

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

FERNANDA DE LIMA PONTES

**PROBIÓTICOS MODULAM A EXPRESSÃO DE BETA DEFESINAS NA
PERIODONTITE APICAL INDUZIDA: ESTUDO *IN VIVO***



Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para conclusão do curso de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Leopoldo Cosme Silva, DDS, Professor do Setor de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas.

MACEIÓ-AL

2021-1

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

P814p Pontes, Fernanda de Lima.

Probióticos modulam a expressão de beta defesinas na periodontite apical induzida: estudo *in vivo* / Fernanda de Lima Pontes. – 2022.

23 f. : il. color.

Orientador: Leopoldo Cosme Silva.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Odontologia. Maceió, 2022 .

Bibliografia: f. 19-20.

Apêndices: f. 22-23.

1. Probióticos. 2. Periodontite apical. 3. Endodontia. I. Título.

CDU: 616.314

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui nunca foi um sonho, se me perguntassem 5 anos atrás onde eu gostaria de estar agora talvez minha resposta não fosse “me formando em odontologia”, mas sim “fazendo algo que me faça feliz”. Felizmente encontrei alegria nessa trajetória, nunca imaginei vibrar ao ver um canal bem feito numa radiografia, ou sofrer por fazer uma exodontia evitável, tampouco imaginei estar realizando um sonho fazendo isso hoje.

Tudo isso se tornou um sonho a cada dia, a cada sorriso agradecido de um paciente, a cada bom professor que me ensinava algo novo e me fazia imaginar um futuro que eu jamais projetara antes na minha vida, a cada nova experiência que me fez sentir viva!

Nada disso seria possível sem as pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe, Ana Paula, e meu pai, James Morse, minha irmã, Patrícia, e toda a minha família que incentivaram, apoiaram, sustentaram e, principalmente, confiaram e investiram em mim. Espero estar orgulhando vocês e agradecendo tudo que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus amigos, especialmente Samantha, Marcus e Yasmin e ao grupo Sonhar Mais um Sonho, que nunca me deixaram desistir, me incentivaram, me escutaram e fizeram essa caminhada mais leve, sem vocês eu certamente não teria chegado até aqui com toda essa saúde mental e me divertido tanto no caminho.

Ao meu marido, Michael, que segurou minha mão, enxugou minhas lágrimas, me incentivou e revisou muitas produções, muito obrigada! Com você ao meu lado tudo isso ficou mais fácil.

Por fim, ao meu orientador, Leopoldo, onde encontrei sabedoria, confiança, segurança e leveza. Não imagino forma melhor de exercer esse papel diferente da que você faz! Minha carreira está para sempre marcada pela sua passagem, que espero que se torne uma parceria profissional nos anos futuros.

Hoje digo a quem perguntar que aqui realizo o sonho da Fernanda de 16 anos, estou me formando para continuar fazendo o que descobri que me faz feliz, obrigada aos envolvidos, amo vocês!

LISTA DE SIGLAS

GC	Grupo controle
GCP	Grupo complexo probiótico
hBD-2	Beta defensina humana -2
hBD-3	Beta defensina humana -3
IL	Interleucina
PA	Periodontite apical
UFC	Unidades formadoras de colônias

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica	19
Gráfico 1 – Scores para hBD-2	20
Gráfico 2 – Scores para hBD-3	20

MANUSCRITO

PROBIÓTICOS MODULAM A EXPRESSÃO DE BETA DEFESINAS NA PERIODONTITE APICAL INDUZIDA: ESTUDO *IN VIVO*

Autores:

Fernanda de Lima Pontes¹, Leopoldo Cosme Silva²,

¹Aluna de graduação do curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, Maceió, AL, 57072-900, Brasil – fernanda_lima.21@hotmail.com

²Professor da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, Maceió, AL, 57072-900, Brasil – leopoldocosme@gmail.com

Autor correspondente: Leopoldo Cosme Silva

Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, Maceió, AL, 57072-900, Brasil – leopoldocosme@gmail.com

Conflito de interesses: Os autores declaram não ter conflito de interesse.

