

ANDRÉ LUIZ AMORIM DA COSTA

**ESTUDO DO EFEITO DO PROBIÓTICO KEFIR NO
TRATAMENTO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2019**

Trabalho realizado no Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, da Faculdade de Farmácia, UFRJ, sob a orientação da Professora Ana Luisa Palhares de Miranda, no Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob orientação do Professor Leandro Araújo Lobo, sob co-orientação de Mariana Alves Soares.

CIP - Catalogação na Publicação

C837e Costa, André Luiz Amorim da
Estudo do efeito do probiótico kefir no
tratamento da periodontite experimental em
camundongos / André Luiz Amorim da Costa. -- Rio de
Janeiro, 2019.
45 f.

Orientadora: Ana Luisa Palhares de Miranda.
Coorientadora: Leandro Araújo Lobo.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. Periodontite. 2. Kefir. 3. Perda Óssea. 4.
Probióticos Oraís. I. Miranda, Ana Luisa Palhares
de, orient. II. Lobo, Leandro Araújo, coorient.
III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: André Luiz Amorim da Costa
 DRE: 116025328

BANCA EXAMINADORA: Prof. Marco Antônio Lemos Miguel (Presidente)
 Dr^a Talita Gomes Baeta Lourenço
 Dr^a. Natália Linhares Coutinho Silva
 Prof^a. Karla Rodrigues Miranda (Suplente)

**Título da Monografia: "Estudo do efeito do probiótico kefir no tratamento da
 periodontite experimental em camundongos"**

Local: Sala de reunião do Departamento de Microbiologia Médica/ IMPPG / CCS / UFRJ
Data e hora de início: 13 de dezembro de 2019 às 9:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2019.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora:

Marco Antonio Lemos Miguel
 Prof. Marco Antônio Lemos Miguel

Talita Gomes Baeta Lourenço
 Dr^a Talita Gomes Baeta Lourenço

Natália Linhares Coutinho Silva
 Dr^a. Natália Linhares Coutinho Silva

Prof. Karla Rodrigues Miranda
 Prof^a. Karla Rodrigues Miranda

Aluno:

André Luiz Amorim da Costa
 André Luiz Amorim da Costa

Orientador:

Ana Luisa Palhares de Miranda e Prof. Leandro Araújo Lobo
 Profa. Ana Luisa Palhares de Miranda e Prof. Leandro Araújo Lobo

Coorientador:

MSc. Mariana Alves Soares
 MSc. Mariana Alves Soares

Coordenador
 de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãs, e amigos que tanto me apoiaram nesta empreitada seja direta ou indiretamente. Amo vocês.

Aos meus sobrinhos: Jullya, Arthur, Davi, Bryan, Gabriel, Wendel e Maria Clara. Espero poder me orgulhar de vocês no futuro por terem tomado as decisões certas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem a força e graça que me foi concedida ao longo desses anos eu não estaria aqui.

Aos meus orientadores Prof. Dra. Ana Luisa Palhares de Miranda e Prof. Dr. Leandro Araújo Lobo, pela confiança, companheirismo, pelas correções e auxílio durante todo este estudo. Não é que essa união inesperada entre áreas distintas deu certo?

A minha co-orientadora Mariana Alves Soares, uma pessoa que foi fundamental durante toda a minha trajetória como aluno de Iniciação Científica, quem me treinou, ensinou, corrigiu, apoiou em todos os momentos, quem me ouve e dá confiança para meus devaneios científicos. Definitivamente este trabalho não seria o mesmo sem a sua participação, sinta-se orgulhosa. Serei eternamente grato!

A colaboradora Mariana Oliveira, pela ajuda na execução dos experimentos com Kefir, por todas as conversas e suporte inesgotáveis.

Ao Professor Jorge Tributino por toda ajuda com quantificação de perda óssea, cálculo amostral, pelos bons papos científicos e não científicos rs.

Ao meu amigo de graduação e roommate Matheus Leal, obrigado por me aturar todo esse tempo com minhas manias e surtos dentro de casa, meu mau humor matinal que você ignorava totalmente e dava bom dia, por me apoiar ao longo dos desafios da graduação e acreditar no meu potencial muitas vezes mais do que eu. Serei eternamente grato!

As minhas amigas de graduação Giovana Angelice, Mariana Alvim e Thalia Braz, que me deram suporte em tudo que precisei. Sem vocês, isso aqui seria muito pior. Obrigado por tudo!

Aos meus amigos de laboratório por nossos papos de cunho científico (ou não rs). À pós doutoranda Bruna Lima Roedel, por todo suporte intelectual, físico e emocional na dosagem de TNF, obrigado por sempre ser centrada e me ajudar raciocinando da forma mais coerente possível (e pelos memes e favores não científicos também). À doutoranda Daiane Matias por toda ajuda em diversas etapas do trabalho, em especial pela histologia. À doutoranda Fabiana Chaves, pelas discussões e amizade. À mestranda Kamila pelas caronas e conversas de incentivo. Ao mestrando Vinícius Alves, por todas as conversas e ajuda mesmo em outro laboratório. Às alunas de IC Vanessa Domitila e Aline França, obrigado por não desapontar nunca o movimento “ICs com chave”. Vocês sempre foram ótimas comigo!

Às famílias LEFEx e Anaeróbios, toda minha gratidão pela recepção e ajuda!

Aos professores Fernanda Abreu, Tatiana Pinto, Rosana Ferreira, Ana Paula Colombo, Lígia Peçanha, Marco Miguel, Eliane Ferreira (Lili), Regina Domingues, Suzanne Nunes, Gabriella Mendes, Karla Miranda e Luciana Costa, vocês de alguma forma contribuíram para o profissional que eu sou hoje, mesmo sem perceber. Desejo todo sucesso do mundo a vocês!

Aos meus amigos de ensino médio e pré-vestibular Adrielly Gomes, Angela Paula, Carine Pereira, Arielen Moraes, Letícia Colla, Letícia Galvão, Diogo Alves, Monique Agnes, Dandara Freitas, Ana Beatriz, Jessica Constermani, Graciane Souto, Thaynara Cristine, Alexia Teixeira por entender todas as vezes que eu furei com vocês por motivos de faculdade.

A minha querida aluna Alyne Nunes, por toda força que injetou em mim mesmo sem perceber, você com certeza contribuiu para que eu me aprimorasse como professor.

Às minhas queridas e eternas professoras de biologia do Pré Vestibular Comunitário São José Dayana Franco, Tamiris Lameira e Julia Dionísio. Não tenho palavras para expressar toda gratidão que tenho por todas vocês. Se eu hoje estou me formando como professor de biologia, é culpa de vocês!!!! Todo meu amor e gratidão sempre!!!

A família PVC, pela formação humana que tive desde 2015 e pela oportunidade de crescer como ser humano enquanto desenvolvo um trabalho voluntário. Soco no sistema!

Aos meus pais André Costa e Mari Amorim pela vida, suporte e amor. Sem vocês eu não estaria aqui sendo o primeiro da família a estudar numa federal.

As minhas irmãs Anny, Daiane, Viviane, Rayane, Taiane, Tatiana, Thais e Tássia por todo amor que nos envolve e que me manteve de pé ao longo desses anos.

Às pastoras Marinete e Fabiane por todo suporte e compreensão todas as vezes que eu não pude estar presente por motivos de faculdade. Muito amor pela família IEQ Avenida Ladário.

Aos meus amigos Beatriz Silva e Macson Marques por toda ajuda e companheirismo, vocês foram fundamentais!

Ao Professor José Garcia Junior (ICB/UFRJ) pelo uso do estéreo-microscópio para captura das imagens das mandíbulas.

Aos Prof. Robson Coutinho Silva (Laboratório de Imunofisiologia, IBCCF, UFRJ) pelo uso do micrótomo e câmera para corte das amostras e captura das imagens de histologia, respectivamente.

A Professora Ana Carolina Oliveira do IBCCF pela dosagem de citocinas no plasma e tratamento dos dados.

A minha dentista Dra. Julia Joaquim, quem me acompanhou desde o início nesta trajetória e sempre foi compreensiva com meus sumiços.

A Unidade Multiusuária de Histotécnicas do ICB, pela preparação e processamento das amostras.

A banca examinadora pelo aceite do convite.

Aos órgãos de fomento: CAPES, FAPERJ e CNPq.

*“Eu tive meus altos e baixos, mas sempre encontro a força interior para me levantar. Eu fui
servido com limões, então fiz uma limonada”
Hattie White*

RESUMO

ANDRÉ LUIZ AMORIM DA COSTA

ESTUDO DO EFEITO DO PROBIÓTICO KEFIR NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Orientadores: Ana Luisa Palhares de Miranda e Leandro Araújo Lobo
Co-orientadora: Mariana Alves Soares

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A Doença Periodontal (DP) é uma infecção polimicrobiana de condição inflamatória que acomete as estruturas de suporte dos dentes, o periodonto. É desencadeada por uma disbiose na população microbiana subgingival que resulta numa resposta imune inflamatória exacerbada e destruição de estruturas periodontais, como o ligamento periodontal e aumento da perda óssea alveolar (POA). Mudanças na microbiota podem reverter o desequilíbrio e o estado inflamatório, por exemplo, pelo uso de probióticos, que são microrganismos vivos benéficos para humanos e animais e utilizados na terapia contra cárie, doença periodontal e halitose. Dentre esses, temos o Kefir, uma bebida fermentada do leite, produzida por uma colônia de microrganismos, bactérias ácido-láticas e leveduras, embebida em uma matriz polissacarídica e proteica. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do kefir no tratamento da perda óssea, parâmetros histopatológicos e metabólicos em modelo de periodontite experimental induzida por ligadura bilateral em camundongos *Swiss*. A DP é induzida pela ligadura bilateral dos primeiros molares mandibulares com fio de seda, promovendo a proliferação dos periodontopatógenos e a resposta inflamatória. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas, divididos em 4 grupos: 1) DP; 2) SHAM; 3) DP + Veículo; 4) DP + Kefir ao longo de 20 dias (n=6). A partir da indução da doença no 5º dia, apenas os grupos 3 e 4 continuaram recebendo o Veículo e Kefir até o 20º dia de experimento, respectivamente. As hemimandíbulas direita e esquerda foram coletadas para análise macroscópica da POA e histologia, respectivamente. O plasma foi coletado para dosagem da citocina TNF. Foi realizada quantificação de colesterol total, de glicemia aleatória e teste de tolerância à glicose (TTG). O grupo tratado com Kefir mostrou diferença em relação ao grupo DP ($0,238 \pm 0,028$ vs $0,368 \pm 0,025$ mm, respectivamente) e não mostrou diferença significativa em relação ao grupo SHAM ($0,238 \pm 0,028$ vs $0,192 \pm 0,015$ mm, respectivamente). Na histologia, a região de furca do corte do grupo tratado com kefir apresentou menor infiltrado de células, porém sem alteração da organização das fibras do estroma, com semelhança ao observado no corte do grupo SHAM. Em relação ao ganho de peso, tolerância à glicose, colesterol e glicemia, não foi detectada diferença significativa. Portanto, o Kefir protegeu os animais da perda óssea alveolar e da destruição tecidual quando submetidos à periodontite em relação ao grupo com DP sem tratamento. Sendo considerado um bom candidato para compor a lista de probióticos orais para terapia periodontal.

Palavras-chave: periodontite experimental; kefir; probióticos; perda óssea.

ABSTRACT

ANDRÉ LUIZ AMORIM DA COSTA

ESTUDO DO EFEITO DO PROBIÓTICO KEFIR NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Orientadores: Ana Luisa Palhares de Miranda e Leandro Araújo Lobo

Co-orientadora: Mariana Alves Soares

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Periodontal Disease (PD) is an inflammatory polymicrobial infection that affects the support structures of the teeth, the periodontium. It is triggered by a dysbiosis in the subgingival microbial population that results in an exacerbated inflammatory immune response and destruction of periodontal structures such as the periodontal ligament and increased alveolar bone loss (ABL). Changes in microbiota can reverse imbalance and inflammatory status, for example by the use of probiotics, which are beneficial living organisms for humans and animals and used in therapy against caries, periodontal disease and halitosis. Among these are Kefir, a fermented milk drink produced by a colony of microorganisms, lactic acid bacteria and yeasts, embedded in a polysaccharide and protein matrix. The aim of the study was to evaluate the effect of kefir in the treatment of bone loss, histopathological and metabolic parameters in a model of bilateral ligature-induced experimental periodontitis in *Swiss* mice lineage. PD is induced by bilateral ligature of the first mandibular molars with silk thread, promoting the proliferation of periodontopathogens and the inflammatory response. Male and female *Swiss* mice were divided into 4 groups: 1) DP; 2) SHAM; 3) DP + Vehicle; 4) DP + Kefir over 20 days (n = 6). From disease induction on day 5, only groups 3 and 4 continued to receive Vehicle and Kefir until the 20th day of the experiment, respectively. The right and left hemimandibles were collected for macroscopic analysis of POA and histology, respectively. Plasma was collected for TNF cytokine dosage. Total cholesterol, random blood glucose quantification, and glucose tolerance test (GTT) were performed. The Kefir-treated group showed a difference from the DP group (0.238 ± 0.028 vs 0.368 ± 0.025 mm, respectively) and showed no significant difference from the SHAM group (0.238 ± 0.028 vs 0.192 ± 0.015 mm, respectively). In the histology, the furcation region of the kefir-treated group showed less cell infiltration, but without alteration of the stroma fibers organization, similar to the one observed in the SHAM group. Regarding weight gain, tolerance to glucose, cholesterol and glycemia, no significant difference was detected. Therefore, Kefir protected the animals from alveolar bone loss and tissue destruction when subjected to periodontitis compared to the untreated DP group. Being considered a good candidate to enter the list of oral probiotics for periodontal therapy.

Key-words: experimental periodontitis; kefir; probiotics; alveolar bone loss.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças Periodontais	1
1.1.1. Complexos Microbianos do biofilme dental	2
1.1.2. Fisiopatologia da periodontite	4
1.1.3. Impacto das Doenças Periodontais	6
1.2 Doenças Periodontais e Doenças Sistêmicas	7
1.3 Tratamento e Prevenção da Periodontite	9
1.3.1. Terapia Periodontal Não-cirúrgica	9
1.3.2. Terapia Periodontal Cirúrgica	10
1.3.3. Prevenção	11
1.4 Probióticos e Periodontite.....	12
1.5 Kefir	13
1.5.1. Microrganismos dos grãos.....	13
1.5.2. Composição de Características dos grãos	14
1.5.3. Benefícios do Kefir	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Animais	21
4.2 Indução da periodontite experimental pela ligadura	21
4.3. Ativação e preparo do Kefir	22
4.4. Grupos experimentais	22
4.5. Avaliação dos parâmetros metabólicos e nutricionais	23
4.5.1. Peso corporal	23
4.5.2. Colesterol total	23
4.5.3. Glicemia aleatória	23
4.5.4. Teste de Tolerância à Glicose	23
4.6. Quantificação de TNF no plasma	24
4.7. Análise da Perda Óssea Alveolar (POA)	24
4.8. Análise histológica do periodonto	25
4.9. Análises estatísticas	25
5 RESULTADOS	27
5.1 Avaliação do ganho de peso	27
5.2 Glicemia aleatória	28
5.3. Análise de Perda Óssea Alveolar	28
5.4. Análise histológica do periodonto	30
5.5. Colesterol Total	32
5.6. Teste de Tolerância à Glicose	32
5.7. Quantificação de TNF no plasma	33
6. DISCUSSÃO	34

7. CONCLUSOES	39
8. REFERENCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS PERIODONTAIS

As doenças periodontais são condições de caráter crônico inflamatórias que acometem os tecidos de suporte dos dentes (gingiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar) coletivamente identificados como periodonto. Esta inflamação periodontal tem por um dos estímulos a disbiose do biofilme dental, composto por complexos de microrganismos envolvidos tanto na saúde quanto na doença oral (Haffajee e Socransky, 2005). De acordo com o *World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions*, ocorrido em novembro de 2017 em Chicago (EUA), as doenças periodontais foram classificadas em três grupos, dependendo da integridade do periodonto, do grau de sangramento à sondagem, da profundidade da bolsa periodontal ou do grau de perda de inserção clínica (Quadro 1).

