

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DE *LACTOBACILLUS CASEI* NA ADERÊNCIA DE *ENTEROBACTER CLOACAE* EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA JUGAL

In vitro evaluation of the influence of *Lactobacillus casei* in the adherence of *Enterobacter cloacae* in the oral epithelial cells of oral mucosa

Letícia Emiko dos Santos Makino¹, Felipe da Silva Peralta², Alexandre Prado Scherma³, Célia Regina Gonçalves e Silva⁴, Mariella Vieira Pereira Leão³, Silvana Soléo Ferreira dos Santos³.

¹ Graduada em Biologia pela Universidade de Taubaté.

² Aluno de Pós Graduação em Odontologia pela Universidade de Taubaté.

³ Professor de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Biologia Odontológica / UnitaU, Taubaté - São Paulo.

⁴ Professor de Microbiologia, Instituto Básico de Biociências / UnitaU, Taubaté - São Paulo.

Recebimento: 29/08/14 - Correção: 24/09/14 - Aceite: 06/11/14

RESUMO

Probióticos são bactérias que apresentam efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, devido à capacidade de modular a resposta imune e melhorar as propriedades da microbiota intestinal. A maior eficácia dos probióticos tem sido relacionada à capacidade de adesão à superfície da mucosa e células epiteliais prevenindo a instalação de patógenos. O presente trabalho teve por objetivo verificar, *in vitro*, a aderência de *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus casei* e sua associação em células epiteliais da mucosa jugal. Em um pool de células epiteliais da mucosa jugal (10^5 céls/mL) previamente preparadas foram adicionadas suspensões ($1,5 \times 10^8$ céls/mL) de *L. casei*, *E. cloacae* e de ambos. Após incubação, células e microrganismos foram filtrados e a partir da membrana filtrante, foram obtidas células com microrganismos aderidos, das quais foram confeccionados esfregaços corados pelo método de Gram. Foram avaliadas cem células realizando-se contagem do número de bactérias aderidas às mesmas. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste *t* de Student. A aderência de *L. casei* às células epiteliais da mucosa jugal foi superior a de *E. cloacae* quando incubadas isoladamente ($p = 0,0175$) ou quando associadas ($p = 0,0000$). A associação entre *L. casei* e *E. cloacae* reduziu ($p = 0,0000$) a aderência de *E. cloacae*, portanto, *L. casei* apresentou, *in vitro*, aderência favorável às células da mucosa e interferiu negativamente na aderência de *E. cloacae*.

UNITERMOS: mucosa bucal, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus casei*, probióticos. R Periodontia 2014; 24:15-21.

INTRODUÇÃO

Agentes probióticos são definidos como microrganismos viáveis que apresentam efeitos benéficos à saúde do hospedeiro após ingestão, devido à melhoria das propriedades da microbiota intestinal e modulação da resposta imune. Entre os microrganismos com propriedades probióticas estão bactérias ácido-lácticas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produtos fermentados (Havenaar & Huis in't Veld, 1992). Probióticos podem ser bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou culturas bacterianas não definidas, geralmente compostas por um ou mais dos seguintes microrganismos: *Lactobacillus*, *Streptococcus*,

Bifidobacterium, *Bacillus* ou leveduras (Mulder, 1991).

Lactobacillus casei é um bacilo gram-positivo membro da família *Lactobacillaceae* e da ordem *Lactobacillales*. Vive comensalmente na microbiota intestinal e pode modular a resposta imunológica inata desta mucosa, responsabilizando-se por desencadear respostas anti-inflamatórias (Tien, *et al.*, 2006). Este microrganismo pode prevenir infecções entéricas e estimular secreção de Imunoglobulina A (IgA) e vem sendo utilizado com sucesso em probióticos, na produção de leite, queijos e inúmeros produtos alimentícios comercializados (Havenaar & Huis in't Veld, 1992).

Enterobacter cloacae é um bacilo gram-negativo

pertencente à família Enterobacteriaceae. O trato gastrointestinal é o reservatório endógeno comum desses microrganismos, os quais têm sido isolados em 65% a 75% das amostras de espécimes clínicos de pacientes hospitalizados. O microrganismo não é considerado residente na cavidade bucal, entretanto, foi a espécie mais comumente isolada entre microrganismos gram-negativos em indivíduos adultos com periodontite avançada (Slots *et al.*, 1991). O *E. cloacae* é resistente a antibióticos como ampicilina e eritromicina, podendo causar bacteremia de difícil controle, o que faz com que esse microrganismo seja muito pesquisado, na tentativa de desenvolver mecanismos que visem sua contenção e prevenção (Summers *et al.*, 1993).