RESUMO

Os probióticos são micro-organismos que, quando administrados em doses adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro modulando a resposta imunoinflamatória. A Periodontite Apical (PA) é uma patologia que ocorre no osso alveolar causando uma reação inflamatória. Como consequência, as células secretam citocinas inflamatórias e ocorre também a expressão de β -defensina 2 (hBD-2) e a β -defensina 3 (hBD-3), que são peptídeos antimicrobianos do sistema imune inato. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de hBD-2 e hBD-3 após a administração de complexo probiótico em ratos com PA induzida. Foi induzida a PA por meio de exposição pulpar e administrado um complexo probiótico da GNC (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterim animalis subspecies lactis* and *Lactobacillus plantarum*) durante 30 dias. Após a eutanásia, foi realizado cortes histológicos para avaliação da expressão da hBD-2 e hBD-3 através de imunohistoquímica. Os níveis de β -defensina humana 2 (hBD-2) e β -defensina humana 3 (hBD-3) foram significativamente mais elevados no grupo que recebeu o complexo probiótico em comparação com o grupo controle. ($P < .05$). A suplementação com probióticos teve efeito significativo no aumento da expressão de β -defensinas humanas -2 e -3 na periodontite apical induzida em ratos

PALAVRAS-CHAVE: Endodontia, Lesão Periapical, Probiótico.

ABSTRACT

Probiotics are microorganisms that, when administered in adequate doses, confer health benefits for the host by modulating the immune-inflammatory response. Apical Periodontitis (AP) is a pathology that occurs in the alveolar bone causing an inflammatory reaction. As a consequence, cells secrete inflammatory cytokines and β -defensin 2 (hBD-2) and β -defensin 3 (hBD-3) are also expressed, which are antimicrobial peptides of the innate immune system. The aim of this study was to evaluate the expression of hBD-2 and hBD-3 after administration of a probiotic complex in rats with induced AP. PA was induced by pulp exposure and a probiotic complex from GNC (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterim animalis subspecies lactis* and *Lactobacillus plantarum*) was administered for 30 days. After euthanasia, histological sections were made to evaluate the expression of hBD-2 and hBD-3 through immunohistochemistry. The levels of human β -defensin 2 (hBD-2) and human β -defensin 3 (hBD-3) were significantly higher in the group that received the probiotic complex compared to the control group. ($P < .05$). Supplementation with probiotics had a significant effect on increasing the expression of human β -defensins -2 and -3 in induced apical periodontitis in rats

KEYWORDS: Endodontics, Periapical Lesion, Probiotic.

SUMÁRIO

MANUSCRITO	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	11
MÉTODOS.....	12
<i>Modelo experimental.....</i>	<i>12</i>
<i>Cálculo amostral.....</i>	<i>12</i>
<i>Indução da periodontite apical.....</i>	<i>12</i>
<i>Terapia probiótica.....</i>	<i>12</i>
<i>Análise imuno-histoquímica.....</i>	<i>13</i>
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO.....	16
CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
REFERÊNCIAS.....	19
APÊNDICES.....	21
Apêndice A – Parecer de aprovação CEUA.....	22
Apêndice B – Declaração CEUA UFAL	23

INTRODUÇÃO

O processo patogênico da Periodontite Apical (PA) pode ser iniciado por uma injúria (normalmente bacteriana) provocando uma resposta inflamatória. Uma vez que o sistema imunológico não consegue eliminar o agente causador, ocorrem respostas sucessivas para restringir a área infectada (formando uma barreira circunscrita) e evitando sua difusão^{1,2}. Os avanços técnicos na terapia endodôntica é uma realidade, porém ainda assim há uma constante demanda por desenvolvimento de terapias adjuntas e o uso de bactérias benéficas, como por exemplo os probióticos, tem sido alvo de estudos^{3,4}. Estudos com o uso destas bactérias em doença periodontal mostraram resultados animadores a respeito das propriedades destes micro-organismos^{5,6}.

O efeito dos probióticos na resposta imune tem sido amplamente estudado e os resultados sugerem que eles podem estimular o sistema imune específico e o inespecífico. Os efeitos positivos no sistema imune são caracterizados pelo não desencadeamento de uma resposta inflamatória exagerada, sendo mediada pela ativação de macrófagos, aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, aumento da expressão de β -defensina 2 (hBD-2) e a β -defensina 3 (hBD-3), aumento da atividade de células *natural killer* e dos níveis de imunoglobulinas^{7,8}.