CONDIÇÕES E DOENÇAS PERIODONTAIS										
Saúde Periodontal, Condições e Doenças Gingivais			Periodontite			Outras Condições que Afetam o Periodonto				
Saúde Periodontal e Saúde Gingival	Gingivite: induzida pelo biofilme dental	Doenças Gingivais: Não induzidas pelo biofilme dental	Doenças Periodontais Necrosantes	Periodontite	Periodontite como uma manifestação de doenças sistêmicas	Doenças sistêmicas ou condições que afetam os tecidos de suporte dos dentes	Abscessos periodontais Lesões Endoperiodontais	Deformidades e Condições Mucogingivais	Forças Oclusais Traumáticas	Fatores relacionados ao dente e às próteses

Quadro 1. Classificação das doenças periodontais segundo o 2018 Classification of Periodontal and Periimplantar Diseases and Conditions: a Practical Guide and Key Points. (Adaptado de Caton *et al.*, 2018).

A gengivite é uma inflamação local da gengiva iniciada pelas bactérias do biofilme dental, reversível, caracterizada por coloração avermelhada, edema e sangramento gengival à sondagem ou mesmo durante a escovação. Com ausência de tratamento, a gengivite pode progredir para periodontite (Figura 1), caracterizada pela perda óssea gradual e surgimento de uma bolsa periodontal devido à destruição dos ligamentos periodontais. (Kinane *et al*, 2017). A periodontite representa a principal causa da perda dentária em adultos em todo o globo (Listl *et al*, 2015).

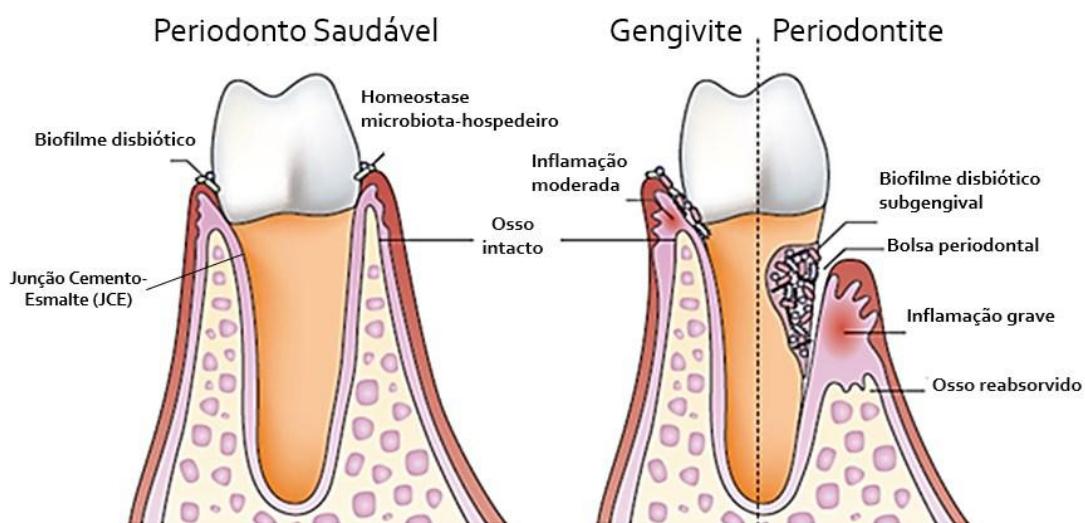


Figura 1. Representação de um periodonto saudável com biofilme simbiótico e sua progressão para biofilme disbiótico, caracterizando a gengivite e, posteriormente, periodontite. (Adaptado de Hajishengallis, 2015).

A perda dos tecidos do periodonto é avaliada medindo-se a profundidade das bolsas periodontais (distância compreendida entre a margem gengival e o fundo da bolsa periodontal) e dos níveis clínicos de inserção (distância entre a Junção Cimento-Esmalte [JCE] e o fundo da bolsa periodontal), realizadas com a sonda periodontal milimetrada ao redor do dente em vários sítios. Tradicionalmente, o diagnóstico da presença de doenças periodontais é feito com base na avaliação de sinais e sintomas clínicos e pode ser apoiado por evidências radiográficas. Os sinais clínicos envolvem a observação de sangramento à sondagem (índice de sangramento do sulco gengival), inspeção visual de cor, textura e edema da gengiva (índice gengival) e presença de placa bacteriana na superfície dental (índice de placa) (Highfield, 2009).

1.1.1. COMPLEXOS MICROBIANOS DO BIOFILME DENTAL

A técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi desenvolvida com o principal objetivo de realizar a detecção de diversas espécies de bactérias orais a partir de uma mesma amostra, considerado um fator limitante para muitos estudos. Nesta técnica, utilizam-se sondas múltiplas (aproximadamente para 40 espécies orais) aplicadas sobre câmaras contendo as variadas amostras previamente fixadas numa membrana de nylon medindo 15 cm², tais sondas são marcadas com moléculas que, posteriormente, permitem sua revelação. A maior vantagem do método é que as amostras clínicas podem ser analisadas sem a necessidade de um passo anterior de cultivo de bactérias (Socransky e Haffajee, 1994; Paster *et al*, 1998; Heller *et al*, 2011).

Com uso desta técnica, Socransky e colaboradores realizaram um estudo das associações entre 40 espécies bacterianas presentes no biofilme subgengival de pacientes saudáveis e com periodontite (Socransky *et al*, 1998). A partir dos resultados, foram construídos padrões de colonização baseados na análise de *cluster* (agrupamentos), divididos num sistema codificado por cores diferentes e relacionados com parâmetros clínicos de doença periodontal. Posteriormente, Socransky e Haffajee adaptaram o diagrama construído anteriormente para uma pirâmide, na qual os complexos da base são azul, roxo, verde e amarelo; o intermediário é o laranja e no topo o complexo vermelho (Socransky e Haffajee, 2002) (figura 2).

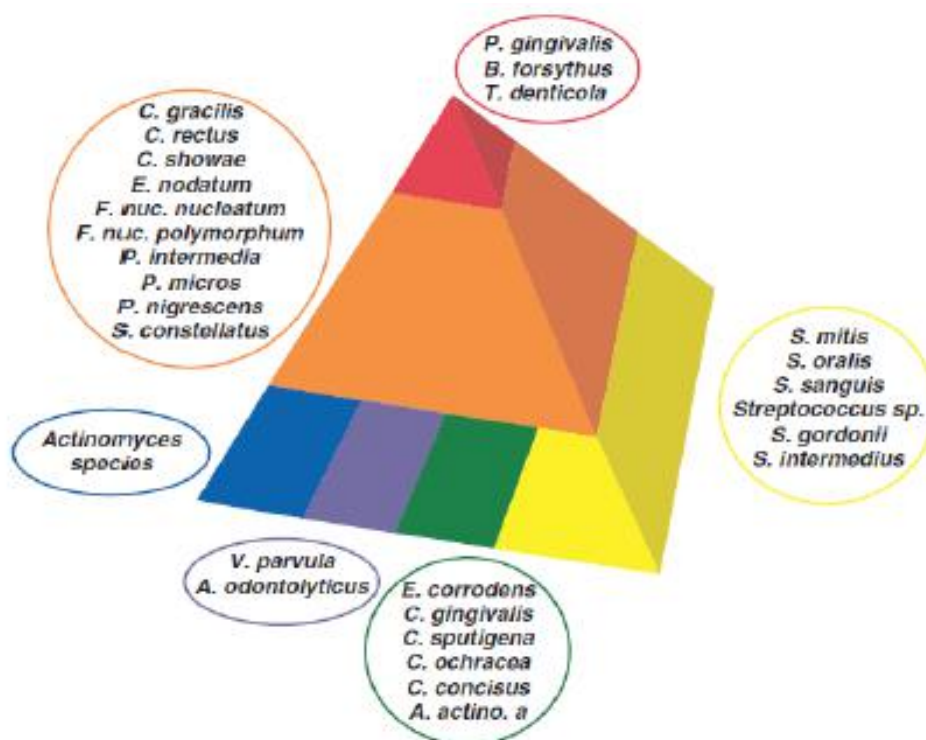


Figura 2. Pirâmide de associação de espécies no biofilme subgengival. (Socransky e Haffajee, 2002).

O complexo vermelho é formado pelas bactérias Gram-negativas *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (anteriormente denominada *Bacteroides forsythus*) e *Treponema denticola* e o aumento dos níveis dessas bactérias na bolsa periodontal apresentou correlação com a maior profundidade da bolsa. Os autores mostraram que sítios com nenhuma destas espécies obtiveram média de profundidade de bolsa mais rasa, enquanto os sítios contendo as 3 espécies apresentaram bolsas mais profundas (>5 mm). O complexo laranja inclui as subespécies de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra* (anteriormente denominada *Peptostreptococcus micros*), *Campylobacter rectus*, *Campylobacter*

showae e *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*; todas as espécies deste complexo mostraram associação significativa com o aumento da profundidade das bolsas. As três espécies de *Capnocytophaga* (*C. gingivalis*, *C. sputigena* e *C. ochracea*), *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo A formam o complexo verde; o complexo amarelo é formado por *Streptococcus* (como *S. mitis*, *S. sanguinis* e *S. oralis*). *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula* formam o complexo roxo; espécies de *Actinomyces* formam o complexo azul. Em relação aos parâmetros clínicos, os complexos amarelo e verde estão associados com bolsas rasas (com profundidade < 3 mm) (Socransky *et al*, 1998; Socransky e Haffajee, 2002).

As espécies que possuem capacidade de colonizar a superfície do dente e de se proliferar no estágio primário do desenvolvimento do biofilme compõem a base da pirâmide. Após esta colonização, o complexo laranja se torna numericamente mais dominante e funciona como ponte entre os colonizadores primários e o complexo vermelho que, por sua vez, se torna numericamente predominante nos estágios tardios do desenvolvimento do biofilme.

As conclusões alcançadas sobre a ecologia do biofilme subgingival mostram que, para que haja o estabelecimento de um biofilme periodontopatogênico, é necessária a colonização das espécies que compõem os complexos azul, roxo, verde e amarelo, as quais conferem ao habitat condições favoráveis à colonização das espécies do complexo laranja que, por sua vez, se estabelecem permitindo a colonização tardia do complexo vermelho. Desta forma, é evidente que os membros do complexo vermelho raramente sejam encontrados na ausência de membros do complexo laranja. Tomados em conjunto, os dados do estudo sugerem que as espécies no complexo laranja precedem a colonização por espécies do complexo vermelho (Socransky e Haffajee, 2005).

1.1.2. FISIOPATOLOGIA DA PERIODONTITE

Na década de 70, em um estudo sobre a etiologia das doenças periodontais, Socransky concluiu que a maioria das formas de doenças periodontais em humanos são de etiologia bacteriana, em animais existem evidências de transmissibilidade dos agentes, mas que isso não é reproduzido em humanos (Socransky, 1970). Mais de um tipo de microrganismo da cérvice gengival podem iniciar uma destruição periodontal em modelos animais experimentais, a habilidade desses organismos formarem biofilme

parece ser um pré-requisito para a iniciação desta destruição e o mecanismo pelo qual esses microrganismos levam à destruição era, até então, desconhecido. Provavelmente esses mecanismos poderiam envolver a produção de enzimas líticas, metabólitos citotóxicos ou uma inflamação crônica (Socransky, 1970).

A destruição periodontal ocorre tanto pela ação dos fatores de virulência produzidos pelas bactérias que aumentam seu crescimento no biofilme subgingival (como LPS, fimbrias e DNA bacteriano) sobre os tecidos periodontais, quanto pela ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, que se encarregam da produção e secreção de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (EROs). As endotoxinas foram os primeiros produtos bacterianos a serem associados com a reabsorção óssea. Além disso, elas também inibem a formação e a síntese da matriz óssea. Indiretamente as bactérias estimulam o recrutamento dos neutrófilos e estes, ao liberarem o conteúdo de seus grânulos para o meio extracelular (degranulação), liberam uma série de enzimas que degradam os tecidos contribuindo para a destruição tecidual (Meyle e Chapple, 2015).

Sendo o biofilme disbiótico um estímulo, ocorre recrutamento tanto de células da imunidade inata quanto adaptativa. Os mediadores inflamatórios produzidos por estas participam da lista dos marcadores da doença, como as interleucinas IL-6, IL-1 β e IL-17 (Dutzan *et al*, 2018). Estes mediadores, então, promovem a liberação de metaloproteinases da matriz (MMP) pelas células residentes do periodonto, causando destruição da matriz extracelular (Sorsa *et al*, 2006). O ambiente inflamatório promove o desbalanço do metabolismo ósseo, ou seja, mais macrófagos se diferenciam em osteoclastos para realizar reabsorção óssea enquanto a taxa de deposição de matriz calcificada pelos osteoblastos não se altera. A consequência disso é o aumento da porosidade do osso (Kornman e Page, 1997). Estes eventos são refletidos nos sinais clássicos da periodontite: edema gengival, perda de inserção clínica e perda óssea.

O biofilme disbiótico, portanto, é um pré-requisito necessário para o desenvolvimento da periodontite, mas sozinho ele é insuficiente para causar a doença. Esta, por sua vez, resulta de interações complexas entre o biofilme e a imunidade do hospedeiro, responsável pela destruição tecidual. Outros mediadores que participam da patogênese da periodontite incluem as citocinas produzidas por linfócitos presentes na resposta tardia, bem como os mediadores lipídicos, principalmente Prostaglandina E₂ (PGE₂), derivada do ácido araquidônico (Meyle e Chapple, 2015).

As bactérias periodontopatogênicas desenvolveram mecanismos moleculares de subversão da resposta imune do hospedeiro, como, por exemplo, podem proteger a si e às células vizinhas da opsonofagocitose e morte mediadas pelo complemento através da produção de enzimas que atuam na degradação de C3 ou de moléculas chave a montante desta sinalização. Essas proteases bacterianas envolvidas, como as gingipaínas, karilisininas e interpaína A, são expressas por *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. intermedia*, respectivamente. *P. intermedia* e *T. denticola* também podem escapar da morte mediada pelo complemento humano capturando o fator de complemento H, que é um inibidor fisiológico do complemento (Hajishengallis, 2015).

