

LIDIANE CRISTINA MACHADO COSTA

**EFEITO DA TERAPIA PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICA
SOBRE A EXPRESSÃO DE BETA DEFENSINA-1 E ÍNDICES
GLICÊMICOS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE
CRÔNICA SAUDÁVEIS E PORTADORES DE DIABETES
MELLITUS TIPO 2**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2016**

Lidiane Cristina Machado Costa

**EFEITO DA TERAPIA PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICA
SOBRE A EXPRESSÃO DE BETA DEFENSINA-1 E ÍNDICES
GLICÊMICOS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE
CRÔNICA SAUDÁVEIS E PORTADORES DE DIABETES
MELLITUS TIPO 2**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, área de concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Otávio de Miranda Cota

Co-orientadora: Prof. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Faculdade de Odontologia – UFMG

Belo Horizonte

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

C837e
2016
T

Costa, Lidiane Cristina Machado.
Efeito da terapia periodontal não cirúrgica sobre a expressão de beta defensina-1 e índices glicêmicos em indivíduos com periodontite crônica saudáveis e portadores de diabetes mellitus tipo 2 / Lidiane Cristina Machado Costa. – 2016.

157 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Luís Otávio de Miranda Cota
Coorientadora: Prof. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Gerais,
Faculdade de Odontologia.

1. Beta-Defensinas. 2. Diabetes Mellitus. 3. Periodontite Crônica.
4. Terapêutica. I. Cota, Luís Otávio de Miranda. II. Zandim-Barcelos,
Daniela Leal. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Odontologia. IV Título.

BLACK – D047

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”
Nelson Mandela

APOIO FINANCEIRO

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz e Luzia, por me ensinarem o valor do estudo e me incentivarem a aprimorar constantemente. Todas minhas conquistas são reflexos das orações, do incentivo, da ajuda e do amor incondicional de vocês!!! Em especial à minha mãe, pela extrema dedicação em todos os momentos, principalmente nestes últimos meses. Amo muito vocês!!!

À minha filha, Esther, a estrela que chegou para iluminar este último ano de Doutorado e me estimular ainda mais a concluir esta etapa tão sonhada da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar a minha vida e abençoar a minha trajetória de estudos.

Ao meu marido Carlos Eduardo, pelo amor, companheirismo e parceria que me fazem tão bem. Te amo muito!!!

Ao meu irmão Luiz, meu amigo, pela torcida e por sempre ter acreditado em mim.

Ao Prof. Dr. Luís Otávio de Miranda Cota, pela apoio, dedicação e imensa contribuição com este estudo. Sempre terei comigo seu exemplo de pesquisador e profissional. Muito obrigada por ser o melhor orientador!

À Prof. Dra. Daniela Zandim-Barcelos, por ser uma co-orientadora muito presente e ter sido responsável para o desenvolvimento deste estudo desde o projeto, além de ter sido essencial durante a fase laboratorial. Agradeço também a forma hospitaleira como me recebeu em Araraquara.

Ao Prof. Dr. José Eustáquio da Costa, exemplo de dedicação à Periodontia, muito obrigado por ter sido responsável por eu realizar este estudo. Muito obrigada pela confiança e privilégio do convívio!

Ao Prof. Dr. Fernando de Oliveira Costa, exemplo de dinamismo, agradeço a grande contribuição à este estudo. Você é um exemplo a ser seguido!

Aos professores: Telma Campos Medeiros Lorentz, João Batista Magalhães e Marcus Guimarães, pelos conhecimentos compartilhados durante o estágio docente.

À Prof. Dra. Tarcília Aparecida Silva, pela disponibilidade e ajuda com o uso do laboratório.

Aos médicos Dra. Marina Horta e Dr. Marcos Valério, pela confiança e contribuição ao encaminhar pacientes para participarem do estudo.

Ao Douglas, que considero um amigo, pela alegria e ajuda durante as coletas dos nossos estudos.

À Camila, pela grande ajuda durante as coletas e tratamento dos pacientes dos nossos projetos. Juntamente com o Douglas, formamos um ótimo trio de trabalho!