Microrganismos patogênicos podem colonizar estruturas anatômicas da cavidade bucal, como amígdalas, língua e mucosas. Há um crescente interesse em espécies bacterianas não encontradas comumente no biofilme subgengival, como indicadores ou possíveis contribuintes para a patogênese da doença periodontal, principalmente em indivíduos que não respondem ou que respondem pobremente ao tratamento periodontal (Haffajee & Socransky, 2000).

Apesar da maioria das pesquisas serem desenvolvidas no trato gastrointestinal, a cavidade bucal tem sido sugerida como um local relevante para a aplicação de probióticos. Teughels *et al.*, 2013 concluíram que a administração oral de pastilhas com *L. reuteri* pode ser indicada no tratamento da periodontite crônica juntamente com o procedimento de raspagem e aplainamento radicular.

Além disso, a microbiota bucal residente é diversa e está composta por espécies com diferentes necessidades nutricionais, atmosféricas e físico-químicas. As doenças bucais são geralmente consequência de mudanças na ecologia local. Se o ambiente for perturbado, os patógenos potenciais podem ganhar em competitividade, multiplicar-se e predispor o aparecimento de doenças. A administração de probióticos pode beneficiar a saúde oral prevenindo o aumento da microbiota nociva e modulando a imunidade dos tecidos (Munoz & Alarcon, 2010).

O efeito imunomodulador de determinadas substâncias químicas utilizadas na terapia da doença periodontal é uma qualidade relevante. Os probióticos fazem parte dessa categoria de substâncias, podendo exercer grande efeito anti-inflamatório e direcionando a resposta imune para o periodontopatógeno (Juiz *et al.* 2010).

Com a finalidade de buscar alternativas que substituam os antibióticos e auxiliem no controle das infecções microbianas, vários estudiosos têm proposto a utilização dos probióticos (Vivekananda *et al.*, 2010; Souza, 2010; Souza *et al.*, 2011; Schabussova *et al.*, 2012).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar a aderência *in vitro* de *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus casei* e sua associação em células epiteliais da mucosa jugal.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho teve aprovação do comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté (CEP/UNITAU n°230/06).

Foi utilizada cepa padrão de *Lactobacillus casei* (ATCC 1464) e cepa de *Enterobacter cloacae* pertencente à Coleção de Culturas da Universidade de Taubaté (CCUT 01001). *L. casei* foi semeado em ágar Lactobacilli MRS (DIFCO, Detroit, Michigan, EUA), incubado a 37°C por 48 horas, com 5% de CO₂ e após este período, semeado em caldo Lactobacilli MRS (DIFCO, Detroit, Michigan, EUA) e incubado à 37°C por 24 horas, com 5% de CO₂. *E. cloacae* foi semeado em ágar MacConkey (DIFCO, Detroit, Michigan, EUA) e incubado em estufa bacteriológica à 37°C por 24 horas.

Após 24 horas de incubação, a cultura de *L. casei* em caldo foi transferida para um tubo tipo Falcon esterilizado e centrifugada a 1800Xg por 15 minutos e o sobrenadante desprezado. Foi acrescentado ao depósito 5 mL de PBS (solução fisiológica tamponada com fosfato, pH 7,4) esterilizado, agitado em agitador de tubos (Vortex, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) por 30 segundos e então centrifugado a 1800Xg por 15 minutos. Os procedimentos foram realizados três vezes. Depois de lavados e o sobrenadante desprezado foi feita uma suspensão, acrescentando-se 10 mL de PBS, obtendo suspensão compatível ao padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1,5 x 10⁸ células/mL). Para definir o valor preciso do número de microrganismos desta suspensão foram realizadas diluições seriadas (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶) e em seguida 0,1 mL de cada diluição foi semeada em duplicata em ágar Lactobacilli MRS com auxílio de alça de Drigalsky e incubada por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de incubação as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e o número de células/mL calculado, obtendo-se um valor de 1,69 x 10⁸ células/mL.