A hBD-2 e hBD-3 são pequenos peptídeos antimicrobianos catiônicos do sistema imune inato, as quais são expressas quando há uma estimulação pela presença de um micro-organismo. Inicialmente foram encontradas sendo produzidas por células epiteliais, porém já é sugerido que sejam produzidas também por osteoblasto. A expressão de hBD-2 e hBD-3 é detectável em osso saudável e é elevada em osso com infecção crônica, o que sugere importante papel protetor durante uma invasão bacteriana^{9,10}.

Apesar de nem todos os probióticos possuírem propriedades quando usados isoladamente, a resposta imunológica pode ser melhorada quando um ou mais deles são consumidos concomitantemente. Estudos comprovavam que a associação de *Lactobacillus* com *Bifidobacterium* tem sido benéfica devido a ação sinérgica desses probióticos^{11,12}. Portanto, se faz necessário avaliar o efeito da administração sistêmica da associação de *Lactobacillus* com *Bifidobacterium* no desenvolvimento da periodontite apical induzida em ratos.

MÉTODOS

Modelo experimental

Foram utilizados dezesseis ratos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* machos, jovens-adultos com peso entre 200 e 250 g, submetidos a um ciclo claro-escuro de (12 h cada, período claro 7:00-19:00h), com água e alimentação *ad libitum* (comitê de ética: 516-2017)^{13,14,17}. A parte experimental foi realizada na Universidade Estadual Paulista (FOA-UNESP) em parceria com a Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os protocolos que foram conduzidos neste projeto seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Cálculo amostral

O tamanho da amostra foi baseado em dados de estudos prévios^{13,14}. Considerando o poder de um erro alpha de 0.05 e 95% de reconhecer uma diferença significativa de 1 em pontuações medianas, o mínimo de 7 animais por grupo é considerado necessário. Levando em consideração a possibilidade de morte de animais, um animal foi adicionado a cada grupo, resultando em oito ratos por grupo, totalizando 16 animais.

Indução da periodontite apical

Os ratos foram anestesiados via intramuscular com cetamina (87mg/kg) e xilazina (13mg/kg). Os animais tiveram o tecido pulpar coronal exposto e desorganizado através da abertura de um acesso coronário no primeiro molar inferior, usando uma broca carbide esférica de 0,5mm de diâmetro. O tecido pulpar coronário foi exposto e mantido exposto a cavidade oral até a eutanásia^{3,13,14}.

Terapia probiótica

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=8): ratos com periodontite apical e dieta normal (Controle); ratos com periodontite apical e dieta normal suplementada com complexo probiótico da GNC (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterim animalis subspecies lactis* and *Lactobacillus plantarum*) (CODE 424639) General Nutrition Centers, Inc., Nova York, United States.

Começando do primeiro dia de indução da PA, o complexo foi administrado oralmente via gavagem. Uma cápsula do complexo probiótico corresponde a um bilhão de unidades formadoras de colônia (UFC) diluída em 5 ml de água e administrado diariamente para os animais durante o período de desenvolvimento da periodontite apical (30 dias). Os animais do grupo controle receberam 5ml de água (sem probiótico)¹⁵.