À equipe do laboratório de Biologia Molecular da UNESP-Araraquara pela colaboração e aprendizado durante a fase laboratorial deste estudo.

À todos os pacientes que participaram deste estudo, pela contribuição com a pesquisa .

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de odontologia da UFMG, pela oportunidade e apoio durante a realização deste estudo.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro à este estudo.

Aos queridos colegas da pós-graduação em Periodontia: Rafael, Douglas, Camila, Juliana, Thais, Renata, Milena, Rodrigo, Bernardo, Bárbara, Sérgio Diniz, Fabiano, Sérgio Antonucci, pela convivência e troca de experiências.

Aos familiares e amigos, pela energia boa, pensamento positivo e alegria.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO 24

2 EMBASAMENTO CIENTÍFICO 27

2.1 Periodontite e susceptibilidade 27

2.2 Diabetes Mellitus e periodontite 29

2.3 Beta-defensinas humanas 30

3 OBJETIVOS 35

3.1 Objetivos gerais 35

3.2 Objetivos específicos 35

4 HIPÓTESES 37

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 39

6 ARTIGOS CIENTÍFICOS 40

6.1 Artigo Científico 1 40

Expressão de beta-defensina humana 1 no fluido gengival em indivíduos com e sem periodontite crônica.

6.2 Artigo Científico 2 59

Efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão de beta-defensina humana 1 no fluido gengival em indivíduos com e sem periodontite crônica.

6.3 Artigo Científico 3 78

Expressão de beta-defensina humana 1 no fluido gengival de indivíduos com periodontite crônica portadores de diabetes mellitus compensados e descompensados.

6.4 Artigo Científico 4 100

Efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre os níveis de beta-defensina humana 1 em indivíduos portadores de diabetes mellitus compensados e descompensados.

6.5 Artigo Científico 5 118

Efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre os índices glicêmicos de indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados: um ensaio clínico controlado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 137

8 REFERÊNCIAS 139

ANEXOS 152

LISTA DE ABREVIATURAS

COEP UFMG – Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

DM – Diabetes Mellitus

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

FCG – Fluido crevicular gengival

G – Indivíduos com gengivite

g – Sítios com gengivite

H – Indivíduos saudáveis

h – Sítios saudáveis

HbA1c – Hemoglobina glicada A1c

hBDs – Beta Defensinas humanas

hBD-1 – Beta defensina 1

hBD-2 – Beta defensina 2

hBD-3 – Beta defensina 3

IL-1 β – Interleucina-1 Beta

IL-6 – Interleucina-6

LPS – Lipopolissacarídeo

MMPs – Metaloproteinases de Matriz

NIC – Nível de inserção clínica

P – Indivíduos com periodontite

p – Sítios com periodontite

PC – Periodontite crônica

PDMc – Indivíduos com periodontite e diabetes mellitus compensados

PDMd – Indivíduos com periodontite e diabetes mellitus descompensados

pg/ml – Picograma/mililitro

PS – Profundidade de sondagem

RAR – Raspagem e alisamento radicular

RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

SS – Sangramento à sondagem

T0 – Baseline (previamente ao tratamento periodontal não-cirúrgico)

T1 – 2 meses após o tratamento periodontal não-cirúrgico

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral-alfa

LISTA DE TABELAS

Artigo Científico 1

Tabela 1. 58

Correlação entre parâmetros clínicos periodontais de indivíduos com periodontite e os níveis de beta defensina 1 (hBD-1) em sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp).

Artigo Científico 2

Tabela 1. 75

Caracterização periodontal da amostra no baseline (T0) e após terapia periodontal não-cirúrgica (T1).

Artigo Científico 3

Tabela 1. 95

Caracterização periodontal dos grupos do estudo.

Artigo Científico 4

Tabela 1. 117

Comparação dos parâmetros periodontais entre o baseline (T0) e 2 meses após a terapia periodontal não-cirúrgica (T1).

Artigo Científico 5

Tabela 1. 135

Caracterização da amostra em relação a variáveis sócio-demográficas de interesse.