Acrescidos aos fatores inerentes ao hospedeiro e ao biofilme, estão os fatores genéticos, envolvidos em pré-disposições hereditárias ou em deficiências de algum mecanismo imunológico que facilite a exacerbação da resposta imune ou, ainda, polimorfismos em genes envolvidos no combate efetivo do patógeno, dificultando sua ação (Borrell e Papapanou, 2005). Além disso, interferências ambientais, sociais e comportamentais são comprovadamente importantes no estabelecimento da periodontite. Camargo e colaboradores mostraram num estudo com 45 pacientes fumantes e não-fumantes que aqueles que fumam levemente ou cronicamente possuem níveis de Prostaglandina E₂ (PGE₂) mais altos do que os não-fumantes no FCG (Camargo *et al*, 2016).

1.1.3. IMPACTO DAS DOENÇAS PERIODONTAIS

A incidência global de doenças periodontais permanece alta e tende a sofrer aumentos devido aos fatores de risco e envelhecimento da população, Sendo assim, a morbidade associada, os custos e o impacto socioeconômico continuarão a aumentar. O recente *Global Burden of Disease Study* (GBD, 1990-2010) indica que: i) periodontite é a 6ª doença mais prevalente em todo o mundo, com uma prevalência geral de 11,2% e cerca de 743 milhões de pessoas afetadas, e ii) a incidência global de doença periodontal aumentou em 57,3% de 1990 a 2010 (Tonetti *et al*, 2017).

A qualidade de vida dos indivíduos é grandemente afetada pela periodontite. Uma vez que o ligamento periodontal é progressivamente destruído, ocorre migração e hiper mobilidade dos dentes, culminando na sua perda e consequente disfunção mastigatória nos casos mais graves, comprometendo a nutrição e a saúde (Buset *et al*, 2016) No entanto, os estágios iniciais da doença periodontal são frequentemente sem

sintomas, e um número significativo de pacientes não procura atendimento profissional. A natureza relativamente silenciosa dos estágios iniciais da doença, combinada com a baixa conscientização da saúde, leva muitos pacientes a buscarem o cuidado sintomático como terapia para quadros avançados quando disponível e acessível (Marcenes *et al*, 2013; Kassebaum *et al*, 2014; Romano *et al*, 2019).

1.2. DOENÇAS PERIODONTAIS E DOENÇAS SISTÊMICAS

Vários estudos correlacionam doenças periodontais com outras doenças sistêmicas, tais como doenças cardiovasculares e artrite reumatoide (Hajishengallis, 2015). Em relação às doenças cardiovasculares, análises histopatológicas do endotélio aórtico mostraram a presença de *Porphyromonas gingivalis* e o desenvolvimento mais rápido de aterosclerose em coelhos (Hasturk e Kantarci, 2015). Na artrite reumatoide, por sua vez, sabe-se que a *Porphyromonas gingivalis* é responsável pela produção de proteínas citrulinadas capazes de induzir produção de autoanticorpos contra peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) (Trigueirinho *et al*, 2007).

Outra doença que é amplamente conhecida por sua correlação com a periodontite é a Diabetes Mellitus (DM). A DM é uma doença de grande impacto mundial, sendo caracterizada por um desbalanço metabólico ou autoimune que resulta na alta concentração de glicose no sangue do indivíduo. Com o tempo, a partir da glicosilação não enzimática das moléculas dos tecidos do paciente, ocorre a formação de produtos de glicosilação avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation End-products*). Wu e colaboradores demonstraram que esses produtos possuem receptores nas células da imunidade inata presentes no periodonto (RAGEs). Isso pode estar relacionado com o aumento da resposta inflamatória existente no tecido e, conseqüentemente, da destruição do tecido periodontal e perda dentária (Wu *et al*, 2015; Muhammad, 2017).

Além disso, o mecanismo compartilhado entre periodontite e diabetes é a resposta inflamatória não resolvida, que promove aumento dos marcadores de estresse oxidativo e de fase aguda, permitindo a entrada de periodontopatógenos na corrente sanguínea e aumentando a plausibilidade do impacto da periodontite na diabetes (Chapple e Genco, 2013). Miranda e colaboradores demonstraram que pacientes com mau controle glicêmico tinham maior frequência de patógenos periodontais na bolsa subgingival, principalmente *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Eubacterium nodatum*, *Parvimonas micra* e *Fusobacterium nucleatum* (Miranda *et al*, 2017). A quebra de

homeostase local não pode ser vista como um evento isolado e tendo impacto limitado, uma vez que todo o corpo humano é considerado uma só entidade. Portanto, as condições sistêmicas de fato influenciam no desencadeamento de doenças em tecidos específicos e vice-versa (Hasturk e Kantarci, 2015).

A cavidade oral, como segundo sítio com o microbioma mais diverso do corpo, possui na composição de sua microbiota microrganismos comensais com eterno potencial de se tornarem patogênicos (Avila, Ojcius e Yilmaz, 2009). Com isso, esta interação patógeno-hospedeiro, bem como a resposta originada desta interação tem evoluído com mecanismos diferentes dos observados em outros órgãos. As células imunes presentes no periodonto, desafiadas pelos microrganismos do biofilme dental, são transportadas pela circulação para diferentes órgãos e de alguma forma transmitem essa resposta imune para outros sistemas. Algumas evidências foram reunidas para tentar justificar esta hipótese, como o papel das células dendríticas (CD) de apresentadoras de antígenos profissionais que possivelmente translocam bactérias e seus fatores de virulência (Hasturk e Kantarci, 2015). Existem três possíveis mecanismos propostos para explicar de que forma as condições inflamatórias locais atingem outros órgãos:

- **Bacteremia:** O sangramento durante um processo patológico ou como um efeito normal frente a procedimentos periodontais (sondagem ou raspagem), escovação e limpeza podem servir como porta de entrada das comunidades ou espécies únicas de microrganismos orais na corrente sanguínea, levando a princípio ao quadro de bacteremia. Os dados sobre a quantidade de bactérias que entram na corrente sanguínea ainda são conflitantes, bem como não se sabe quantas são necessárias para causar uma infecção em um sítio extra oral ou quais órgãos são mais suscetíveis a essas bactérias e o porquê disso. É sabido, porém, que o sistema imune é capaz de resolver com eficiência tal infecção e que para a ocorrência de alguma doença inflamatória causada por bactérias migrantes da boca é necessária, como pré-requisito, uma resposta imune ineficiente e defectiva. Em 2005, ao apresentar uma modificação dos postulados de Koch para o caso das espécies periodontais, Socransky sugeriu que os fatores de virulência das bactérias, como LPS, podem ser transportados pela circulação a partir da microbiota. Isso poderia explicar como as comunidades bacterianas do

biofilme periodontal podem impactar condições sistêmicas via circulação (Socransky e Haffajee, 2005; Hasturk e Kantarci, 2015).

- **Inflamação Metastática:** Uma vez que a periodontite, como doença inflamatória, compartilha vias mecânicas de sinalização com outras condições inflamatórias, a bacteremia periodontal pode desencadear uma inflamação metastática, ou seja, ativação de resposta imune aguda no fígado e dos leucócitos do sangue periférico que, por sua vez, liberam espécies reativas de oxigênio e outros mediadores inflamatórios na circulação, desencadeando condições inflamatórias em sítios extra orais (Chaple e Wilson, 2014). Os dados que suportam essa hipótese incluem estudos epidemiológicos, clínicos, *in vivo* e *in vitro* (Sanz e Kornman, 2013; Tonetti e Van Dyke, 2013; Payne *et al*, 2015).

- **Perturbação do Microbioma Intestinal:** Outro mecanismo possível que liga a periodontite e as doenças inflamatórias sistêmicas seria através de uma perturbação do microbioma intestinal através da deglutição de altas doses de periodontopatógenos a longo prazo. Com base nessa hipótese, indivíduos com doenças periodontais crônicas acabariam por estabelecer um microbioma intestinal perturbado, comumente observado em indivíduos afetados por doenças inflamatórias sistêmicas (Nakajima *et al*, 2015; Lourenço *et al*, 2018).

1.3. TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA PERIODONTITE

1.3.1. TERAPIA PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICA

O principal objetivo é controlar a infecção periodontal através da remoção do biofilme bacteriano, cálculo e toxinas das raízes dentárias expostas, áreas supra e subgingivais, porém os métodos apresentam limitações, como a permanência a longo prazo das bolsas periodontais ainda profundas, o risco de recorrência da doença e a possibilidade de o profissional não conseguir visualizar a placa residual. Por décadas, utilizou-se métodos manuais para o desbridamento (curetas e raspadores) como padrão ouro, mas desde 1990, o uso de instrumentos elétricos cresceu consideravelmente e com eficácia igual ou superior aos manuais. Como alternativas, surgiram a terapia com laser — com efeito controverso — (Sgolastra *et al*, 2012), a terapia fotodinâmica — um laser

com comprimento de onda específico e atividade microbicida, que também não mostrou eficácia sozinho sem a raspagem e alisamento radicular — (Sgolastra *et al*, 2018), a irrigação com antissépticos — uso de povidona-iodo, hipoclorito de sódio diluído ou gluconato de clorexidina não mostrou vantagens sobre os métodos anteriores — (Sanz e Teughels, 2008; Walmsley *et al*, 2008), terapias adjuntas com antimicrobianos locais — com ótima eficácia sobre os parâmetros periodontais clínicos, mas não sobre o biofilme subgingival - (Bonito e Lux, 2005) e terapias adjuntas com antimicrobianos sistêmicos que se mostraram benéficas no tratamento da doença juntamente com a raspagem e alisamento radicular principalmente em pacientes com periodontite agressiva, porém os dados ainda são controversos, uma vez que os antimicrobianos podem aumentar a proporção de patógenos na bolsa em relação aos simbioses (Heller *et al*, 2011). Vale ressaltar que, embora tenha sido mostrado o ótimo efeito dos antimicrobianos sistêmicos na periodontite e sua recomendação por profissionais, não é indicado de maneira alguma o uso indiscriminado dos mesmos, a sua prescrição deve ser feita baseada nas informações de cada paciente individualmente e levando em conta os efeitos adversos (Haffajee *et al*, 2003).

1.3.2. TERAPIA PERIODONTAL CIRÚRGICA: Apesar do avanço da instrumentação não cirúrgica, observou-se a presença de placa residual, e nos locais onde a inflamação persistia, a terapia cirúrgica era indicada com o objetivo de ganhar acesso à superfície radicular, possibilitando um desbridamento adequado, e para manter os contornos gengivais. Para isto, eram praticadas gengivectomia ou procedimentos “*flap*” — conhecida como “cirurgia de retalho”, onde a gengiva cobrindo a raiz dentária é retirada e dobrada para trás enquanto a raspagem e alisamento radicular são executados. Após o procedimento, o tecido é recolocado alinhado à crista óssea (Walmsley *et al*, 2008).

Observou-se que o sucesso da terapia periodontal cirúrgica está alinhado à qualidade do cuidado e higiene oral, ou seja, controle de placa (Nyman, Lindhe e Rosling, 1977). As técnicas cirúrgicas se tornaram mais refinadas e, com isso, foi possível o desenvolvimento de novos instrumentos e abordagens minimamente invasivas e técnicas microcirúrgicas se tornaram frequentes e recomendadas para o benefício da cicatrização e da morbidade dos pacientes (Cortellini e Tonetti, 2009). Heitz-Mayfield e colaboradores concluíram, a partir de uma revisão sistemática, que a raspagem e alisamento radicular sozinhos e combinados com cirurgia *flap* são métodos efetivos para

o tratamento de periodontite crônica em relação à redução de inflamação gengival e ao ganho de inserção (Heitz-Mayfield, 2002). Além disso, no tratamento de bolsas periodontais profundas (>6 mm), um desbridamento *flap* resultou numa ótima redução da profundidade da bolsa e ganho de inserção clínica.

1.3.3. MÉTODOS PERIODONTAIS PREVENTIVOS

Segundo Ainamo, a higiene oral mecânica é o método mais eficaz para prevenir doenças periodontais (AINAMO, 1984). A importância de se prevenir o acometimento por doenças periodontais está na correlação destas com doenças sistêmicas numa relação bidirecional, portanto, cuidar da saúde oral ajuda também a prevenir doenças sistêmicas e vice-versa (Braegger, 2005). Segundo Chapple e colaboradores, o cuidado com a gengivite é a estratégia primária para prevenção da periodontite e secundária para indivíduos que possuem periodontite recorrente (Chapple *et al*, 2015). Este cuidado pode ser feito com escovação manual ou elétrica e/ou com uso de compostos químicos para controlar a formação da placa.

Ultimamente, novas tendências na terapia periodontal têm sido empregadas, dentre elas o uso de probióticos como adjuvantes na terapia com raspagem e alisamento radicular. Pavithra e Lakshmisree pontuaram os principais mecanismos de ação propostos para os probióticos (Pavithra e Lakshmisree, 2015):

- Aumento da função da barreira epitelial intestinal (diminuição da apoptose e aumento da produção de mucina);
- Indução das células do hospedeiro para produção de peptídeos antimicrobianos (defensinas, por exemplo);
- Produção própria de produtos antimicrobianos (defensinas, bacteriocinas, EROs, ERNs, ácidos graxos de cadeia curta);
- Competição com patógenos pela aderência ao epitélio;
- Modulação imune através da *downregulation* de genes de citocinas pró-inflamatórias;
- Interferência na sinalização de *Quorum Sensing* e, portanto, na eficiência da colonização e formação do biofilme.

1.4. PROBIÓTICOS ORAIS E PERIODONTITE

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define probióticos como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). Eles são comercializados principalmente na forma de leite, queijos e iogurtes. Podem ser constituídos de cepas específicas ou consórcios microbianos (Pavithra e Lakshmisree, 2015).

Em 1997, numa carta do Scandinavian University Press, relatando as dificuldades para tratar infecções por *Enterococcus faecalis*, Zoppi já destacava a sua opinião e fatos sobre a necessidade do uso de probióticos almejando prevenir o crescimento de microrganismos resistentes à antibióticos, numa forma de bacterioterapia (Zoppi, 1997).

O uso de probióticos para terapia periodontal tem se tornado cada vez mais frequente e supõe-se os seguintes mecanismos de ação dos probióticos na cavidade oral: interação direta com o biofilme dental, ligação dos microrganismos orais à proteínas do produto e intervenção/competição na aderência das bactérias e ecologia da formação da placa (MP e Bhatia, 2011).

Na cavidade oral, os probióticos estimulam células dendríticas que, por sua vez, atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen-Presenting Cells*) induzindo diferenciação de linfócitos T em seus subtipos de Th1 ou Th2, dessa forma modulando a imunidade local. Alguns microrganismos são seletivamente antagonistas de periodontopatógenos chave no desenvolvimento da doença como, por exemplo, bactérias do gênero *Lactobacillus* são fortes inibidoras de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*. (Asok *et al*, 2018).

Grudianov e colaboradores relataram que o uso de probióticos comerciais, administrados por via oral em forma de cápsulas, contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* levou à recuperação da microbiota e redução dos sinais de gengivite e periodontite. (Grudianov *et al*, 2002). Outros trabalhos relataram a diminuição das bactérias anaeróbicas produtoras de pigmento negro após administração de *L. salivarius* T1 2711 5x por dia durante 8 semanas (Pavithra e Lakshmisree, 2015).