A suspensão de *E. cloacae* foi obtida a partir de colônias puras isoladas em ágar MacConkey. Para obter a suspensão foram colocados 10 mL de PBS em tubo de ensaio (16 x 100 mm) e quantidades de *E. cloacae* necessárias até atingir aproximadamente 1,5 x 10⁸ células/mL, o que corresponde ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Para definir o valor preciso do número de microrganismos desta suspensão foram realizadas diluições seriadas (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶) e posteriormente 0,1 mL de cada diluição semeada em duplicata em ágar MacConkey. A incubação do *E. cloacae* foi realizada em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C.

As unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e o número células/mL calculado, obtendo-se o valor de $1,78 \times 10^8$ células/mL.

As células epiteliais da mucosa jugal foram obtidas de dez voluntários, a fim de se obter concentração de 10^5 células/mL. A coleta foi realizada com suave raspagem da mucosa jugal utilizando espátula de madeira descartável e esterilizada. As células obtidas na coleta foram colocadas em tubo tipo Falcon contendo 2 mL de PBS esterilizado, obtendo um *pool* de células epiteliais que foram lavadas por três vezes com PBS esterilizado com centrifugações a $1800 \times g$ por cinco minutos cada. Após a lavagem, o sobrenadante foi desprezado e a partir do depósito foi preparada uma suspensão contendo 10^5 células por mL. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer.

Em um tubo de ensaio (16 x 100 mm) foi colocado 1 mL da suspensão de células de *L. casei* e 1 mL da suspensão de células epiteliais da mucosa jugal que foram incubados por uma hora à 37°C , com 5% de CO_2 . Em outro tubo de ensaio (16 x 100 mm) foi colocado 1 mL da suspensão de células de *E. cloacae* e 1 mL da suspensão de células epiteliais da mucosa jugal, que foram incubados por uma hora à 37°C em estufa bacteriológica e, em outro tubo de ensaio (16 x 100 mm) foi colocado 1 mL da suspensão de células de *E. cloacae*, 1 mL da suspensão de *L. casei* e 2 mL da suspensão de células epiteliais, que também foram incubadas por uma hora à 37°C com 5% de CO_2 .

Após o período de incubação foi realizada a filtragem da suspensão de *L. casei* e células epiteliais utilizando um sistema de filtração (Millipore Corporation, Bedford, MA.) para membrana millipore (filtro 12,0 um KTP4 700 Millipore®). Depois de filtrada a suspensão, 5 mL de PBS esterilizado foi passado pelo filtro e a membrana transferida para uma placa de Petri esterilizada com auxílio de pinça esterilizada. Na placa de Petri a membrana foi lavada com 2 mL de PBS obtendo-se a suspensão final. A suspensão de *E. cloacae* e células epiteliais assim como a suspensão da associação entre *E. cloacae*, *L. casei* e células epiteliais foram também submetidas ao processo de filtragem descrito anteriormente.

A partir de cada suspensão final, foram confeccionados esfregaços. A suspensão final foi transferida com alça de platina esterilizada para lâminas de microscopia, espalhado suavemente e após seco e fixado, os esfregaços foram corados pelo método de Gram. Foram contados os microrganismos aderidos a cem células epiteliais para cada experimento, ou seja, *L. casei* e células epiteliais, *E. cloacae* e células epiteliais, e para a associação de *L. casei*, *E. cloacae* e células epiteliais (baseado em SILVA, 2005).

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste

t de Student com nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Na tabela 1 observa-se o total de células de *L. casei* e *E. cloacae* aderidas em cem células epiteliais da mucosa jugal. A análise estatística utilizando o teste *t* de Student (amostras independentes) mostra que a aderência de *L. casei* foi significativamente maior do que a aderência de *E. cloacae*.

| | Número total de microrganismos | X | σ |
|-------------------|---------------------------------------|----------|----------------------------|
| <i>L. casei</i> | 705* | 7,05 | 10,27 |
| <i>E. cloacae</i> | 415 | 4,15 | 6,65 |

*teste *t* de Student onde $p=0.0175$

x = média; σ = desvio padrão

Quando realizada a aderência da associação de *L. casei* e *E. cloacae* em células epiteliais da mucosa jugal foi encontrado um total de aderência de *L. casei* superior ao de *E. cloacae*. A análise estatística utilizando o teste *t* de Student (amostras pareadas) mostra que a aderência de *L. casei* às células epiteliais da mucosa jugal foi superior a de *E. cloacae* quando realizada a associação ($p=0,0000$) (Tabela 2).