Tabela 2. 136

Comparação dos parâmetros periodontais entre o baseline (T0) e 2 meses após a terapia periodontal não-cirúrgica (T1).

Tabela 3. 137

Caracterização dos índices glicêmicos no baseline (T0) e 2 meses após a terapia periodontal não-cirúrgica (T1).

LISTA DE FIGURAS

Artigo Científico 1

Figura 1. 56

Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis em indivíduos saudáveis (H) e indivíduos com periodontite (P).

Figura 2. 57

Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite em sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp).

Artigo Científico 2

Figura 1. 76

Comparação dos níveis de hBD-1 (pg/ml) nos indivíduos com periodontite nos sítios saudáveis (Pp), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp) entre o baseline (T0) e 2 meses após terapia não-cirúrgica (T1).

Figura 2. 77

Comparação dos níveis de hBD-1 (pg/ml) entre sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp) nos indivíduos com periodontite 2 meses após terapia não-cirúrgica (T1) e sítios saudáveis (Hh) de indivíduos saudáveis (controle).

Artigo Científico 3

Figura 1. 96

Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis (h), com gengivite (g), e com periodontite (p) nos diferentes grupos.

Figura 2. 97

Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis em indivíduos saudáveis (H), indivíduos com periodontite (P), indivíduos com periodontite e diabetes mellitus compensados (PDMc) e indivíduos com periodontite e diabetes mellitus descompensados (PDMd).

Figura 3. 98

Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios com gengivite em indivíduos saudáveis (H), indivíduos com periodontite (P), indivíduos com periodontite e diabetes mellitus compensados (PDMc) e indivíduos com periodontite e diabetes mellitus descompensados (PDMd).

Figura 4. 99

Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios com periodontite em indivíduos saudáveis (H), indivíduos com periodontite (P), indivíduos com periodontite e diabetes mellitus compensados (PDMc) e indivíduos com periodontite e diabetes mellitus descompensados (PDMd).

Artigo Científico 4

Figura 1.

118

Comparação dos níveis de hBD-1 (pg/ml) nos sítios saudáveis (h), sítios com gengivite (g) e sítios com periodontite (p) entre o baseline (T0) e 2 meses após terapia não-cirúrgica (T1) para os indivíduos com periodontite e diabetes mellitus compensados (PDMc) e descompensados (PDMd).

RESUMO

Efeito da terapia periodontal não cirúrgica sobre a expressão de beta defensina-1 e índices glicêmicos em indivíduos com periodontite crônica saudáveis e portadores de diabetes mellitus tipo 2

As beta defensinas humanas (hBDs) podem ter um papel chave na susceptibilidade às doenças na cavidade bucal. Além do efeito antimicrobiano direto, as hBDs aumentam a imunidade adaptativa. Condições de glicose elevada, *in vitro*, mostraram ser capazes de inibir a expressão de hBDs e contribuir para a ocorrência de doenças infecciosas associadas com feridas diabéticas. O presente estudo teve como objetivos avaliar a expressão de beta defensina 1 (hBD-1) no fluido crevicular gengival (FCG) de indivíduos saudáveis (H), indivíduos com periodontite crônica (P), e indivíduos com periodontite crônica e portadores de diabetes mellitus compensados (PDMc) e descompensados (PDMd). Além disso, avaliar a influência da terapia periodontal não-cirúrgica (TPNC) nesta expressão e no controle glicêmico. Assim, esta tese foi dividida em 5 estudos, sendo: 1) estudo transversal para avaliar a expressão de hBD-1 no FCG de H e P; 2) estudo de intervenção para avaliar o efeito da TPNC sobre a expressão de hBD-1 no FCG de H e P; 3) estudo transversal para avaliar a expressão de hBD-1 no FCG de H, P e PDMc e PDMd; 4) estudo de intervenção para avaliar o efeito da TPNC sobre a expressão de hBD-1 no FCG de PDMc e PDMd; 5) ensaio clínico controlado para avaliar o efeito da TPNC sobre os índices glicêmicos de PDMc e PDMd. A amostra global foi composta por 80 indivíduos, sendo: 20 H, 20 P, 20 PDMc, e 20 PDMd. Amostras de FCG foram coletadas de sítios saudáveis (h), sítios com gengivite (g) e periodontite (p) do mesmo indivíduo, totalizando 800 amostras de FCG, no baseline