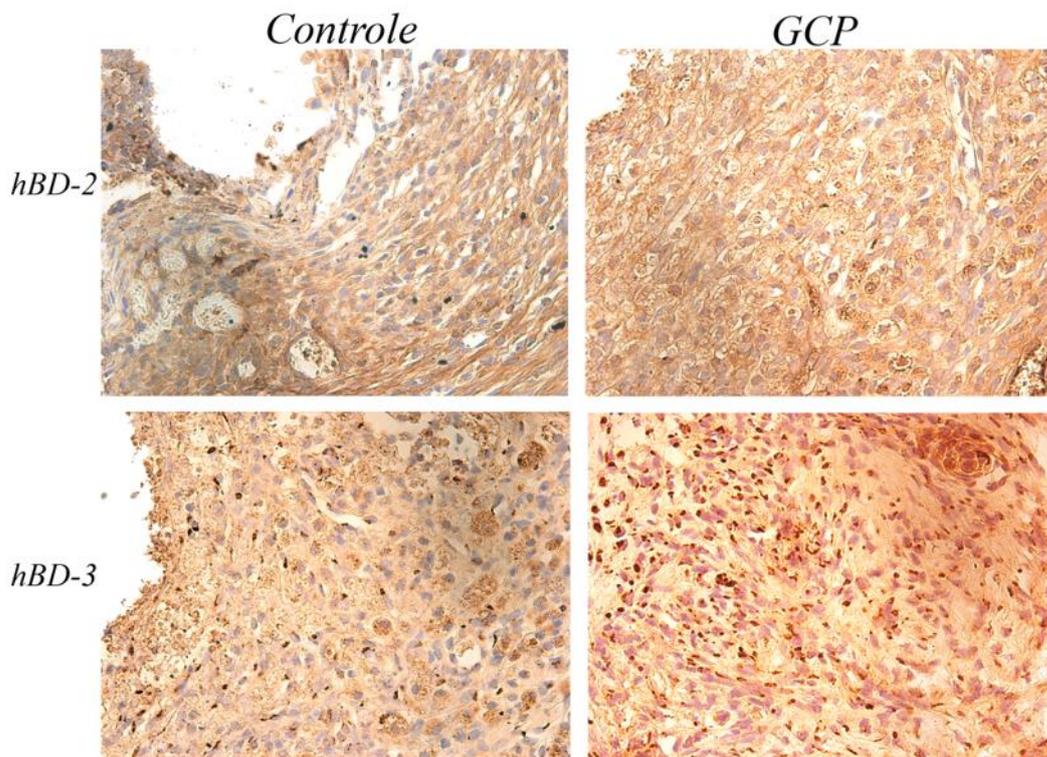
Análise imuno-histoquímica

A marcação imunológica dos cortes histológicos foi realizada por meio de técnica de imunoperoxidase indireta^{3,14,16}. Os cortes histológicos foram organizados em seis lotes, e cada lote foi incubado com anticorpos primários. A análise semiquantitativa foi realizada utilizando a raiz distal. Foram utilizados três cortes histológicos para cada animal e a imunoreatividade positiva (IR) foi definida como uma cor acastanhada no citoplasma das células e na matriz extracelular. A intensidade da marcação imunológica da matriz extracelular foi analisada de forma semiquantitativa para atribuir as seguintes pontuações: 1 = ausência completa de células imunorreativas; 2 = IR baixo (algumas células imunorreativas e marcação fraca da matriz extracelular; aproximadamente um quarto das células imunorreativas); 3 = IR moderada (um número moderado de células imunorreativas e marcação moderada da matriz extracelular; aproximadamente metade das células imunorreativas); 4 = IR alta (um grande número de células imunorreativas e forte marcação da matriz extracelular; aproximadamente três quartos de células imunorreativas)¹³.

RESULTADOS

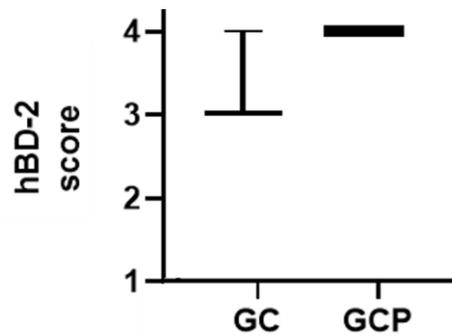
Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, EUA). O teste de Mann-Whitney foi realizado e o nível de significância foi de 5%. A Figura 1 mostra imagens da imuno-histoquímica da região apical no grupo controle (GC) e complexo probiótico (GCP). A imunomarcação de β -defensina 2 (hBD-2) e β -defensina 3 (hBD-3) foram significativamente maiores no grupo GCP em comparação com o grupo GC ($P < .05$).

Figura 1 – Fotomicrografia representando a imunomarcação das regiões periapicais. A expressão de hBD-2 e hBD-3 aumentou no GCP quando comparado ao GC. Aumento original: 400X



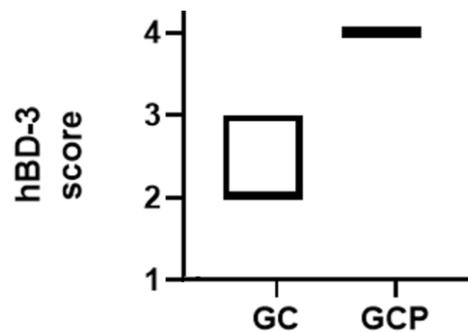
Fonte: Autoria própria

Gráfico 1 – representação dos scores médios para hBD-2 no GC e no GCP



Fonte: Autoria própria

Gráfico 2 – representação dos scores médios para hBD-3 no GC e no GCP



Fonte: Autoria própria

Pode-se observar o aumento das hBD-2 e hBD-3 nos GCP quando comparados com o GC. Nas amostras do grupo controle coradas com anticorpos para hBD-2 a mediana dos scores foi de 3, indicando um número moderado de células imunorreativas e marcação moderada da matriz extracelular; aproximadamente metade das células imunorreativas. No GCP da hBD-2 o score mediano foi de 4, representado um grande número de células imunorreativas e forte marcação da matriz extracelular; aproximadamente três quartos de células imunorreativas.