| | Número total de microrganismos | X | σ |
|-------------------|---------------------------------------|----------|----------------------------|
| <i>L. casei</i> | 504* | 5,04 | 5,52 |
| <i>E. cloacae</i> | 85 | 0,85 | 1,26 |

*teste *t* de Student onde $p=0.0000$

x = média; σ = desvio padrão

DISCUSSÃO

Probióticos podem ser bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou culturas bacterianas não definidas geralmente compostas por um ou mais dos seguintes microrganismos: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* ou leveduras. São usados para prevenir e tratar distúrbios no metabolismo gastrointestinal, promotores de crescimento, imunostimulantes e inibidores da carcinogênese pela inibição de enzimas pró-carcinogênica ou estimulação do sistema

imunitário do hospedeiro. A administração de *L. casei* foi relacionada com a indução de resposta antitumoral mediada por células T e ativação de macrófagos (Kato *et al.*, 1988). Além disso, os probióticos podem sintetizar substâncias que afetam o metabolismo dos patógenos, como ácidos orgânicos voláteis, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (Villani *et al.*, 1995; Rodriguez, 1996; Naidu *et al.*, 1999; Audisio *et al.*, 2000; Jin *et al.* 2000; Ogawa *et al.*, 2001).

Os microrganismos probióticos podem atuar competindo com microrganismos patogênicos pelos sítios de fixação ou por nutrientes, impedindo sua ação transitória. No estudo conduzido por Edens *et al.*, 1997, verificou-se que bactérias ácido lácticas podem controlar populações de bactérias patogênicas como *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Listeria*, produzindo substâncias tal como reuterina. A reuterina é uma substância produzida por *L. reuterii*, de baixo peso molecular, não protéica, solúvel, que possui um amplo espectro antimicrobiano. Forestier *et al.*, 2001 também verificaram que a presença de bactérias ácido lácticas pode inibir a adesão de Enterobacteriaceae, mas nesse caso, devido à produção de biosurfactantes (emulsificadores de hidrocarbonetos produzidos por algumas bactérias, bolores e leveduras) por esses microrganismos.

O presente estudo verificou a aderência de *Enterobacter cloacae* em células epiteliais da mucosa jugal. Este microrganismo foi escolhido por ser o membro da família Enterobacteriaceae de maior prevalência na cavidade bucal, bolsa periodontal e região posterior do dorso da língua humana (Santos *et al.*, 2002; Conti, 2005). De acordo com Sedgley *et al.*, 1995 há diferenças significativas na aderência de diferentes espécies de Enterobacteriaceae às células Hela; *E. cloacae* foi a espécie que demonstrou maior aderência, enquanto *Klebsiella pneumoniae* a menor, independentemente do período de incubação.

E. cloacae não é considerado residente da cavidade bucal, entretanto, em estudo realizado em indivíduos adultos com periodontite avançada, foi a espécie mais comumente isolada entre os microrganismos gram-negativos recuperados (Slots *et al.*, 1991). Além disso, *E. cloacae* é resistente a antibióticos como ampicilina e eritromicina, que são recomendados e frequentemente utilizados no tratamento de infecções odontológicas, podendo dessa forma afetar a eficácia do tratamento (Summers *et al.*, 1993).

A aderência de microrganismos às células é um importante pré-requisito para o processo de colonização (Beachey, 1981). Alguns trabalhos de aderência utilizando células de linhagens especiais, como células Hela (células neoplásicas derivadas de carcinoma de cérvix) (Sedgley *et al.*, 1994), células

intestinais Henle 407 (células epiteliais derivadas do jejuno e íleo embrionário humano) (Ronka *et al.*, 2003) e células intestinais CaCO-2 (células derivadas de adenocarcinoma de cólon humano) (Tuomola & Salminen, 1998; Forestier *et al.*, 2001) foram descritos na literatura na tentativa de comprovar essa relação. Em estudo comparativo sobre aderência de bactérias ácido-lácticas e enterobactérias em células epiteliais intestinais, Lee *et al.*, 2000 também verificaram que tanto *L. casei* quanto *E. coli* (enterobactéria) tem capacidade de aderir às células epiteliais, podendo competir pelo mesmo sítio de aderência ou pelo mesmo receptor de superfície da célula hospedeira. De acordo com Fuller (1977) é possível o controle de *E. coli*, por bactérias ácido lácticas, desde que haja no mínimo 10 Unidades Formadoras de colônia por grama (UFC/g) de material coletado, para testes *in vitro*. Forestier *et al.* (2001) relataram que *L. casei rhammosus* interferiu no processo de aderência de microrganismos patogênicos em células intestinais humanas (CaCO₂) e demonstraram que a aderência de enteropatógenos como *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* foi diminuída quando incubados junto com *L. casei rhammosus*. No presente estudo foram utilizadas suspensões de microrganismos (*L. casei* e *E. cloacae*) contendo 10⁸ céls/mL para realizar o procedimento *in vitro* de aderência.