(T0) e após 2 meses da TPNC (T1). Glicemia em jejum e hemoglobina glicada (HbA1c) foram registradas em T0 e T1. A quantificação de hBD-1 foi realizada pelo teste ELISA sanduíche. No estudo 1, os níveis de hBD-1 em Hh foram maiores que em Ph. Em P, não houve diferença significativa nos níveis de hBD-1 entre todos os sítios. No estudo 2, a TPNC aumentou os níveis de hBD-1 em todos os sítios de P. No estudo 3, não foram observadas diferenças significativas intragrupo. Foram encontradas diferenças significativas entre Hh vs. Ph, Ph vs. PDMc(h), Hh vs. PDMd(g), Pg vs. PDMc(g), Hh vs. Pp, Hh vs. PDMd(p) e Pp vs. PDMc(p). No estudo 4, PDMc(p) foi significativamente maior em T1 em relação a T0. Em indivíduos do grupo PDMd, não foram encontradas diferenças significativas em todos os sítios entre T1 e T0. No estudo 5, houve melhora significativa nos parâmetros periodontais de T0 para T1 em ambos os grupos PDMc e PDMd. Houve uma redução significativa da HbA1c no grupo PDMd de T0 para T1. Dessa forma, os resultados indicam que a expressão de hBD-1 em indivíduos com periodontite parece ser menor em relação aos indivíduos saudáveis, sugerindo um potencial papel protetor na hBD-1 na susceptibilidade à periodontite crônica. A TPNC foi capaz de aumentar os níveis de hBD-1 em indivíduos com periodontite em todos os sítios, além de promover uma redução da HbA1c em indivíduos diabéticos descompensados.

Palavras-chave: Beta-defensinas, Diabetes mellitus, Periodontite crônica, Terapia periodontal não-cirúrgica.

ABSTRACT

Effect of nonsurgical periodontal therapy on the beta defensin-1 expression and glycemic indexes in individuals with chronic periodontitis and healthy and with diabetes mellitus type 2

The human beta defensins (hBDs) may have a key role in susceptibility to diseases in the oral cavity. In addition to direct antimicrobial effect, the hBDs increase adaptive immunity. High glucose conditions in vitro, shown to be capable of inhibiting the expression of hBDs and contribute to the occurrence of infectious diseases associated with diabetic wounds. This study aimed to evaluate the beta defensins 1 (hBD-1) expression in gingival crevicular fluid (GCF) in healthy subjects (H), individuals with chronic periodontitis (P), and individuals with chronic periodontitis and diabetes mellitus compensated (PDMc) and decompensated (PDMd). Furthermore, the influence of non-surgical periodontal therapy (NSPT) in this expression and glycemic control. Thus, this thesis is divided into 5 studies, as follows: 1) cross-sectional study to assess hBD-1 expression in FCG of H and P; 2) intervention study to evaluate the effect of NSPT on the hBD-1 expression in GCF of H and P; 3) cross-sectional study to assess hBD-1 expression in FCG of H, P, PDMc and PDMd; 4) intervention study to evaluate the effect of NSPT on the hBD-1 expression in FCG of PDMc and PDMd; 5) controlled clinical trial to evaluate the effect of NSPT on the glycemic indexes of PDMc and PDMd. The overall sample consisted of 80 individuals, been: 20 H, 20 P, 20 MCDP, and 20 PDMd. GCF samples were collected from healthy sites (h) sites with gingivitis (g) and periodontitis (p) of the same individual, totaling 800 samples of GCF, at baseline (T0) and after 2 months of NSPT (T1). Fasting glucose and glycated hemoglobin (HbA1c) were recorded at T0