Para hBD-3 a mediana dos scores do GC foi de 2, indicando algumas células imunorreativas e marcação fraca da matriz extracelular; aproximadamente um quarto das células imunorreativas apenas, já para o GCP a mediana foi de 4, uma alta quantidade de células imunorreativas.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o efeito da administração sistêmica de um complexo probiótico na expressão das β defensina -2 e -3. Para o conhecimento dos autores, esse é o primeiro que estuda que avalia a relação probiótico *versus* PA *versus* β defensina -2 e -3.

Para isso, foi utilizado o método de indução da PA em ratos através de exposição pulpar por 30 dias¹⁷. De acordo com a literatura, o processo patogênico da PA em ratos é similar ao processo em humanos⁷. Além disso, o objetivo foi avaliar a inflamação na fase crônica, portanto após 30 dias não se observa mais sinais de inflamação aguda local ou sistêmica que possa influenciar a análise¹⁸.

A cavidade oral é um meio microbiológico na qual diversos fatores como a má higiene bucal, tempo, imunodeficiências e dieta podem desencadear um processo infeccioso levando a doenças de natureza polimicrobiana de difícil manejo. O uso de probióticos demonstra ter efeito positivo em diversas doenças orais, como a candidíase oral, cárie e doença periodontal. Isso ocorre, pois os probióticos tem a capacidade de diminuir a quantidade de UFC de patógenos orais¹⁹.

Estudos anteriores mostraram que *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*, administrados separadamente, influenciaram no desenvolvimento da periodontite apical^{3,17}. Os probióticos podem inibir a atividade bacteriana, modificar o sistema imune através da regulação de citocinas pró-inflamatórias, assim como modificar a proliferação celular e apoptose²⁰. No presente estudo com o uso de um complexo probiótico obtivemos uma melhora na resposta imune pelo aumento na expressão das β defensina humanas -2 e -3.

As β -defensinas humanas (hBD) -2 e -3 são peptídeos antimicrobianos conhecidos por serem eficazes em uma ampla gama de bactérias²¹. Como parte do sistema imunológico inato, eles estabilizam a barreira epitelial contra a invasão bacteriana por seu alto número de aminoácidos hidrofóbicos que interagem com a membrana aniônica da bactéria. Estudos apontam que esse processo ocorre por meio dos receptores Toll-like -2 e -4, que reconhecem padrões específicos de componentes microbianos. Os receptores Toll-like atuam nas células dendríticas (células apresentadoras de antígenos), resultando na expressão de células Th1 ou Th2 que fagocitam patógenos intracelulares e extracelulares, respectivamente. Os probióticos

podem causar uma sobrerregulação e indução da expressão de β -defensinas humanas no tecido epitelial em contato com bactérias, principalmente em resposta às interleucinas (IL) -1 α , -1 β e interferon- γ ²².

Este estudo demonstrou potencial terapêutico dos probióticos na periodontite apical. Os probióticos elevaram a expressão das β defensinas -2 e -3, reduzindo a severidade da inflamação, o que poderia resultar, clinicamente, em um processo de reparo apical mais rápido em pacientes em tratamento endodôntico. São necessários novos estudos para melhor compreensão sobre o uso dos probióticos para a PA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os dados obtidos nesse estudo, podemos inferir que a suplementação com probióticos teve efeito significativo no aumento da expressão de β -defensinas humanas -2 e -3 na periodontite apical, demonstrando potencial terapêutico em pacientes com necessidade de tratamento endodônticos.