Uma significativa aderência de *L. casei* em relação à aderência de *E. cloacae* em células epiteliais da mucosa jugal foi demonstrada neste estudo. As bactérias probióticas competem com as bactérias que causam injúrias à saúde (MEURMAN & STAMATOVA, 2007) e podem ser capaz de inibir a colonização, adesão e formação do biofilme patogênico, trazendo benefícios para o hospedeiro (STAMATOVA & MEURMAN, 2009). Os probióticos têm sido utilizados como auxiliares no tratamento da doença cárie, candidose oral, halitose e na doença periodontal. Assim, é possível considerar que com uma menor colonização de bactérias periodontopatogênicas, a cascata de reações imuno-inflamatórias pode também ser reduzida, e os probióticos utilizados como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. Estudo realizado por Teughels *et al.*, 2013 verificaram essa relação e concluíram que a utilização de pastilhas contendo *L. reuteri* pode ser indicada no tratamento da periodontite crônica juntamente com o procedimento de raspagem e aplainamento radicular. Essas evidências a respeito dos benefícios decorrentes do uso de probióticos justificam os estudos sobre o modo de ação desses microrganismos e também sua utilização como profiláticos e promotores de crescimento (Villani *et al.*, 1995; Rodriguez, 1996; Naidu *et al.*, 1999; Audisio *et al.*, 2000; Jin *et al.* 2000; Ogawa *et al.*, 2001).

Ishikawa (2003) em um estudo com *Lactobacillus* mostrou que a utilização dos mesmos reduziu a inflamação gengival e

diminuiu a contagem de cepas de Pg na saliva e em amostras de placa subgengival. E, Krasse *et al* (2006) demonstraram que pacientes portadores de gengivite de moderada a severa obtiveram uma melhora significativa de sua condição quando se utilizou o *Lactobacillus reuteri*.

Riccia *et al* (2007) estudando os efeitos antiinflamatórios de *Lactobacillus brevis* em pacientes portadores de periodontite crônica, observaram uma diminuição significativa nos níveis de Prostaglandina E2 (PGE2) e de Metaloproteinase da Matrix (MMP).

Shimazaki *et al* (2008) relacionaram pacientes com saúde periodontal e o consumo de leite e seus derivados (queijo e iogurte) e perceberam que aqueles que consumiam diariamente tais produtos tinham menor profundidade de sondagem e menos perda de inserção clínica quando comparados com aqueles que não faziam uso diário dos mesmos.

Shimauchi *et al* (2008), em um ensaio duplo cego com pacientes fumantes e ex-fumantes portadores de periodontite severa, avaliou a eficácia do probiótico. Para tal ele utilizou pastilhas contendo *Lactobacillus salivarius* e observou no grupo experimental uma redução significativa nos índices de placa e profundidade de sondagem quando comparados ao grupo controle que usou apenas o placebo.

A maior eficácia dos probióticos tem sido ultimamente caracterizada pela capacidade que esses microrganismos têm em aderir na superfície da mucosa, assim como em células epiteliais prevenindo a instalação de patógenos (Alander *et al.*, 1997; Kirjavainen *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Jhonsson *et al.*, 1992; Todoriki *et al.*, 2001; Mukai *et al.*, 2002;).

Sendo assim, trabalhos devem ser realizados com o intuito de verificar se a interação *in vivo* de *L. casei* e *E. cloacae* segue o mesmo padrão da interação *in vitro* descrita no presente trabalho. Além disso, poderão ser realizados estudos complementares de aderência em células epiteliais da mucosa jugal, utilizando *L. casei* associados a outras Enterobacteriaceae, visto que, *L. casei* é um microrganismo que causa efeitos benéficos à saúde humana e pode ser isolado a partir de produtos lácteos fermentados.