and T1. The quantitation of hBD-1 was carried out by sandwich ELISA. In study 1, hBD-1 levels in Hh were higher than in Ph. In P, there was no significant difference in the levels of hBD-1 among all sites. In study 2, the NSPT increased hBD-1 levels in all sites of P. In study 3, significant intra-group differences were observed. Significant differences were found between Hh vs. Ph, Ph vs. PDMc(h), Hh vs. PDMd(g), Pg vs. PDMc(g), Hh vs. Pp, Hh vs. PDMd(p) e Pp vs. PDMc(p). In the study 4, PDMc(p) was significantly higher in T1 relative to T0. In individuals PDMd group, no significant differences were found at all sites between T1 and T0. In the study 5, there was significant improvement in periodontal parameters from T0 to T1 in both PDMc and PDMd groups. There was a significant reduction in HbA1c from T0 to T1 in PDMd group. Thus, the results indicate that the hBD-1 expression in individuals with periodontitis appears to be lower compared to healthy individuals, suggesting a potential protective role in hBD-1 susceptibility to chronic periodontitis. The NSPT was able to increase the hBD-1 levels in individuals with periodontitis in all sites, and to promote a reduction in HbA1c in decompensated diabetics.

Keywords: Beta-defensins, Diabetes Mellitus, Chronic Periodontitis, Non-surgical periodontal therapy.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite crônica é uma doença inflamatória infecciosa dos tecidos de suporte dentário, envolvendo ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar, com perda progressiva de sustentação, em diferentes níveis de gravidade e extensão. Em decorrência do seu caráter multifatorial, a periodontite pode ter seu início e sua progressão modificada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo fatores sistêmicos específicos como o Diabetes Mellitus (DM) (EBERHARD *et al.*, 2008).

O DM é um grupo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, a qual é o resultado da deficiência total ou parcial na secreção de insulina e/ou resistência do organismo a sua ação (AMOS *et al.*, 1997). Estima-se que 346 milhões de indivíduos sejam portadores de DM e, segundo a previsão da World Health Organization (WHO), este número aumentará para 439 milhões de pessoas, aproximadamente 10% de adultos, em 2030 (WHO, 2011).

O DM tem sido associado a muitas patologias bucais, incluindo alterações no fluxo salivar e componentes da saliva, o aumento da incidência de doenças infecciosas, alterações nos processos de cicatrização e aumento da prevalência e gravidade da periodontite (MEALEY & MORITZ, 2003). Loe (1993) sugeriu que a periodontite é a sexta complicação mais frequente do DM e a maior parte das evidências indica uma maior frequência e gravidade de periodontite em indivíduos com DM (TAYLOR, 2001; TAYLOR & BORGNACKE, 2008).

O pobre controle metabólico do DM tem um efeito prejudicial sobre as funções normais das células, tais como quimiotaxia, fagocitose e a produção e secreção de citocinas nos tecidos periodontais de pacientes com DM (DELAMAIRE *et al.*, 1997). Os níveis elevados de produtos finais da glicólise, em portadores de DM, podem conferir efeitos prejudiciais sobre os fibroblastos e as células endoteliais (ALIKHANI *et al.*, 2005). O número de microrganismos aumenta em tecidos periodontais de pacientes com DM, devido à produção e à secreção reduzidas de citocinas por leucócitos, e devido aos níveis mais baixos de quimiotaxia e fagocitose (MEALEY & OATES, 2006).

Componentes da resposta imune inata, como as beta defensinas humanas (hBDs), podem ter um papel chave na susceptibilidade às doenças na cavidade bucal. Além do efeito antimicrobiano direto, estes peptídeos são quimiotáticas para células fagocitárias e mastócitos, induzem mediadores inflamatórios, regulam eventos inflamatórios iniciais e aumentam a imunidade adaptativa. A expressão apropriada de beta defensinas pode contribuir para a manutenção da homeostasia periodontal, possivelmente pelo seu efeito antimicrobiano e promoção de respostas imunes adaptativas (JOLY *et al.*, 2005). A beta defensina 1 (hBD-1) parece ter um papel significativo na proteção dos tecidos periodontais contra microrganismos (GURSOY & KONONEN, 2012).