REFERÊNCIAS

1. Kawashima, N; Okiji, T; Kosaka, T; Suda, H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod.* 1996;22(6):311-6
2. Austah, O.N; Ruparel, N.B; Henry, M.A; Fajardo, Rj; Schmitz, J.E; Diogenes, A. Capsaicin-sensitive Innervation Modulates the Development of Apical Periodontitis. *J Endod.* 2016;42(10):1496-502
3. Cosme Silva, L; Dal-Fabbro, R; Cintra, L.T.A; Dos Santos, V.R; Duque, C; Ervolino, E *et al.* Systemic administration of probiotics reduces the severity of apical periodontitis. *Int Endod J.* 2019;52(12):1738-49.
4. Bohora, A.A; Kokate, S.R; Khedkar, S; Vankudre, A. Antimicrobial activity of probiotics against endodontic pathogens:- A preliminary study. *Indian J Med Microbiol.* 2019 Jan-Mar;37(1):5-11.
5. Araya MM, L; Reid, G; Sanders, M. E.; Stanton, C. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002.
6. Invernici, M.M; Salvador, S.L; Silva, P.H.F; Soares, M.S.M; Casarin, R; Palioto, D.B *et al.* Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2018;45(10):1198-210
7. Takeda, K; Okumura, K; Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity. *J Nutr.* 2007;137(3 Suppl 2):791S-3S. 11. (WARNKE, PH *et al.* 2006)
8. Klein, A; Friedrich, U; Vogelsang, H; Jahreis, G; *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62(5):584-93.
9. Taefehshokr, N; Isazadeh, A; Oveisi, A; Key, Y. A; Taefehshokr, S. Reciprocal role of hBD2 and hBD3 on the adaptive immune response by measuring T lymphocyte proliferation in terms of CD4 and CCR6 expression. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation.* 2018.
10. Lee, P. H., Chen, M. Y., Lai, Y. L., Lee, S. Y., & Chen, H. L. Human Beta-Defensin-2 and -3 Mitigate the Negative Effects of Bacterial Contamination on Bone Healing in Rat Calvarial Defect. *Tissue Engineering - Part A*, 2018, 24(7–8), 653–66.
11. Kopp-Hoolihan, L; Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc.* 2001;101(2):229-38; quiz 39-41.

12. Calder, P.C; Kew, S. The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr.* 2002;88 Suppl 2:S165-77
13. Azuma, M.M; Gomes-Filho, J.E; Prieto, A.K.C; Samuel, R.O; De Lima, V.M.F; Sumida, D.H *et al.* Diabetes increases interleukin-17 levels in periapical, hepatic, and renal tissues in rats. *Arch Oral Biol.* 2017;83:230-5.
14. Dal-Fabbro, R; Marques-De-Almeida, M; Cosme Silva, L; Ervolino, E; Cintra, L.T.A; Gomes-Filho, J.E. Chronic alcohol consumption increases inflammation and osteoclastogenesis in apical periodontitis. *Int Endod J.* 2019;52(3):329-36.
15. Ricoldi, M.S.T; Furlaneto, F.A.C; Oliveira, L.F.F; Teixeira, G.C; Pischiotini, J.P; Moreira, A.L.G *et al.* Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179946.
16. Gomes Filho, J.E; Wayama, M.T; Dornelles, R.C; Ervolino, E; Coclete, G.A; Duarte, P.C *et al.* Effect of raloxifene on periapical lesions in ovariectomized rats. *J Endod.* 2015;41(5):671-5.
17. Cosme-Silva, L; Dal-Fabbro, R; Cintra, L.T; Ervolino, E; Piazza, F; Bomfim, S.M, *et al.* Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *Int Endod J.* 2020;53(8):1084-92. doi: 10.1111/iej.13311
18. Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiology and Immunology* 1994;9, 129-35.
19. Seminario-Amez M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22(3):e282-e288. Published 2017 May 1. doi:10.4317/medoral.21494
20. Geier, M.S; Butler, R.N; Howarth, G.S Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol.* 2007;115(1):1-11. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.006
21. Beck-Broichsitter, B. E., Dau, H., Moest, T., Jochens, A., Stockmann, P., Wiltfang, J., & Becker, S. T. (2015). Immunohistological expression of human β -defensin-1 and human β -defensin-2 in exacerbation of acute and secondary chronic osteomyelitis of the mandible. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 44(2), 88–93. <https://doi.org/10.1111/jop.12202>
22. Warnke, P. H; Springer, I. N; Russo, P. A. J; Wiltfang, J; Essig, H; Kosmahl, M, *et al.* (2006). Innate immunity in human bone. *Bone*, 38(3), 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.09.003>