1.5. KEFIR

O Kefir é uma bebida láctea, ácida, viscosa, com baixo teor alcoólico, levemente gaseificada, fermentada por microrganismos numa matriz extracelular em forma de grão. Os microrganismos dos grãos (bactérias ácido lácticas, ácido acéticas e leveduras) são embebidos numa matriz polissacarídica predominantemente composta pelo kefirano (um exopolissacarídeo extracelular produzido por algumas espécies de *Lactobacillus*) e proteínas de matriz (Peixoto *et al.*, 2013). A preparação tradicional da bebida consiste na adição de grãos de kefir no leite fresco ou pasteurizado e é consumida após a fermentação em temperatura ambiente por 24h.

Acredita-se que tenha sido originado no território norte das montanhas do Cáucaso da antiga URSS, onde eram considerados um presente de Alá para os povos muçulmanos que viviam nessas montanhas e eram passados de geração a geração. É produzido artesanalmente em diversos países e sua composição varia em cada um desses, o que sustenta a ideia de que não houve apenas uma cultura “*starter*”. Usualmente, usa-se leite de vaca para sua produção, mas os de outras origens como de ovelha, cabra e búfalo já foram descritos (Ottles e Cagini, 2003; Farnworth, 2005).

1.5.1. MICRORGANISMOS DOS GRÃOS

Dentre as bactérias presentes nos grãos de kefir, destacam-se os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, e *Leuconostoc*, seus principais membros são *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefir*, e *Lactobacillus brevis* (Bourrie, Willing, e Cotter, 2016). *Acetobacter aceti* e *A. rasens*, bactérias ácido acéticas, também foram isoladas (Gao *et al.*, 2012).

Mais de 23 diferentes espécies de leveduras foram isoladas de grãos de kefir e bebidas fermentadas de diferentes origens. No entanto, as predominantes são *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida kefir*, e *Kluyveromyces marxianus* ssp. *marxianus*. (Garrote *et al.*, 2013). A riqueza, abundância relativa e proporção das espécies de alguns microrganismos podem variar de acordo com o tipo de grão e de leite. Entretanto, sabe-se que essa diversidade microbiana é responsável pelas características físico-químicas e atividades biológicas de cada kefir (Prado *et al.*, 2015).

Os microrganismos do grão de kefir são capazes de produzir ácido lático, ácido acético, etanol, peptídeos (bacteriocinas) e outros componentes biologicamente ativos que aumentam a conservação do leite e inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis e patogênicos (Witthuhn, Schoeman, e Britz, 2005). A geração de CO₂ durante a produção do kefir, especialmente após o armazenamento, apresenta um problema prático, uma vez que os microrganismos (particularmente leveduras) no kefir continuam a crescer.

1.5.2. COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS GRÃOS

Uma vez que há variações observadas na composição do kefir de acordo com sua origem, os seus benefícios nutricionais também acompanham estas oscilações. Ele possui normalmente baixo teor de açúcares, gordura, proteínas e resíduo mineral fixo. Em relação às proteínas, estas se tornam digestíveis devido à coagulação ácida e proteólise e seu perfil de aminoácidos não se altera em relação ao leite não fermentado. A lactose do leite é convertida em ácido durante o processo fermentativo, diminuindo o pH e aumentando a consistência do produto; degradada em glicose e galactose, que são, por sua vez, convertidas pelas bactérias em ácido lático. Desta forma, o kefir pode ser uma ótima opção para os indivíduos intolerantes à lactose (Bourrie *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2017).

Durante a fermentação, os grãos crescem em número e tamanho, são geralmente recuperados e reutilizados para a produção de mais bebida. O principal sinal de uma relação simbiótica entre os diferentes microrganismos é o crescimento da biomassa durante o processo fermentativo (Garrote *et al.*, 2010). O FAO/WHO recomenda que a cultura starter de kefir possua no mínimo 10⁷ CFU/g (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição do Kefir de leite segundo o Codex Alimentarius*

Definição	
Cultura inicial preparada a partir de grãos de kefir, <i>Lactobacillus kefir</i> , e espécies dos gêneros <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> e <i>Acetobacter</i> crescendo em uma forte relação interespecífica. Os grãos de Kefir são constituídos pelos grupos de leveduras fermentadoras de lactose (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) e leveduras que não fermentam lactose (<i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Saccharomyces exiguus</i>).	
Composição	Tempo/UFC/g
Proteínas do leite (% p/p)	Min. 2.8
Gorduras do leite (% m/m)	<10
Acidez titulável, expressa como % de ácido láctico (% m/m)	Min. 0.6
Etanol (%vol./p)	Não declarado
Soma dos microrganismos específicos que constituem a cultura inicial (UFC/g, no total)	Min 10 ⁷
Leveduras (UFC/g)	Min 10 ⁴

*Traduzido do Padrão do Codex para Leites Fermentados CODEX STAN 243-2003.

UFC: Unidades Formadoras de Colônias.

Os grãos de kefir assemelham-se a pequenos floretes de couve-flor: medem de 1 a 3 cm de comprimento, são lobulados, de formato irregular, de cor branca a amarelo-clara, e têm uma textura viscosa, mas firme (Figura 3). Os grãos são mantidos viáveis, transferindo-os diariamente para leite fresco e permitindo que eles cresçam por aproximadamente 20 horas; durante este tempo, os grãos terão aumentado sua massa em 25%. Os grãos devem ser replicados desta forma para manter a sua viabilidade, uma vez que os grãos de kefir velhos e secos têm pouca ou nenhuma capacidade de replicar (la Rivière, Kooiman, e Schmidt, 1967; Farnworth, 2005; Magalhães *et al*, 2011).

Os grãos tendem a ser resilientes, ou seja, nem toda alteração ambiental levará a um declínio do número de células ou à interrupção da produção dos metabólitos com atividade benéfica. Peixoto e colaboradores, a partir de um estudo químico e microbiológico do kefir na sua produção e armazenamento, mostraram que a grande maioria das bactérias e leveduras presentes nos grãos não se alterou ao longo dos 28

dias de armazenamento. Mostraram, ainda, que estas células continuaram metabolicamente ativas ao longo de todo o período de produção e armazenamento, com exceção do *Lactobacillus kefir* (Peixoto *et al.*, 2013).

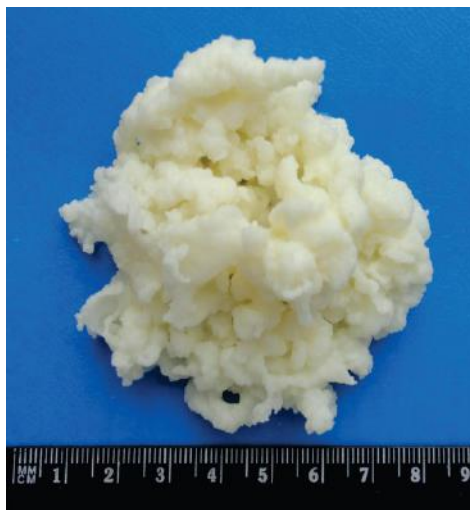


Figura 3. Estrutura macroscópica dos grãos de Kefir (Fonte: Leite *et al.*, 2013).

1.5.3. BENEFÍCIOS DO KEFIR

Além do potencial antimicrobiano e da melhora na intolerância à lactose, já foi descrita, também, atividade anti-inflamatória e antialérgica em camundongos BALB/c num modelo de asma (Lee *et al.*, 2007). Além disso, observou-se efeito cicatrizante em ratos submetidos à queimadura experimental e infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (Huseini *et al.*, 2012) e também na prevenção de câncer de mama num modelo animal (de Moreno *et al.*, 2006).

Andrade e colaboradores mostraram que a administração da fração solúvel e sem bactérias do Kefir reduziu a deposição de gordura e formação de placas de aterosclerose em camundongos (Andrade *et al.*, 2016). Outros modelos como de diabetes e diversas infecções mostraram êxito do uso do Kefir (Gaware *et al.*, 2011; Harmayani, 2016).

Em 2016, Miao e colaboradores isolaram do kefir o F3, um peptídeo de baixo peso molecular com propriedade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 63589), *Salmonella enterica* (CMCC 9812), *Shigella dysenteriae* (CMCC (B) 50071), *Bacillus thuringiensis* (CMCC 9812), *Aspergillus niger* (ACCC 30005), *Aspergillus flavus* (CGMCC 3. 2890), *Rhizopus nigricans* (AS3.4997) e *Penicillium glaucum* (STL 3501). O peptídeo foi, ainda, capaz de

atravessar a membrana celular de *S. aureus* e *E. coli*, modificando suas morfologias (Miao *et al.*, 2016).

Muitas espécies de *Lactobacillus* são capazes de produzir uma variedade de compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol, polissacarídeos e bacteriocinas, que apresentam potencial no controle de patógenos e bactérias de deterioração durante a produção e o armazenamento dos alimentos. Além de conferir aroma, sabor e textura aos derivados lácteos, bactérias ácido-lácticas que apresentem ação inibitória sobre microrganismos indesejáveis podem ser utilizadas na indústria de alimentos como bioconservantes, em substituição aos conservantes tradicionais (Dias *et al.*, 2016). O kefir fermentado em diferentes açúcares como fontes de carbono mostrou diferentes ações inibitórias contra microrganismos patogênicos como *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Silva *et al.*, 2009).

Outra razão para o aumento do interesse em cepas probióticas do kefir é sua capacidade de diminuir os níveis de colesterol. Existem diferentes maneiras pelas quais as bactérias podem alterar o colesterol sérico: (i) através da ligação e absorção da molécula na célula bacteriana antes que ela possa ser absorvida pelo organismo; (ii) produzir ácidos biliares livres; (iii) inibir a enzima HMG-CoA redutase (Wang *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Existindo atividade do kefir na periodontite, suas propriedades benéficas poderão ser exploradas pela indústria biotecnológica a fim de difundir pela comunidade científica e global as possibilidades de aplicação deste produto na prevenção do desenvolvimento de doenças periodontais, além do que já se sabe sobre o papel na cicatrização de queimaduras, na recuperação em quadros diarreicos, entre outros. Países como Estados Unidos, Austrália, Canadá e Grã-Bretanha já desenvolveram produtos comerciais baseados no kefir. Estes produtos incluem *Low Fat Kefir* (sem lactose), *Non-Fat Kefir* (sem gluten, com 12 cepas probióticas), *Veggie Kefir* (Alta concentração de proteínas e cálcio), *Kefir Oats* (todos os benefícios dos anteriores e enriquecido com fibras de aveia), *Greek Style Kefir* (sem açúcar, com muitas proteínas e cálcio) dentre outras formulações desde as orgânicas às congeladas em forma de sorvete. Portanto o Kefir, a bebida tradicional, é agora reconhecida como uma fonte potencial de probióticos e moléculas com propriedades saudáveis altamente promissoras (Prado *et al.*, 2015).

Considerando a necessidade de identificação de novas propostas terapêuticas para o tratamento das doenças periodontais, bem como as promissoras ações descritas para probióticos na modulação de condições inflamatórias e disbióticas, a prevenção é o melhor método para evitar o desenvolvimento de doenças periodontais e isso pode ser atingido pela manutenção da homeostase da cavidade oral com o uso de probióticos, por exemplo. Uma vez que as doenças periodontais possuem relação direta ou indireta com outras doenças sistêmicas, faz-se necessária a busca de métodos preventivos da doença a fim de, por consequência, prevenir outros quadros, dada a bidirecionalidade da homeostase sistêmica e oral (Braegger, 2005; Genco e Van Dyke, 2010).

A periodontite é um problema de saúde pública mundial devido à sua alta prevalência, porque pode levar à perda e incapacidade dentária, afetar negativamente a função mastigatória e a estética, ser uma fonte de desigualdade social, e prejudicar a qualidade de vida. Ela contabiliza uma proporção substancial de edentulismo, resultando em custos significativos de tratamento odontológico e apresentando impactos na saúde geral (Papapanou *et al.*, 2018).

A crescente utilização de antimicrobianos associados à terapia periodontal não cirúrgica selecionou periodontopatógenos resistentes à quimioterapia, complicando o quadro clínico e restringindo as opções na clínica (McNab *et al.*, 2003). Além disso, o

próprio biofilme dental formado já participa como um reservatório para transmissão de genes de resistência aos antimicrobianos, o que reforça a busca de terapias de reequilíbrio ecológico (Høiby *et al*, 2010; Roberts e Mullany, 2010).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o **efeito do probiótico Kefir no desenvolvimento da periodontite experimental em camundongos.**

Como objetivos específicos, buscamos:

❖ Padronizar o modelo de periodontite experimental induzida pela ligadura em camundongos suíços, bem como realizar o acompanhamento temporal de ganho de peso e glicemia;

❖ Avaliar o status periodontal dos animais: Perda Óssea Alveolar (distância JCE-COA) e alterações histomorfológicas no periodonto;

❖ Avaliar o metabolismo de glicose através da realização do Teste de Tolerância à Glicose e os níveis de colesterol plasmáticos através de dosagens bioquímicas;

❖ Avaliar os níveis plasmáticos de TNF.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados no presente estudo camundongos *Swiss* machos e fêmeas (*Mus musculus*), com 2 meses de vida, com faixa de peso entre 30-40g, obtidos e mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia (UFRJ), em ciclo 12h claro-escuro, água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos em experimentação animal preconizados pelo Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA), sob aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRJ (126/19).

4.2. Indução da periodontite experimental pela ligadura

O protocolo utilizado para indução da periodontite pela ligadura foi adaptado por Abe e Hajishengallis para ser utilizado em camundongos (Abe e Hajishengallis, 2013).

O procedimento visa induzir a doença periodontal em camundongos através da inserção de uma ligadura (fio de seda 3-0) ao redor da cérvice do primeiro molar mandibular a fim de reter macromoléculas alimentares e promover a proliferação de periodontopatógenos, levando a inflamação e destruição tecidual. Para a colocação do fio, os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, o animal foi posicionado em decúbito ventral sobre o aparato e, com auxílio de um suporte, a boca permaneceu aberta ao longo da manipulação. Com a boca aberta e língua imobilizada, um espaçador endodôntico de níquel titânio (21 mm, Denstply) foi inserido entre o primeiro e segundo molar inferior a fim de que haja espaço para o fio. Assim, com o uso de uma sonda periodontal, o fio foi inserido utilizando como eixo o espaçador e, após seu posicionamento correto, amarrado ao redor da cérvice do primeiro molar. O mesmo procedimento foi realizado nos dois lados do arco dentário inferior do animal, a fim de que haja a ligadura bilateral dos primeiros molares mandibulares (Figuras 4 e 5). O ressecamento da língua e dos olhos do animal em decorrência do tempo em que o mesmo permaneceu parado com os olhos e boca abertos foi corrigida com adição de solução salina (NaCl 0,9%).



Figura 4. Esquema de como é realizada a inserção do fio entre os molares. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 5. Fotografia realizada no momento da inserção da ligadura no primeiro molar mandibular de um rato Wistar utilizando o aparato e instrumentos adequados de acordo com o que foi descrito anteriormente. Fonte: Silva, 2012.

4.3. Ativação e Preparo do kefir (Kim *et al*, 2017)

Os grãos de kefir foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Analy Machado Leite (UFRJ/MACAÉ). No laboratório, os grãos de kefir foram ativados em leite integral (Nestlé NINHO®) (10% p/v) a 25 °C por 24 h, coados em uma peneira para remoção do kefir (leite coagulado) com auxílio de colher de silicone, e lavados com água estéril.