CONCLUSÃO

A aderência de *Lactobacillus casei* às células epiteliais da mucosa jugal foi significativamente maior que a aderência de *Enterobacter cloacae* às mesmas células. Além disso, *L. casei* interferiu negativamente na aderência de *E. cloacae* o que *in vivo* poderá resultar no controle de algumas patologias, inclusive na doença periodontal, já que os probióticos

apresentam um importante papel na modulação da resposta imune. No entanto, mais estudos deverão ser realizados para elucidar o mecanismo de ação destes probióticos.

ABSTRACT

Probiotics are beneficial bacteria that have effects on the health of the host due to the ability to modulate the immune response and improve the properties of the intestinal microbiota. The greater efficacy of probiotics has been related to their capacity to adhere to the mucosal surface epithelial cells and preventing the onset of pathogens. The aim of this work was to verify, *in vitro*, the adherence of *Enterobacter cloacae* and *Lactobacillus casei*, alone or associated, to the epithelial cells of the human oral mucosa. Suspensions of *L. casei* and/or *E. cloacae* were incubated with a suspension of epithelial cells, filtered through a membrane and the retained material was transferred to glass sheets and stained by the Gram method. One hundred epithelial cells were analyzed for counting of the adhered bacteria. The results were compared and analyzed using Student t test. It was observed that the adherence of *L. casei* to the epithelial cells was higher than the adherence of *E. cloacae*, when incubated alone ($p = 0.0175$) or associated ($p = 0.0000$). *L. casei* was also able to reduce significantly the adherence of *E. cloacae* to oral epithelial cells. In conclusion, *L. casei* has more ability to adhere to epithelial cells, *in vitro*, suggesting that this microorganism could compete and probably avoid the colonization of *E. cloacae* on oral mucosa.

UNITERMS: Mouth mucosa. *Lactobacillus casei*. *Enterobacter cloacae*. Bacterial adhesion.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Havenaar R, Huis In't Veld, MJH. Probiotics: a general view. In: Wood BJB. Lactic acid bacteria in health and disease. Amsterdam: Elsevier Applied Science; 1992. p.151-170.
- 2- Mulder RWA. Probiotics as a tool against Salmonella contamination. Misset World Poutry 1991; 7: 36-37.
- 3- Tien MT, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppée JY et al. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on Shigella-infected human intestinal epithelial Cells. J Immunol 2006; 176: 3841.
- 4- Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. J Periodontol 1991; 62: 543-547.
- 5- Summers AO, Wireman J, Vimy MJ, Lorscheider FL, Marshall B, Levy SB et al. Mercury released from dental silver fillings provokes an increased in Mercury and antibiotic resistance bacteria in oral and intestinal floras of primates. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 825-834.
- 6- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 5: 78-111.
- 7- Teughels W, Durukan A, Ozcelic O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of Lactobacillus reuteri probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. J Clin Periodontol 2013; 40: 1025-1035.
- 8- Munoz SK, Alarcón PM. Efecto de los probióticos en las condiciones periodontales. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral 2010; 3: 136-139.
- 9- Juiz PJJ, Alves RJ, Barros TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. Braz J Pharmacognosy 2010; 20: 134-139.
- 10- Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. J Oral Microbiol 2010; 2: 1-9.
- 11- Souza CVA. Efeitos do uso diário sobre os níveis salivares de *Streptococos* do grupo *Mutans* e *Lactobacilos* em adultos [dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Estácio de Sá; 2010.
- 12- Souza CVA, Junior RH, Uzeda M, Weyne SC. Efeitos do consumo diário de probiótico sobre a microbiologia cariogênica. Rev Bras Odontol 2011; 68: 128-131.
- 13- Schabussova I, Hufnagl K, Tang MLK, Hoflehner E, Wagner A, Loupal G et al. Perinatal maternal administration of *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 prevents allergic inflammation in mouse model of birch pollen allergy. Plos one 2012. Disponível em URL: <http://www.plosone.org>.
- 14- Silva CRG. Correlação do estado secretor de antígenos de grupos sanguíneos do sistema ABO(H) e Candida spp na cavidade bucal [tese de Doutorado]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista; 2005.
- 15- Kato I, Yokokura T, Mutai M. Correlation between increase in la-bearing macrophages and induction of T cell dependent antitumor activity by *Lactobacillus casei* in mice. Cancer Immunol Immunother 1988. 26: 215-221.
- 16- Villani F, Pepe O, Mauriello G, Salzano G, Moschetti G, Coppola S. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. Int J Food Microbiol 1995; 25: 179-190.
- 17- Rodriguez JM. Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. Food Sci Technol Int 1996; 2: 61-68.
- 18- Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit Rev Food Sci Nutr 1999; 39: 13-126.
- 19- Audisio MC, Oliver G, Apella MC. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*. J Food Prot 2000; 63: 1333-1337.
- 20- Jin LZ, Marquardt RR, Baidoo SK. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. J Sci Food Agric 2000; 80: 619-624.
- 21- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S et al. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. Int J Food Microbiol 2002; 74: 167.
- 22- Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhammonosus* in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res. Microbiol 2001; 152: 167-173.
- 23- Santos SSF, Loberto JCS, Martins CAP, Jorge AOC. Prevalence and in vitro sensibility of the Enterobacteriaceae and pseudomonas isolated from the oral cavity and periodontal pockets in patients with chronic periodontitis. Pós-Grad Rev Odontol 2002; 5: 74-83.
- 24- Conti S. Presença de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na região posterior do dorso da língua de indivíduos adultos [dissertação de Mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté; 2005.
- 25- Sedgley CM, Samaranayake LP, Darvell BW. The adherence of oral isolates of Enterobacteriaceae to Hela cells. An in vitro method using image analysis. APMIS 1995; 104: 39 - 46.
- 26- Beachey EH. Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J Infect Dis 1981; 143: 325-345.
- 27- Sedgley CM, Samaranayake LP. Oral and oropharyngeal prevalence of *Enterobacteriaceae* in humans: a review. J Oral Pathol Med 1994; 23: 104-113.
- 28- Ronka E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A. Probiotic and Milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. Int J Food Microbiol 2003; 83: 63-74.
- 29- Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy

- Lactobacillus strains to CaCO₂ cell cultures. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 45-51.
- 30- Lee JC, Koerten H, Broek PVD, Beekhuizen H, Wolterbeek R, Barselaar MVD et al. Adherence of *Actinobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol* 2005; 157: 360-366.
- 31- Fuller R. The importance of *Lactobacilli* in maintaining normal microbial balance in the crop. *Br Poult Sci* 1977; 18: 85-94.
- 32- Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis* 2007; 13: 443-51.
- 33- Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontol* 2000 2009; 51: 141-51.
- 34- Ishikawa H, Aiba Y, Nakanishi M, Oh-Hasahi Y, Koga Y. Suppression of periodontal pathogenic bacteria by the administration of *Lactobacillus salivarius* T12711. *J Jap Soc Periodontol* 2003; 45: 105-112.
- 35- Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J* 2006; 30: 55-60.
- 36- Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trinchieri V, Amicosanti G et al. Antiinflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis* 2007; 13: 376-85.
- 37- Shimazaki Y, Shirota T, Uchida K, Yonemoto K, Kiyohara Y, Lida M. Intake of dairy products and periodontal disease: the Hisayama study. *J Periodontol* 2008; 79: 131-137.
- 38- Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minambuchi M, Ito Y, Yamaki K et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* 39-39-WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 897-905.
- 39- Alander M, Korpela R, SAXELIN M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, Von Wright A. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24: 361-364.
- 40- Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 167: 185-189.
- 41- Jin LZ, Marquardt RR, Baidoo SK. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. *J Sci Food Agriculture* 2000; 80: 619-624.
- 42- Lee YK, Lim CY, Teng WL, Ouwehand AC, Tumolae EM, Salminen S. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with Enterobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 3692-3697.
- 43- Johansson ML, Nobaek S, Berggren A, Nyman M, Björck I, Åhrne S et al. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843(299v) and effect on the short-fatty acid content of feces after ingestion of a rocs-hip drink with fermented oats. *Int J Food Microbiol* 1992; 55: 157-189.
- 44- Todoriki K, Mukao T, Sato S, Toba T. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J. Appl. Microbiol* 2011; 91: 154-159.
- 45- Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 105-110.

Endereço para correspondências:
Silvana Soléo Ferreira dos Santos
Av. Tiradentes, 500 – Instituto Básico de Biociências
CEP: 12030-180
Tel.: 55-12-363534661
E-mail: silvana.soleo@uol.com.br