Condições de glicose elevada, *in vitro*, mostraram ser capazes de inibir a expressão de hBDs e contribuir para a ocorrência de doenças infecciosas associadas com feridas diabéticas (LAN *et al.*, 2011). Evidências sugerem que níveis mais elevados de hBDs são liberados em tecidos de indivíduos portadores de DM, tratados com insulina, quando comparados a indivíduos não tratados. Adicionalmente, tem sido também

demonstrado que níveis elevados de hiperglicemia são capazes de reduzir a expressão de hDBs em células epiteliais (LAN *et al.*, 2011).

Em contrapartida aos efeitos negativos do pobre controle metabólico da DM sobre a periodontite, evidências também têm demonstrado um efeito negativo da infecção periodontal sobre o controle metabólico do DM (TAYLOR *et al.*, 1996; DEMMER *et al.*, 2012, MORITA *et al.*, 2012). Além disso, o tratamento periodontal parece reduzir os índices glicêmicos em indivíduos portadores de DM (GAY *et al.*, 2014, KOROMANTZOS *et al.*, 2011).

Desta forma, avaliar a expressão de hBD-1 em indivíduos saudáveis, indivíduos com periodontite crônica e portadores de DM compensados e descompensados poderia elucidar melhor alguns aspectos etiopatogênicos e de susceptibilidade à periodontite. Além disso, avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre os níveis de hBD-1 e os índices glicêmicos de indivíduos portadores de DM poderia ajudar a compreender melhor a relação entre a periodontite e o controle metabólico.

2 EMBASAMENTO CIENTÍFICO

2.1 Periodontite e susceptibilidade

A etiopatogenia e a apresentação clínica da periodontite resulta da interação dinâmica e complexa entre o estímulo desencadeado por várias bactérias periodontopatogênicas com a resposta imuno-inflamatória (inata e adquirida) do hospedeiro, sob a influência de diversos fatores ambientais e fatores de susceptibilidade genética (DENTINO *et al.*, 2013; SLOTS, 2013).

Dentro da etiologia multifatorial, ganham relevância os fatores de susceptibilidade genética. Estes fatores genéticos correspondem às múltiplas variações genéticas em moléculas envolvidas na regulação da resposta inflamatória, as quais terão um papel determinante na iniciação, progressão e contenção da doença. Assim, esta variabilidade genética justificará, pelo menos parcialmente, o porquê de diferentes indivíduos apresentarem diferentes níveis de susceptibilidade ou de resistência à periodontite (YOSHIE *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; LAINE *et al.*, 2012).

Ao longo das últimas décadas, com base em dados científicos e clínicos, tem sido consolidada a influência significativa da genética na periodontite, particularmente na resposta inflamatória que a constitui (YOSHIE *et al.*, 2007). No entanto, na maioria dos casos de periodontite existe um padrão complexo de transmissão, em que contribuem conjuntamente múltiplas alterações genéticas e os diversos fatores ambientais e comportamentais (KINANE *et al.*, 2005).

Michalowicz *et al.*, (2000) estimaram em um estudo com gêmeos monozigóticos que a periodontite crônica tem uma herdabilidade de 50%, ou seja, cerca de metade da variação da doença dentro de uma população é devida a fatores genéticos. Esta influência genética parece controlar a intensidade e gravidade do processo inflamatório, os processos de regeneração tecidual e a capacidade de resposta às terapias (YOSHIE *et al.*, 2007).

No entanto, a complexidade da periodontite e seu curso clínico não se reduz a esta base genética, sendo a apresentação da doença uma consequência de todo um conjunto de interações entre estes fatores genéticos, agentes e fatores bacterianos, outros fatores do indivíduo e ainda fatores comportamentais e ambientais (STABHOLZ *et al.*, 2010). A constituição genética confere uma predisposição basal para o desenvolvimento da doença, mas ao longo da vida, a exposição às diferenças ambientais e comportamentais, promove um aumento desta predisposição, atingindo ou não o limiar que desencadeia todo o processo da doença.