Para os protocolos posteriores, o preparo foi feito apenas uma vez por dia sem a etapa de lavagem com água. Uma vez ativado, os grãos de kefir foram trocados diariamente sob condições assépticas com substituição do leite fermentado para não-fermentado e armazenagem em frasco estéril, a 25 °C por 24h. O indicativo de atividade metabólica dos grãos foi o aumento da consistência do leite, bem como de viscosidade dos grãos (sinal de produção de Kefiran).

4.4. Grupos experimentais

Os animais foram randomizados e distribuídos em 4 grupos, a saber:

- **SHAM (falso operado):** os animais foram submetidos à anestesia e ao procedimento de inserção da ligadura, porém, o fio não foi amarrado no seu molar. Após 20 dias, os animais foram eutanasiados.
- **DP:** os animais tiveram a doença periodontal induzida no quinto dia de experimento e não receberam nenhum tratamento. Após 20 dias, os animais foram eutanasiados.
- **DP + VEÍCULO:** Os animais receberam a administração de leite integral (Nestlé NINHO®) por gavagem 1x ao dia (100 µl/20g de peso corporal) durante todo o período experimental. Após 20 dias, os animais foram eutanasiados.
- **DP + KEFIR:** Os animais receberam a administração por gavagem de kefir 1x ao dia 100 µl/20g durante todo o período experimental. Após 20 dias, os animais foram eutanasiados.

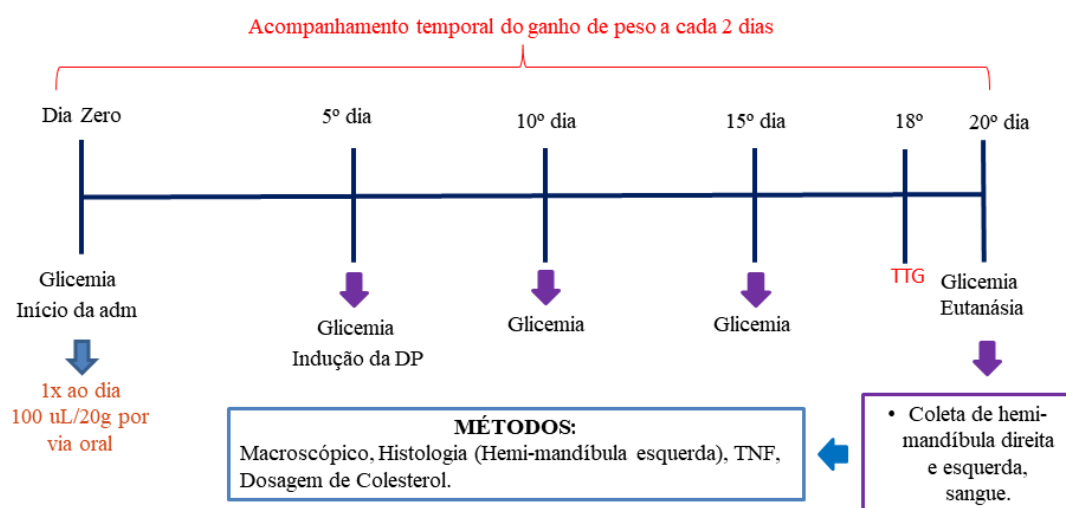


Figura 6. Linha do tempo contendo o Delineamento do protocolo experimental. DP: Doença Periodontal; TTG: Teste de Tolerância a Glicose.

4.5. Avaliação dos parâmetros metabólicos e nutricionais:

- 4.5.1. Peso corporal:** o peso corporal dos animais foi monitorado uma vez a cada 2 dias até o final da experimentação, obedecendo sempre o mesmo horário de pesagem para todos os dias analisados. O ganho de peso (Peso do dia – Peso do dia zero) também foi calculado para cada intervalo.
- 4.5.2. Colesterol total:** O colesterol total plasmático foi quantificado através de kit disponível comercialmente (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

4.5.3. Medidas da glicose sanguínea: os níveis sanguíneos de glicose foram aferidos com glicosímetro comercial (Accu-Chek Active ®, Roche). As amostras de sangue foram coletadas através de leve perfuração da cauda do animal com agulha descartável 0,45x13mm 26G.

4.5.4. Testes de tolerância à glicose (TTG) (Adaptado de *Mouse Metabolic Phenotyping Centers Manual*)

Os animais foram deixados em jejum de 5 horas e uma pequena amostra de sangue foi coletada (conforme descrito no item 4.5.3) para determinação da glicemia de jejum. Após este procedimento, os animais receberam administração oral de solução de glicose (20%) e a glicemia foi monitorada 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose.

4.6. Quantificação de TNF- α no plasma

A concentração do TNF- α no plasma foi mensurada através do kit comercial Mouse Inflammation (BD™ Cytometric Bead Array (CBA)). 50 μ L das amostras foram misturadas com microesferas conjugadas ao anticorpo anti-TNF (*beads*), juntamente com os controles, curva padrão e reagente fluorescente de detecção. Após incubação de 2h em temperatura ambiente, foi realizada uma etapa de lavagem com tampão apropriado do kit, centrifugação em 200 \times g por 5 minutos e ressuspensão em tampão para análise. A leitura dos analitos foi realizada através do citômetro de fluxo BD FACSCalibur alocado na Plataforma de Imunoanálise (PIA) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF, CCS, UFRJ), utilizando os filtros FITC e PE.

4.7. Análise da Perda Óssea Alveolar (POA) (Adaptado de Crawford, 1978)

Após a eutanásia, as mandíbulas foram retiradas e seccionadas em duas (hemi-mandíbula esquerda e direita). A hemi-mandíbula direita, após a coleta do tecido gengival, foi imersa em peróxido de hidrogênio 30% por 5 horas para a remoção dos tecidos moles e corada com solução de azul de metileno 1%. O azul de metileno facilita a visualização e mensuração das raízes expostas pela retração dos tecidos que as recobrem, consequência do estabelecimento da periodontite. As imagens das hemi-mandíbulas coradas foram capturadas utilizando o estéreo-microscópio Leica S8AP0, acoplado à câmera digital Leica DFC290 HD e à uma fonte de luz fria (CLS 150) com o auxílio do software Leica Application Suite v. 3.8. A perda óssea alveolar foi

mensurada pela média do somatório de três distâncias mensuradas entre a crista do osso alveolar e a junção cimento-esmalte (JCE-COA) de cada raiz dos dois molares (face lingual) (figura 7). As medidas foram feitas por um avaliador cego em relação aos grupos experimentais com o auxílio do software de processamento de imagem ImageJ pro-plus 6.0.

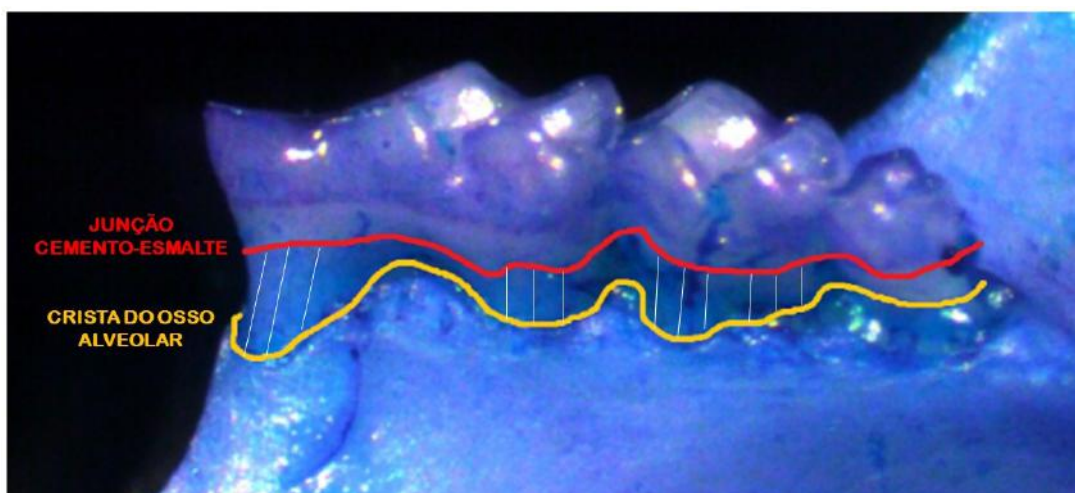


Figura 7. Fotografia da peça de uma hemi-mandíbula corada evidenciando a Junção cimento-esmalte e crista óssea alveolar. A medida da POA foi realizada através da média da soma da distância JCE-COA de cada hemi-mandíbula direita (Fonte: acervo pessoal)

4.8. Análise histológica do periodonto

A hemi-mandíbula esquerda foi desmineralizada (EDTA 10%, troca diária), cortada em direção sagital e processada através de desidratação em soluções crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), diafanização em xilol e inclusão em parafina. Com o micrótomo, foram feitos cortes de 5 μ m a partir dos blocos e as lâminas foram montadas e coradas com corantes de rotina hematoxilina e eosina (HeE), procedendo-se a análise descritiva da região de furca dos primeiros molares. As imagens dos cortes selecionados foram capturadas com o auxílio de uma câmera digital (AxioCam ERc 5s; Zeiss, Jena, Germany) acoplada ao microscópio (Primo Star; Zeiss, Jena, Germany) utilizando a objetiva de 4x.

4.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando análise de variância (one-way-ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis, para análise de perda óssea; two-way-ANOVA, para análise da variação de peso dos animais) ou teste Mann Whitney (para análise das dosagens bioquímicas). Todos os testes foram feitos para um

nível de significância de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média, utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do ganho de peso

Os animais do grupo SHAM apresentaram ganho de peso dentro da normalidade, já os indivíduos dos grupos DP + VEI e DP + KEFIR, logo após o 5º dia (dia da indução da periodontite) tiveram uma perda de peso gradual com valores ainda menores que do início do experimento. Em relação ao grupo DP, houve crescente perda de peso ao longo do experimento e não foi observada recuperação, porém, as diferenças entre nenhum dos grupos foram estatisticamente significativas (Figura 8).

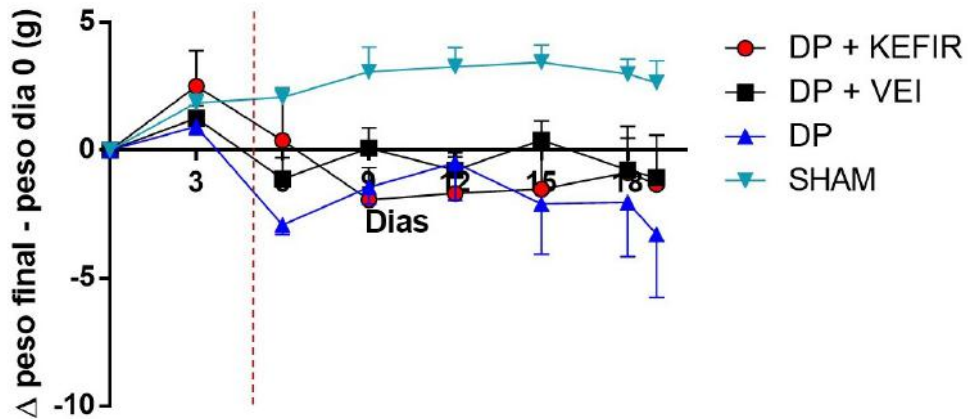


Figura 8. Monitoramento temporal do ganho de peso. Os resultados foram obtidos através do Δ do peso do dia em relação ao inicial. Valores expressos como média \pm erro padrão da média em gramas ($n=4-8$). Seta pontilhada: indica o dia da indução da doença periodontal (DP).

5.2. Glicemia aleatória

A aferição de glicose sanguínea foi feita a cada 5 dias de experimento com horário padronizado para todos os grupos e os animais não foram submetidos ao jejum para isto (Figura 9). A média da glicemia entre os grupos ao longo do protocolo não apresentou diferença estatisticamente significativa. Portanto, não foi observado efeito do tratamento com Kefir na glicemia dos animais.

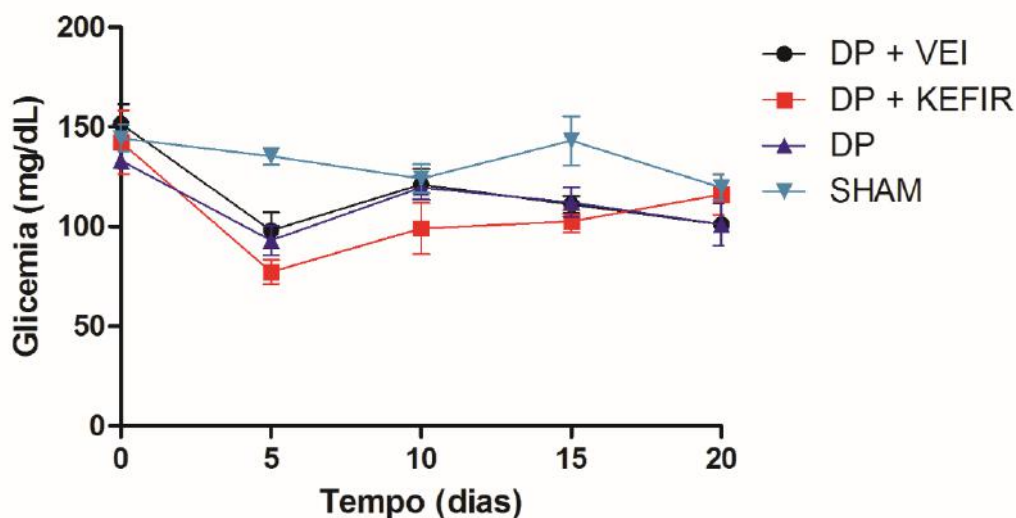


Figura 9. Acompanhamento da glicemia. As medidas foram feitas a cada 5 dias do experimento com uso de glicosímetro sem jejum. Valores expressos como média \pm erro padrão da média em miligramas por decilitros (n= 5-6). DP: Doença Periodontal.

5.3. Análise da Perda Óssea Alveolar (POA)

A análise macroscópica da perda óssea alveolar permite a delimitação das distâncias entre a Crista do Osso Alveolar (COA) e da Junção Cimento-Esmalte (JCE) dos três molares inferiores da mandíbula direita (face lingual). A partir das imagens capturadas, foi possível quantificar a área das raízes expostas e mensurar a distância COA-JCE, como descrito em Materiais e Métodos (Figura 10 e 11).

Após os 15 dias de estabelecimento da periodontite, a média das distâncias obtidas do grupo DP foi significativamente diferente da média do grupo SHAM ($0,368 \pm 0,0250$ vs $0,192 \pm 0,015$ mm, respectivamente. $p = 0,0052$). Desta forma, os dados mostram que a doença foi, de fato, estabelecida no modelo murino (linhagem *Swiss*). De mesmo modo, o grupo tratado com Kefir mostrou diferença em relação ao grupo DP ($0,238 \pm 0,028$ vs $0,368 \pm 0,025$ mm, respectivamente). Este, por sua vez, também não mostrou diferença significativa em relação ao grupo SHAM ($0,238 \pm 0,028$ vs $0,192 \pm 0,015$ mm,

respectivamente) mostrando que a terapia periodontal com o Kefir possui efeito sobre a perda óssea alveolar resultante da periodontite. A perda óssea observada para o grupo administrado com veículo (leite integral) não foi diferente significativamente do grupo DP ($0,416 \pm 0,061$ vs $0,368 \pm 0,025$ mm, respectivamente), confirmando, assim, a natureza inerte do leite, validando-o como veículo do kefir.

