissues of chronic periodontitis patients. *Mediators Inflamm* 2015: 1-10.
- 8- Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. *J Periodontol* 2005 76 (1): 2033-2041.
- 9- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An Effect or CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity* 2006 24:677-688.
- 10- Silva MJB, Sousa LMA, Lara VPL. The Role of iNOS and PHOX in Periapical Bone Resorption. *J Dent Res* 2011 90 (4): 495-500.
- 11- Raff A, Hunt LC. Probiotics for periodontal health: A review of the literature. *J Dent Hyg* 2012 86:71-81.
- 12- Foureaux RC, Messoria MR, Oliveira LFF. Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. *J Periodontol*, 2014 85 (7): 975-983.

- 13- Brasil – Ministério da Saúde. RDC N° 243, DE 26 DE JULHO DE 2018. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_243_2018_.pdf/0e39ed31-1da2-4456-8f4a-afb7a6340c15 Acesso em: 13 de fevereiro de 2019.
- 14- Teughels W, Van Essche M, Sliepen I, Quirynen M. Probiotics and oral healthcare. *Periodontol 2000*. 2008 48: 111-47.
- 15- Bastos EM, Brito F, Silva RM. Probióticos na terapia periodontal. *Rev Bras Odontol* 2012 69 (2): 224-227.
- 16- Marchi L, Palezi SC, Pietta GM. Caracterização e avaliação sensorial do Kefir tradicional e derivados. *Unoesc e Ciência* 2015 15-22.
- 17- Stamatova I, Meurman JH. Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent* 2009 22 (6):329-338.
- 18- Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontol Res* 2009 44 (4): 479-488.
- 19- Nassar CA, Nassar PO, Inagaki NS, Girelli Junior C. Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. *Rev Odonto Unesp* 2003 32 (2): 125-130.
- 20- Junqueira LC, Carneiro J, Abrahamssohn P. Histologia básica: texto e atlas. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.
- 21- Ribeiro CAO, Filho HSR, Grotzner SR. Técnicas e Métodos para utilização prática em microscopia. São Paulo: Santos; 2012.
- 22- Messoria MR, Oliveira LFF, Foureaux RC et al. Probiotic Therapy Reduces Periodontal Tissue Destruction and Improves the Intestinal Morphology in Rats With Ligature-Induced Periodontitis. *J Periodontol* 2013 84 (12):1818-1826.
- 23- Riccia DN, Bizzini F, Perili MG, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis* 2007 13:376-385.
- 24- Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C. Short-term effect of chewinggums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand* 2009 67:19-24.

- 25- Teughels W, Loozen L, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota?. *J Clin Periodontol* 2011 38:159-177.
- 26- Pham LC, Van Spanning RJ, Roling WF. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. *Arch Oral Biol* 2009 54:132-137.
- 27- Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res* 2014 49 (6):785-791.
- 28- Lawande S. Probiotics for Management of Periodontal Disease: A Novel Therapeutic Strategy? *J Pharm* 2012 2 (4):41-46.
- 29- Reddy MS, Babu MN. How beneficial is bacterial prophylaxis to periodontal health?. *J Investig Clin Dent* 2011 2: 95–101.
- 30- Huang Y, Wang J, Cheng Y, Zheng Y. The hypocholesterol effects of *Lactobacillus acidophilus* American Type Culture Collection 4356 in rats are mediated by the down-regulation of Niemann- Pick C1-Like 1. *Br J Nutr* 2010 104 (6):807-812.
- 31- Jeunet J, Kim S, Cho SY, et al. Hypocholesterol effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition* 2010 26 (3): 321-330.
- 32- Wang J, Zhang H, Chen X, Chen Y, Menghebilige, Bao Q. Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *J Dairy Sci* 2012 95 (4):1645-1654.
- 33- Awaisheh SS, Khalifeh MS, Al-Ruwaili MA, Khalil OM, Al-Ameri OH, Al-Noivo R. Effect of supplementation of probiotics and phytosterols alone or in combination on serum and hepatic lipid profiles and thyroid hormones of hypercholesterolemia rats. *J Dairy Sci* 2013 96 (1): 9-15.
- 34- Modanêsi PVG, Mercer NS, Bernardi JFB. Efeitos do uso de probióticos na hipercolesterolemia. *Rev Pesq Saude* 2016 17 (1): 47-50.

ANEXOS



Autorização

O protocolo intitulado "Avaliação do efeito da terapia com probiótico nos tecidos periodontais de ratos com periodontite induzida por ligadura", sob a responsabilidade de **Patrícia Oehlmeyer Nassar** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 09/06/2017.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2017-31/03/2019
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
N. de animais	32
Peso/idade	100g a 200g/Adultos
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Central do UNIOESTE

Cascavel, 14/06/2017


 Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
 Coordenadora do CEUA
 Portaria nº 3730/2016 - GRE