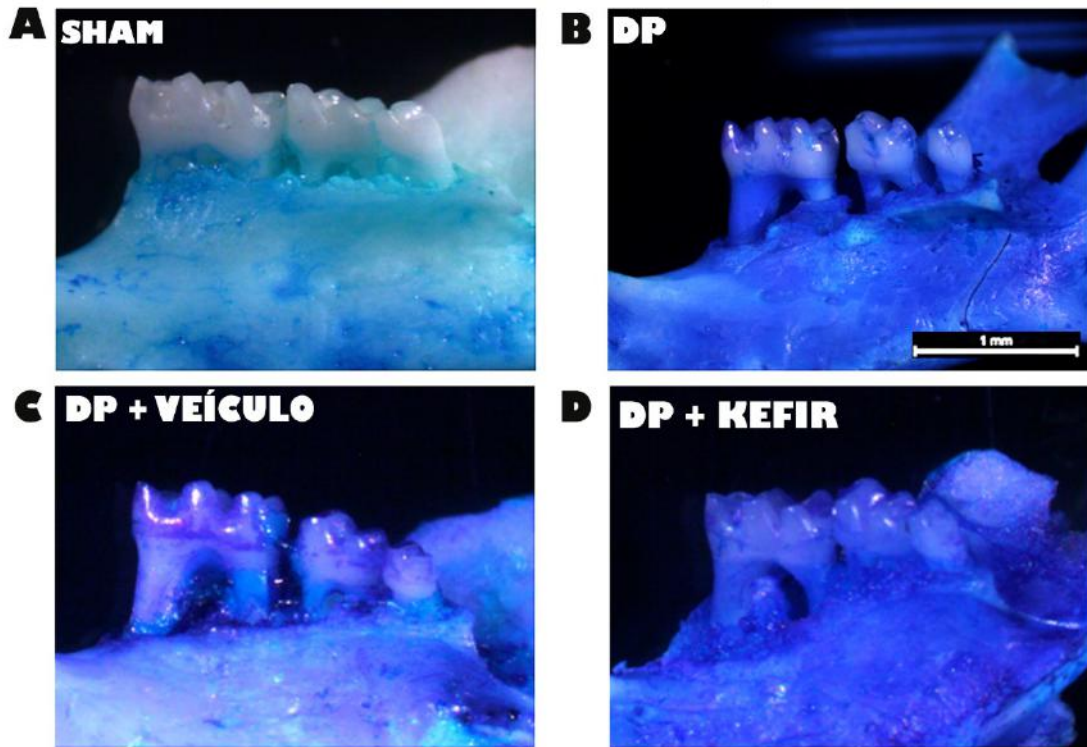


Figura 10. Imagens representativas da análise macroscópica da perda óssea alveolar em camundongos suíços submetidos a 15 dias de periodontite. Administração de veículo (leite integral) e Kefir 1x ao dia. As peças foram coradas com Azul de Metileno (1%) para delimitação da JCE. (A): SHAM, (B): DP, (C): DP + VEÍCULO e (D): DP + KEFIR.

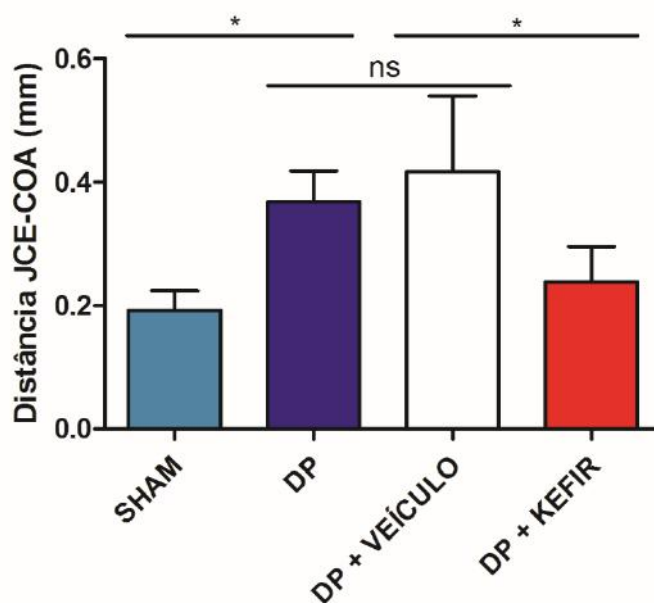


Figura 11. Quantificação da Perda Óssea Alveolar (POA) através da média do somatório da distância da Junção Cimento-Esmalte e Crista Óssea Alveolar (JCE-COA) dos dois molares da hemimandíbula direita de camundongos suíços submetidos a 15 dias de periodontite. O kefir reduziu a POA significativamente. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média em milímetros (n= 4). * $p < 0,05$. *One-way-ANOVA*, Kruskal-Wallis.

5.4. Análise histológica do periodonto

Grupo SHAM: a análise dos cortes deste grupo demonstrou boa preservação das estruturas na região de furca (área entre as duas raízes do dente), com pequeno infiltrado celular e fibras modelando o tecido conjuntivo (Figura 12, A).

Grupo DP: no periodonto do grupo DP, pode-se observar na região de furca infiltrado inflamatório intenso ao longo do tecido conjuntivo mole e ósseo subjacente devido ao estabelecimento da doença periodontal, com edema intersticial e consequente destruição tecidual. Nesta lâmina, é possível observar, inclusive uma organização difusa das fibras colágenas do tecido na parte superior da região de furca (Figura 12, B).

Grupo DP + VEÍCULO: Neste corte, é possível observar as mesmas características histológicas que foram observadas no corte do grupo DP, com intenso infiltrado inflamatório e organização difusa das fibras colágenas do tecido conjuntivo da região de furca, além de edema intersticial (Figura 12, C).

Grupo DP + KEFIR: A região de furca do corte do grupo tratado com kefir demonstra presença sutil de infiltrado de células, porém sem alteração da organização das fibras do estroma, com semelhança ao observado no corte do grupo SHAM (Figura 12, D).

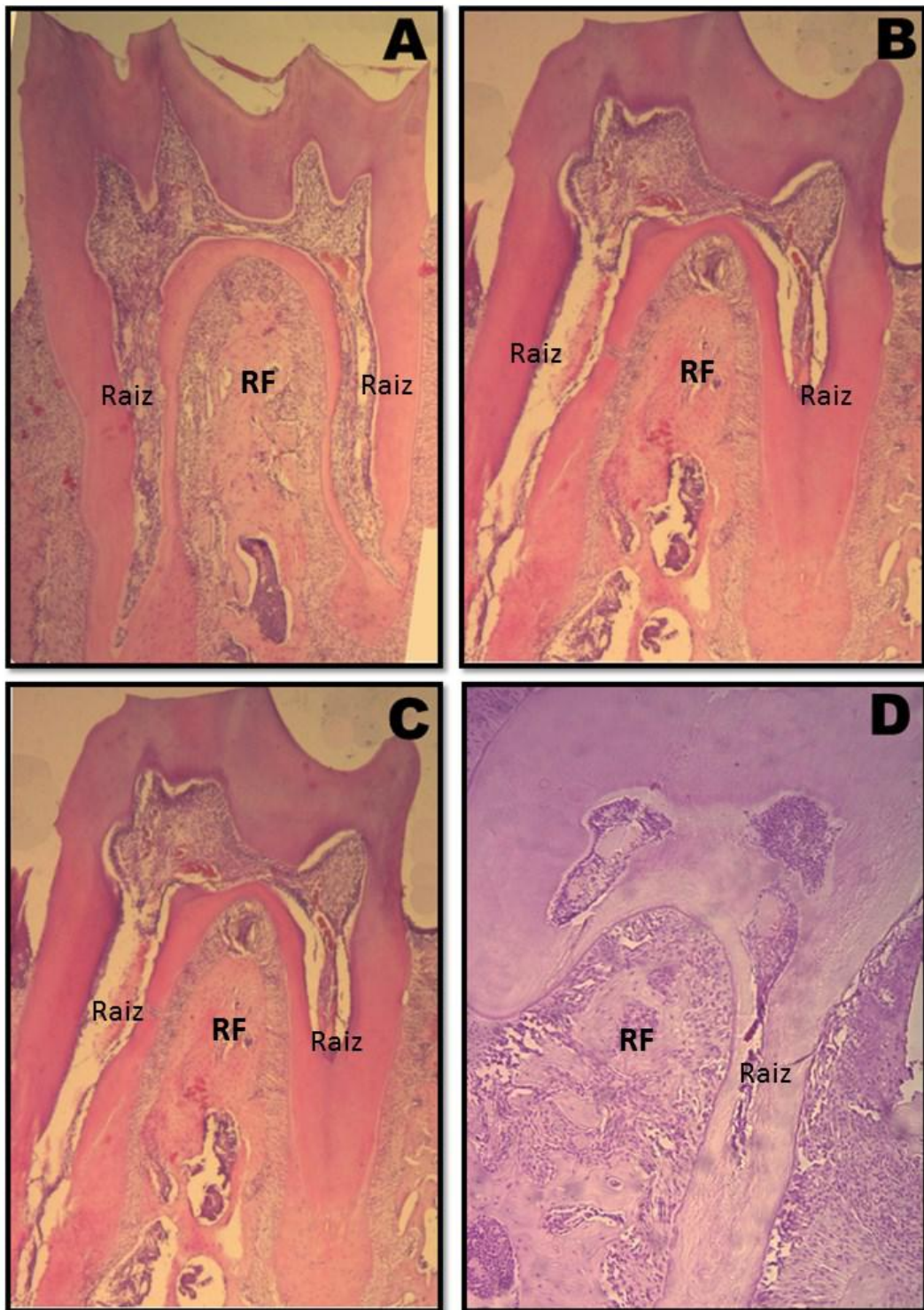


Figura 12. Imagens representativas dos cortes histológicos das hemi-mandíbulas esquerdas dos animais submetidos à periodontite e tratados com veículo ou kefir. O Kefir melhorou a organização do tecido conjuntivo da região de furca. (A): SHAM, (B): DP, (C): DP + VEÍCULO e (D): DP + KEFIR. Aumento de 4x. Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), RF: Região de Furca.

5.5. Colesterol Total

Os animais com doença periodontal não apresentaram alterações estatisticamente significativas na quantidade de colesterol total circulante, tampouco o grupo tratado com Kefir ou Veículo (Figura 13).

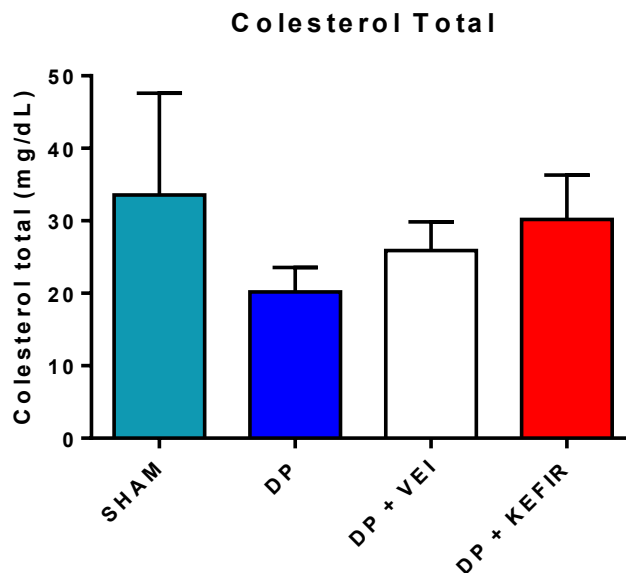


Figura 13. Quantificação de Colesterol Total no plasma de camundongos suíços submetidos a 15 dias de periodontite e tratados com Kefir ou veículo. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média em miligramas/decilitro. (n= 3-6) Não houve diferença significativa.

5.6. Teste de Tolerância à Glicose (TTG)

Não foram observadas diferenças entre os grupos após a administração oral de glicose 20% e aferição subsequente da glicemia nos tempos avaliados, sugerindo que nem a doença periodontal nem o tratamento com o Kefir alteraram o metabolismo de glicose (Figura 14).

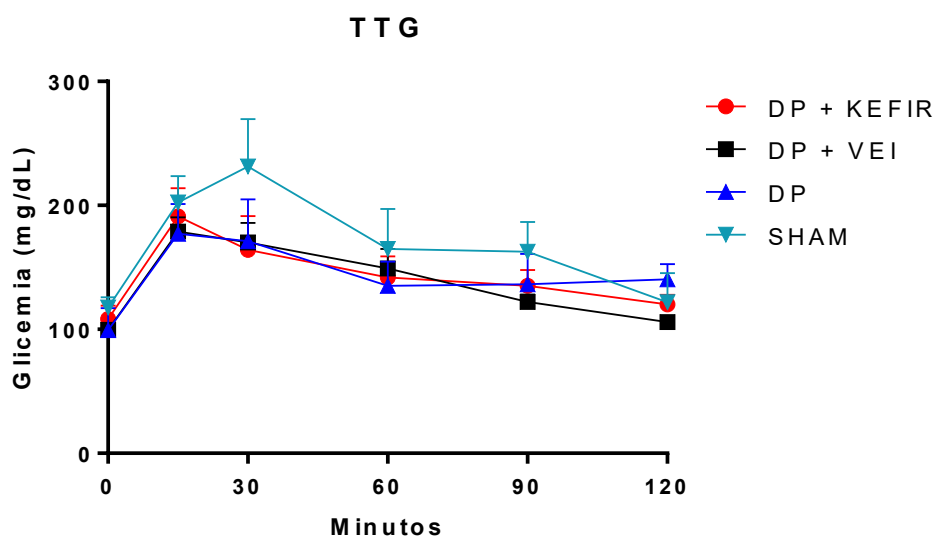


Figura 14. Teste de Tolerância à Glicose (20% i.p.) de camundongos suíços submetidos a 15 dias de periodontite e tratados com Kefir ou veículo. Valores expressos como média \pm erro padrão da média em miligramas por decilitros (n= 3-5).

5.7. Mensuração de TNF- α no plasma

Os valores desta citocina que encontramos no plasma dos animais não foram diferentes entre si, portanto, a periodontite não causou aumento desta citocina nos seus níveis plasmáticos neste modelo (Figura 15).

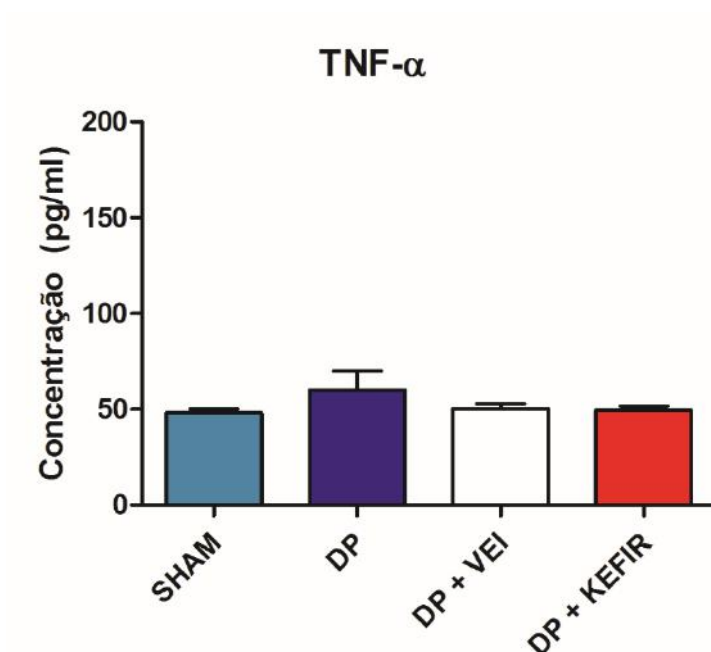


Figura 15. Quantificação de TNF no plasma de camundongos suíços submetidos a 15 dias de periodontite e tratados com Kefir ou veículo. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média em pictogramas por mililitro. (n= 6). TNF: Fator de Necrose Tumoral; DP: Doença Periodontal.

6. DISCUSSÃO

O uso alimentar de microrganismos vivos é uma prática antiga, com menção de produtos lácteos na bíblia e em livros sagrados do hinduísmo. Em 1907, Elie Metchnikoff postulou que o consumo de um tipo de iogurte promovia a boa saúde. A OMS, em 1994, descreveu os probióticos como o próximo sistema exógeno de defesa imunológica mais importante após os antibióticos (Singh e Bhatia, 2011). A doença periodontal desempenha uma parte importante do ônus das doenças bucais, predominantemente com bactérias anaeróbicas gram-negativas consideradas patogênicas para os tecidos de suporte dental. A condição leva à destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar subjacente (Kinane *et al*, 2017). Nesta doença, alguns estudos investigaram o papel dos probióticos na gengivite e relataram uma diminuição significativa em relação ao biofilme e aos índices gengivais, sangramento à sondagem e na inflamação gengival nos grupos com probióticos (Laleman e Teughels, 2015). Hillman e Socransky relataram que *Streptococcus oralis* e *Streptococcus uber* inibiram o crescimento de patógenos em modelos de laboratório e animais, sendo estas espécies indicadoras de um periodonto saudável e, quando ausentes num sítio oral, tal local se torna mais propenso às doenças periodontais (Hillman; Socransky e Shivers, 1985).

Kim e colaboradores demonstraram o papel do Kefir na modulação da microbiota intestinal de camundongos suíços após 3 semanas de administração, com redução dos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, e da família *Enterobacteriaceae*, além do aumento do filo *Bacteroidetes*, gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e da contagem total de leveduras (Kim *et al*, 2015). Nosso estudo foi o primeiro a relatar influência do Kefir como um probiótico oral com efeito sistêmico no modelo de periodontite experimental pelo método da ligadura na linhagem de camundongos suíços em período de tempo de tratamento similares com o que se encontra na literatura. Além disso, o papel do kefir sobre a microbiota intestinal corrobora a ideia da existência do eixo intestino-boca, uma vez que a melhora do microbioma intestinal foi refletida nos parâmetros periodontais descritos em nosso estudo. O tempo de administração de um determinado probiótico numa condição patológica específica ainda não é algo padronizado, portanto, é possível encontrar na literatura trabalhos com diferentes sugestões de tempos e doses de

probióticos. Desta forma, a ordem de grandeza das respostas observadas poderia ser diferente caso o delineamento experimental fosse modificado.

A visualização microscópica das lâminas histológicas (Figura 12) corrobora os achados obtidos na análise macroscópica de perda óssea (Figuras 10 e 11), mostrando que a doença foi estabelecida e o modelo implantado com sucesso. Garcia e cols. induziram a periodontite em ratos, realizaram administração por 7, 15 e 30 dias de uma cepa probiótica de *S. cerevisiae* em conjunto da terapia periodontal tradicional (raspagem e alisamento radicular) e observaram aceleração do reparo tecidual, redução da expressão de TNF α e IL-1 β , além do aumento de IL-10 (Garcia *et al*, 2016). Oliveira e cols. demonstraram em ratos Wistar o papel da cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019 na redução da POA após 14 dias de administração tópica (10^9 UFC) e regeneração dos tecidos periodontais (região de furca, menor destruição das fibras colágenas, menor edema intersticial e presença de osteoblastos no septo radicular) (Oliveira *et al*, 2016), dados estes que vão ao encontro dos nossos achados neste estudo.

A redução da perda óssea encontrada no presente estudo pode ter ocorrido devido a um efeito anti-inflamatório do Kefir, visto seu papel imunomodulador já descrito. Carasi, num estudo com camundongos suíços, administrou a cepa de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 por 21 dias e observou o aumento da produção de IL-10, a diminuição dos mediadores pró-inflamatórios na placa de Peyer e da imunoglobulina IgA nas fezes. Além disso, houve diminuição da expressão dos genes de IFN- γ , GM-CSF, e IL-1 β . (Carasi *et al*, 2015). Krasse e cols. descreveram um efeito benéfico de *Lactobacillus reuteri* sobre sinais de gengivite em um estudo com pacientes suíços (Krasse *et al*, 2006).

Outro possível mecanismo é o antagonismo de espécies de *Lactobacillus* contra periodontopatógenos, uma vez que já foi descrita atividade inibitória contra outros patógenos, como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (Iraporda *et al*, 2017). Jeong e colaboradores demonstraram um efeito antimicrobiano e antibiofilme de *L. kefiranofaciens* DD2 contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, principais patógenos orais causadores da cárie, corroborando a ideia de um possível efeito destas espécies contra patógenos periodontais (Jeong *et al*, 2018). Shin, Baek e Lee demonstraram que *Lactococcus lactis* possui atividade antimicrobiana contra periodontopatógenos, como *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* usando o sobrenadante da cultura

bem como realizando co-cultivo. Além disso, observou-se atividade neutralizante sobre a produção de compostos sulfurados voláteis, bem como redução na produção de citocinas pró-inflamatórias a partir de células desafiadas com LPS desses patógenos. (Shin, Baek e Lee, 2018). É possível, ainda, que os próprios microrganismos do kefir estejam participando das vias de sinalização sobre o metabolismo ósseo. Narva e colaboradores demonstraram *in vitro* o papel do leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* sobre a formação de matriz óssea calcificada por osteoblastos derivados dos precursores de medula óssea de murinos (Narva *et al*, 2004a) No mesmo ano, o autor publicou um estudo no qual administraram leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* para ratos machos com osteoporose e foi observado um aumento da densidade mineral óssea e do conteúdo mineral ósseo em relação ao peso corporal (Narva *et al*, 2004b).

Dias e cols. avaliaram a sobrevivência de bactérias patogênicas veiculadas pelo leite durante a fermentação do kefir produzido artesanalmente. O estudo demonstrou que a fermentação do leite provocada pelos microrganismos presentes nos grãos gerou um ambiente desfavorável às bactérias testadas. *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis* não foram recuperadas após 24 horas de fermentação do kefir. Os ácidos orgânicos, láctico e acético, resultantes do catabolismo dos carboidratos contribuem para o decréscimo do pH, tornando o ambiente hostil para a maioria dos microrganismos (Farnworth, 2005; Bosch *et al*, 2006; Magalhães *et al*, 2010; Dias *et al*, 2012). Garrote e colaboradores atribuíram o efeito bacteriostático do kefir aos ácidos orgânicos produzidos (Garrote *et al*, 2000).

Em relação ao peso, a administração do kefir mostrou ser um fator importante para o ganho de peso (Figura 8). Million e colaboradores viram que diferentes espécies de *Lactobacillus* estão envolvidas no aumento das taxas de ganho de peso de mamíferos (humanos, animais de grande porte e roedores de forma espécie-específica) (Milion *et al*, 2012). Um trabalho seminal de Turnbaugh mostrou que a microbiota intestinal influencia no ganho de peso (Turnbaugh, 2006). Por outro lado, Weyant demonstrou que a doença periodontal em indivíduos adultos está relacionada causalmente com a perda de peso (Weyant *et al*, 2004 apud Nakamura *et al*, 2016). Lourenço e colaboradores descreveram um estudo com pacientes com doença periodontal que possuíam a microbiota intestinal muito menos diversa que dos indivíduos saudáveis (Lourenço *et al*, 2018). Portanto, é possível que o equilíbrio da microbiota intestinal promovido pelo kefir possa ter influenciado na recuperação do peso. Porém, os

componentes do Kefir também podem ter sido uma boa fonte nutricional que favoreceu o ganho de peso dos animais, ou a ausência de inflamação intensa também pode ter causado um bem-estar ao animal, não alterando seu apetite.

No Teste de Tolerância à Glicose, não foi observada diferença estatística entre os grupos de animais (Figura 14), bem como na medida de glicemia aleatória (Figura 9) e mensuração de colesterol total no plasma (Figura 13). Durante a realização do TTG, um animal considerado saudável, será capaz de compensar o pico de glicemia após a administração de glicose dentro do tempo do teste, já um indivíduo com alguma alteração metabólica poderá apresentar valores maiores ou menores que o esperado (Ayala *et al*, 2010).

Estudos em camundongos mostraram que a microbiota intestinal pode regular o metabolismo com um mecanismo relacionado à função da barreira intestinal. Uma barreira intestinal prejudicada permite a translocação de bactérias e seus componentes que, quando em contato com o sistema imunológico submucoso, evocam inflamação metabólica e prejudicam a sinalização em tecidos metabolicamente ativos. (Stenman, Burcelin e Lahtinen, 2015). De fato, o estado de inflamação geral que pode resultar de doenças metabólicas contribui para manter uma inflamação no periodonto e vice-versa, citocinas pró-inflamatórias produzidas na presença de periodontite contribuem para manter um estado de inflamação em todo o organismo. Bactérias periodontopatogênicas gram-negativas desencadeiam uma reação imune na cavidade oral liderada por macrófagos. As células imunes produzem citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 que aumentam a permeabilidade da barreira epitelial na cavidade oral. A ruptura da barreira permite a translocação de LPS e bactérias vivas para a corrente sanguínea, causando um fenômeno inflamatório em outros tecidos, assim como aumento da resistência à insulina (Richardson *et al*, 2013; Hasturk e Kantarci, 2015; Wu *et al*, 2015; Minty *et al*, 2019). Estas associações corroboram a plausibilidade da relação bidirecional da inflamação local e sistêmica. Nossos resultados, em conjunto, mostram que a doença periodontal induzida nos camundongos suíços não foi capaz de alterar a função metabólica dos animais, embora os tenha levado à perda de peso. A microbiota oral em desequilíbrio poderia contribuir para o agravamento de parâmetros metabólicos e as novas abordagens terapêuticas para esses pacientes poderiam incluir a microbiota como um alvo nessas estratégias, objetivando o reestabelecimento da microbiota (Minty *et al*, 2019). Uma vez que os sinais de desordens metabólicas não foram observados nos

dados, como dislipidemia, hiperglicemia, resistência à glicose, de fato não era esperado que o TNF plasmático aumentasse (Figura 15).

7. CONCLUSÃO

Animais com periodontite tratados por 20 dias com Kefir tiveram redução da perda óssea alveolar e redução do infiltrado inflamatório no periodonto. O mecanismo pelo qual este probiótico interfere na reabsorção óssea ainda é desconhecido, por isso são necessários estudos complementares a fim de identificar vias de sinalização e mecanismos complementares pelos quais os microrganismos do kefir promovem tal efeito sobre a periodontite.

Este estudo foi o primeiro a relatar influência do Kefir como um probiótico oral com efeito sistêmico no modelo de periodontite experimental pelo método da ligadura na linhagem de camundongos suíços,

O Kefir reduziu a perda de peso observada nos animais submetidos à periodontite quando comparada ao grupo sem tratamento. É, portanto, um bom candidato a probiótico oral no tratamento da periodontite, sendo necessárias padronizações de tempo e dose de administração. Permite, também, a possibilidade de isolamento de cepas para aplicações biotecnológicas em microbiologia médica.

8. REFERÊNCIAS

- Abe, T. e Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of Immunological Methods*, 394, 49–54.
- Andrade, T. U., Porto, M. L., Filete, P. F., Abdalla, D. S. P., Lima, E. M., Pereira, T. M. C. e Endringer, D. C. (2016). Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr^{-/-} mice. *Nutrition*, 35, 100-105.
- Andrews, P. C. e Krinsky, N. I. (1982). Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate. *Analytical Biochemistry*, 127, 346–350.
- Avila, M., Ojcius, D. M., e Yilmaz, Ö. (2009). The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA and Cell Biology*, 28, 405–411.
- Ayala, J.E., Samuel, V.T., Morton, G.J., Obici, S., Croniger, C.M. e McGuinness, O.P. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. NIH Mouse Metabolic Phenotyping Center Consortium. *Disease Models e Mechanisms*, 3,525-34.
- Bonito A.J., Lux, L. e Lohr, K. (2005). Impact of Local Adjuncts to Scaling and Root Planing in Periodontal Disease Therapy: A Systematic Review. *Journal of Periodontology*, 76, 1227–1236.
- Borrell, L. N. e Papapanou, P. N. (2005). Analytical epidemiology of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32, 132–158.
- Bourrie, B. C. T., Willing, B. P. e Cotter, P. D. (2016). The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–17.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Braegger, U. (2005). Cost-benefit, cost-effectiveness and cost-utility analyses of periodontitis prevention. *Journal of Clinical Periodontology*, 32, 301–313.
- Buset, S. L., Walter, C., Friedmann, A., Weiger, R., Borgnakke, W. S., e Zitzmann, N. U. (2016). Are periodontal diseases really silent? A systematic review of their effect on quality of life. *Journal of Clinical Periodontology*, 43, 333–344.
- Camargo, G. A. D. C. G., dos Santos, M. P., Silva, N. L. C., de Miranda, A. L. P., e Tributino, J. L. M. (2015). Levels of prostaglandin E₂ (PGE₂) in gingival crevicular fluid from smokers and non-smokers with gingivitis and chronic periodontal disease. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene*, 7, 54-59.
- Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Romanin, D. E., Serradell, M. A., e Urdaci, M. C. (2015). Impact of Kefir Derived *Lactobacillus kefiri* on the Mucosal Immune Response and Gut Microbiota. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1–12.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., S. Kornman, K., Mealey, B.L., Papapanou, P.N., Sanz, M. e S. Tonetti, M. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S1–S8.
- Chapple, I. L. C. e Genco, R. (2013). Diabetes and periodontal diseases: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, 106–112.
- Chapple, I. L. C., Van Der Weijden, F., Doerfer, C., Herrera, D., Shapira, L., Polak, D., Madianos, P., Louropoulou, A., Machtei, E., Donos, N., Greenwell, H., Van-Winkelhof, A.J., Kuru, B.E., Arweiler, N., Teughels, W., Aimetti, M., Molina, A., Montero, E., Graziani, F. (2015). Primary prevention of periodontitis: Managing gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42, S71–S76.
- Cortellini, P. e Tonetti, M. S. (2009). Improved wound stability with a modified minimally invasive surgical technique in the regenerative treatment of isolated interdental intrabony defects. *Journal of Clinical Periodontology*, 36, 157–163.

- Crawford, J. M., Taubman, M. A., e Smith, D. J. (1978). The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *Journal of periodontal research*, 13, 316-325.
- de Moreno de LeBlanc, A., Matar, C., Farnworth, E., e Perdigon, G. (2006). Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. *Cytokine*, 34, 1-8.
- Dias, P. A., Rosa, J. V. da, Tejada, T. S., e Timm, C. D. (2016). Propriedades antimicrobianas do kefir. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 83, 1-5.
- Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., Ikeuchi, T., Brenchley, L., Abe, T., Hurabielle, C., Martin, D., Morell, R.J., Freeman, A.F., Lazarevic, V., Trinchieri, G., Diaz, P.I., Holland, S.M., Belkaid, Y., Hajishengallis e Moutsopoulos, N. M. (2018). A dysbiotic microbiome triggers T H 17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans . *Science Translational Medicine*, 10, eaat0797.
- Sgolastra, F., Ambra-Petrucci, R. G. e Monaco, G. M. (2018). Efficacy of photodynamic therapy as adjunct treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers in Medical Science*, 33, 407-423.
- Farnworth, E. R. (2005). Kefir: a complex probiotic. *Food Science Technology Bulletin: Functional Foods*, 2, 1-17.
- Gao, J., Gu, F., Abdella, N. H., Ruan, H., e He, G. (2012). Investigation on Culturable Microflora in Tibetan Kefir Grains from Different Areas of China. *Journal of Food Science*, 77, M425-M433.
- Garcia, V.G., Knoll, L.R., Longo, M., Novaes, V.C.N., Assem, N.Z., Ervolino, E., de Toledo, B.E.C., Theodoro, T.H. (2016). Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*. 51:26-37.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G. e de Antoni, G.L. (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection*. 63, 364-369.
- Garrote, G.L., Abraham G.A., De Antoni, G. L. (2010). Microbial Inter-actions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In F. Mozzi, R. R. Raya e G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications*. 327-340.
- Garrote, G. L., Romanin, D. E., Londero, A., Diosma, G., e Rey-Burusco, M. F. (2013). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 43-53.
- Gaware, V., Kotade, K., Dolas, R., e Dhamak, K. (2011). THE MAGIC OF KEFIR : A REVIEW. History of Kefir, 386, 376-386.
- Genco, R. J. e Van Dyke, T. E. (2010). Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nature Reviews Cardiology*, 7, 479-480.
- Grudianov A.I., Dmitrieva N.A., Fomenko E.V. (2002). Use of probiotics Bifidumbacterin and Acilact in tablets in therapy of periodontal inflammations. *Stomatologiia (Mosk)*. 81, 39-43.
- Haffajee, A. D. e Socransky, S. S. (2005). Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontology 2000*, 38, 9-12.
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15, 30-44.
- Harmayani, E. (2016). Antidiabetic Potential of Kefir Combination from Goat Milk and Soy Milk in Rats Induced with Streptozotocin-Nicotinamide. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35, 847-858.
- Hasturk, H., e Kantarci, A. (2015). Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontology 2000*, 69, 255-273.

- Heitz-Mayfield, L.J., Trombelli, L., Heitz F., Needleman, I. e Moles D. (2002). A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*: 29, 92–102.
- Heller, D., Varela, V. M., Silva-Senem, M. X. E., Torres, M. C. B., Feres-Filho, E. J., e Colombo, A. P. V. (2011). Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: A 6-month RCT. *Journal of clinical periodontology*, 38, 355-364.
- Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54, S11–S26.
- Hillman J.D., Socransky S.S. e Shivers, M. (1985). The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Archives of Oral Biology*. 30: 791-795.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., e Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 322–332.
- Huseini, H. F., Rahimzadeh, G., Fazeli, M. R., Mehrazma, M., e Salehi, M. (2012). Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns*, 38, 719–723.
- Iraporda, C., Júnior, M.A., Neumann, E., Nunes, A.C., Nicoli, J.R., Abraham, A., Garrote, G.L. (2017). Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonismo against intestinal pathogens. *Journal of Dairy Research*. 84: 339-345.
- Jeong, D., Kim, D.H., Song, K.Y. e Seo, K, H. (2018). Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Lactobacillus kefirifaciens* DD2 against oral pathogens. *Journal of Oral Microbiology*. 10, 1472985
- Jordan, H. V. (1971). Usefulness and limitations of model systems in studying periodontal disease Rodent Model Systems in Periodontal Disease Research. *Journal of Dental Research*, 50, 236–242.
- Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. L., e Marcenes, W. (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *Journal of Dental Research*, 93, 1045–1053.
- Kim, D.H., Chon, J.W., Kim, H. e Seo, K.-H. (2015). Modulation of intestinal microbiota in mice by kefir administration. *Food Science and Biotechnology*, 24, 1397–1403.
- Kim, D. H., Kim, H., Jeong, D., Kang, I. B., Chon, J. W., Kim, H. S. e Seo, K. H. (2017). Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *The Journal of nutritional biochemistry*, 44, 35-43.
- Kim, D.-H., Jeong, D., Kim, H. e Seo, K.-H. (2018). Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–12.
- Kinane, D.F., Sthathopoulou, P.G. e Papapanou, P.N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews: Disease Primers*. 17038.
- Kornman, S e Page, C. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, 14, 9–11.
- Krasse, P., Carlsson, B., Dahl, C., Paulsson, A., Nilsson, A. e Sinkiewicz, G. (2006). Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swedish Dental Journal*, 30, 55-60.
- La Rivière, J. W. M., Kooiman, P. e Schmidt, K. (1967). Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archives Für Mikrobiologie*, 59, 269–278.
- Laleman, I. e Teughels, W. (2015). Probiotics in the dental practice: A review. *Quintessence International*. 46, 255-264.
- Larsen, T. e Fiehn, N.E. (2017). Dental biofilm infections – an update. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*. 125, 376–384.

- Lee, M. Y., Ahn, K. S., Kwon, O. K., Kim, M. J., Kim, M. K., Lee, I. Y., Oh, S.R. e Lee, H. K. (2007). Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology*, 212, 647–654.
- Leite, A. M. de O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T. e Paschoalin, F. (2013). Microbiological , technological and therapeutic properties of kefir : a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 349, 341–349.
- Listl, S., Galloway, J., Mossey, P. A. e Marcenes, W. (2015). Global Economic Impact of Dental Diseases. *Journal of Dental Research*, 94, 1355–1361.
- Lourenço, T.G.B., Spencer, S.J., Alm, E.J. e Colombo, A.P.V. (2018) Defining the gut microbiota in individuals with periodontal diseases: an exploratory study, *Journal of Oral Microbiology*. 10,1.
- Magalhães, K.T., Pereira, G.V.M., Dias, D.R. e Schwan, R.F. (2010). Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26, 1241-1250.
- Magalhães, K. T., de Melo Pereira, G. V., Campos, C. R., Dragone, G., e Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 693–702.
- Marcenes, W., Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Flaxman, A., Naghavi, M., Lopez, A., e Murray, C. J. L. (2013). Global burden of oral conditions in 1990-2010: A systematic analysis. *Journal of Dental Research*, 92, 592–597.
- Marchesan, J., Girnary, M. S., Jing, L., Miao, M. Z., Zhang, S., Sun, L. e Jiao, Y. (2018). An experimental murine model to study periodontitis. *Nature Protocols*, 13, 2247–2267.
- McNab, R., Wilson, M., Villedieu, A., Hunt, N., Spratt, D. A., Mullany, P., e Diaz-Torres, M. L. (2003). Prevalence of Tetracycline Resistance Genes in Oral Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 878–882.
- Meyle, J. e Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000, 69, 7–17.
- Miao, J., Guo, H., Chen, F., Zhao, L., He, L., Ou, Y., Huang, M., Zhang, Y., Guo, B., Cao, Y. e Huang, Q. (2016). Antibacterial Effects of a Cell-Penetrating Peptide Isolated from Kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 3234–3242.
- Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L., e Raoult, D. (2012). Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microbial Pathogenesis*, 53, 100–108.
- Miranda, T. S., Feres, M., Ratamal-Valdés, B., Perez-Chaparro, P. J., Maciel, S. S., e Duarte, P. M. (2017). Influence of glycemic control on the levels of subgingival periodontal pathogens in patients with generalized chronic periodontitis and type 2 diabetes. *Journal of Applied Oral Science*, 25, 82–89.
- Minty, M., Canceil, T., Serino, M., Burcelin, R., Tercé, F. e Blasco-Baque, V. (2019). Oral microbiota-induced periodontitis: a new risk fator of metabolic diseases. *Review in Endocrine and Metabolic Disorders*. 1-11.
- MMPC (2012) Manual do Centro de Fenotipagem Metabólica de Camundongos (*Mouse Metabolic Phenotyping Centers Manual*). Dispõe sobre o protocolo de testes metabólicos utiulizando modelos murinos. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3738176/pdf/nihms488126.pdf>.
- MP, S., e Bhatia, A. (2011). Role of functional foods in periodontal health and disease. *Indian Journal Of Dental Advancements*, 03, 587–592.
- Nakajima, M., Arimatsu, K., Kato, T., Matsuda, Y., Minagawa, T., Takahashi, N., Ohno, H. e Yamazaki, K. (2015). Oral administration of *P. gingivalis* induces dysbiosis of gut microbiota and impaired barrier function leading to dissemination of enterobacteria to the liver. *Plos one*, 10, e0134234.
- Nakamura, M., Ojima, T., Nakade, M., Ohtsuka, R., Yamamoto, T., Suzuki, K., e Kondo, K. (2016). Poor oral health and diet in relation to weight loss, stable underweight, and obesity in community-dwelling

- older adults: A cross-sectional study from the JAGES 2010 project. *Journal of epidemiology*, 26, 322-329.
- Nazir, M.A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, 11,72.
- Narva, M., Halleen, J., Vaananen, K. e Korpela, R. (2004a). Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on bone cells *in vitro*. *Life Sciences*. 75, 1727-1734.
- Narva, M., Collin, M., Lamberg-Allardt, C., Kärkkäinen, M., Poussa, T., Vapaatalo, H. e Korpela, R. (2004). Effects of Long-Term Intervention with *Lactobacillus helveticus*-Fermented Milk on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content in Growing Rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 48, 228–234.
- Nyman, S., Lindhe, J., e Rosling, B. (1977). Periodontal surgery in plaque-infected dentitions. *Journal of Clinical Periodontology*, 4, 240–249.
- Oliveira, L. F., Salvador, S. L., Silva, P. H., Furlaneto, F. A., Figueiredo, L., Casarin, R., Novaes Jr, A. B. (2017). Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* probiotic in experimental periodontitis. *Journal of periodontology*, 88, 197-208.
- Otles, S. e Cagindi, O. (2003). Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 54–59.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*.
- Paster, B.J., Bartoszyk, I.M. e Dewhirst, F.E. (1998). Identification of oral streptococci using PCR-based, reverse-capture, checkerboard hybridization. *Methods in Cell Science*. 20, 223–231.
- Pavithra, R. S. e Lakshmisree, S. (2015). Probiotics –A Miracle in Periodontal Therapy. *Scholars Journal of Dental Sciences*. 2, 265–269.
- Payne, J. B., Golub, L. M., Thiele, G. M. e Mikuls, T. R. (2015). The Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: A Periodontist’s Perspective. *Current Oral Health Reports*, 2, 20–29.
- Peixoto, R. S., Paschoalin, V. M. F., Leite, A. M. O., Del Aguila, E. M., Silva, J. T., Leite, D. C. A. e Miguel, M. A. L. (2013). Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science*, 96, 4149–4159.
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., e Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–10.
- Reis, S. A., Rosa, D. D., Peluzio, M. do C. G., Grześkowiak, Ł. M., Dias, M. M. S., e Conceição, L. L. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30, 82–96.
- Richardson, V. R., Smith, K. A. e Carter, A. M. (2013). Adipose tissue inflammation: feeding the development of type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology*, 218, 1497-1504.
- Roberts, A. P. e Mullany, P. (2010). Oral biofilms: A reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8, 1441–1450.
- Romano, F., Perotto, S., Castiglione, A., e Aimetti, M. (2019). Prevalence of periodontitis: misclassification, under-recognition or over-diagnosis using partial and full-mouth periodontal examination protocols. *Acta Odontologica Scandinavica*, 77, 189–196.
- Sallay, K., Sanavi, F., Ring, I., Pham, P., Behling, U. H. e Nowotny, A. (1982). Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *Journal of Periodontal Research*, 17, 263–274.
- Sanz, M. e Teughels, W. (2008). Innovations in non-surgical periodontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 3–7.

- Sanz, M. e Kornman, K. (2013). Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, 164–169.
- Sgolastra, F., Petrucci, A., Gatto, R. e Monaco, A. (2012). Efficacy of Er:YAG laser in the treatment of chronic periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *Lasers in Medical Science*, 27, 661–673.
- Shin, H.S., Baek, D.H. e Lee, S.H. (2018). Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* on the bioactivity of periodontopathogens. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 64, 55–61.
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X. e Lima, Á. S. (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152, 316–325.
- Silva, N.L.C. (2012). Estudo do perfil anti-inflamatório dos derivados nacilidrazônicos LASSBIO-930 e LASSBIO-651 em modelo de periodontite experimental em ratos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Socransky, S. S. (1970). Relationship of Bacteria to the Etiology of Periodontal Disease. *Journal of Dental Research*, 49, 203–222.
- Socransky, S. S. e Haffajee, A. D. (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology 2000*, 5, 7–25.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. e Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25, 134–144.
- Socransky, S., e Haffajee, A. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, 28, 12–55.
- Socransky, S e Haffajee, A. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38, 135–187.
- Sorsa, T., Tjäderhane, L., Kontinen, Y. T., Lauhio, A., Salo, T., Lee, H. M., Golub, L.M., Brown, D.L e Mäntylä, P. (2006). Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of Medicine*, 38, 306–321.
- Stenman, L.K., Burcelin, R. e Lahtinen, S. (2016). Establishing a causal link between gut microbes, body weight gain and glucose metabolism in humans – towards treatment with probiotics. *Beneficial Microbes*, 7, 11–22.
- Tonetti, M. S. e Van Dyke, T. E. (2013). Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, 24–29.
- Trigueirinho, R.A., Andrade, L.E.C. e Botucatu, R. (2007). Anticorpos Antiproteínas Citrulinadas e a Artrite Reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 47, 180–187.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. e Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027–1031.
- Walmsley, A. D., Lea, S. C., Landini, G. e Moses, A. J. (2008). Advances in power driven pocket/root instrumentation. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 22–28.
- Wang, Y., Xu, N., Xi, A., Ahmed, Z., Zhang, B. e Bai, X. (2009). Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 341–347.
- Weyant, R. J., Newman, A. B., Kritchevsky, S. B., Bretz, W. A., Corby, P. M., Ren, D. e Harris, T. (2004). Periodontal Disease and Weight Loss in Older Adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 52, 547–553.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T. e Britz, T. J. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15, 383–389.
- Wu, Y. Y., Xiao, E. e Graves, D. T. (2015). Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal

disease. *International Journal of Oral Science*, 7, 63–72.

Zoppi, G. (1997). Probiotics and prebiotics in the treatment of infections due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis* and of imbalance of the intestinal ecosystem (dysbiosis). *Scandinavian University Press, Acta Paediatr.* 86, 1148-1149.