Este conhecimento acerca de fatores de risco é relevante para o estabelecimento de perfis de susceptibilidade, o que é uma abordagem importante na periodontite, pela importância que as estratégias preventivas e terapêuticas poderão ter no curso da doença. Assim, a identificação precoce destes fatores ou indicadores de risco para o desenvolvimento da periodontite, podem vir a ser essenciais para identificar os indivíduos mais predispostos, instituir terapias personalizadas e estratégias preventivas mais eficazes (ZHANG *et al.*, 2011). Importa, no entanto, compreender que os fatores e

indicadores de risco são condições ou características que aumentam a susceptibilidade para a doença, mas não causam necessariamente a doença.

2.2 Diabetes Mellitus e periodontite

Dentre as complicações bucais relacionadas ao DM, sabe-se que indivíduos diabéticos apresentam risco de duas a três vezes maior de desenvolver periodontite crônica, principalmente aqueles com pobre controle glicêmico (TAYLOR *et al.*, 1996).

O controle glicêmico é avaliado pelo nível de hemoglobina glicada (HbA1c), que reflete os níveis séricos de glicose durante um tempo de 120 dias das células sanguíneas vermelhas, sendo considerada uma medida robusta do controle glicêmico (ENGELGAU *et al.*, 1997; MAGGS *et al.*, 1998; YALE *et al.*, 2001; HUNDAL *et al.*, 2002; KNOWLER *et al.*, 2002; SELVIN *et al.*, 2004). HbA1c elevada tem sido associada a complicações diabéticas micro e macrovasculares [ENGELGAU *et al.*, 1997; KNOWLER *et al.*, 2002; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA), 2003].

Os pacientes com níveis elevados de HbA1c apresentam prevalência e gravidade significativamente maiores de periodontite, em relação a indivíduos com um melhor controle metabólico. Pacientes diabéticos com periodontite, além de possuírem maior perda de inserção clínica, apresentam também maior susceptibilidade à perda de dentes que aqueles não diabéticos, sendo observada uma correlação significativa inversamente proporcional entre os níveis glicêmicos e o número de dentes presentes (SEPPALA *et al.*, 1993; TSAI *et al.*, 2002; DEMMER *et al.*, 2012).

Doenças infecciosas agudas e crônicas podem influenciar negativamente o controle glicêmico (SAMMALKORPI, 1989). Além disso, foi estabelecido que HbA1c é afetada adversamente pela inflamação sistêmica (SHOELSON *et al.*, 2006). Neste contexto, uma ligação biologicamente plausível entre o controle metabólico e periodontite tem sido investigado (TAYLOR, 2001).

Algumas evidências apontam que o tratamento periodontal adequado pode contribuir positivamente no controle dos níveis de HbA1c, sendo a periodontite uma condição que pode predispor à ocorrência de complicações do DM (ENGEBRETSON & KOCHER, 2013).

Tendo em vista a elevada prevalência de DM tipo 2 na população mundial, e considerando-se os elevados índices de periodontite e perda dental relacionados à presença do DM, torna-se ainda mais importante o controle e o gerenciamento dessas doenças. Embora o agente etiológico primário das doenças periodontais seja o biofilme bacteriano, já existe um consenso de que a resposta do hospedeiro, frente ao desafio bacteriano, fortemente influenciada por fatores de risco intrínsecos e extrínsecos, é essencial para o desenvolvimento da doença.

2.3 Beta-defensinas humanas

O epitélio oral não é apenas uma barreira física entre o ambiente externo e o hospedeiro. Ele também apresenta um potente mecanismo de defesa químico, representado pelos peptídeos antimicrobianos (WEINBERG *et al.*, 1998; MCCORMICK & WEINBERG, 2010). Os peptídeos antimicrobianos são componentes importantes

para a defesa inata de células eucariotas, e funcionam contra um amplo espectro de bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos e vírus encapsulados (WEINBERG *et al.*, 1998; ZASLOFF, 2002; HANCOCK *et al.*, 2006). O sistema imune inato trabalha em conjunto com o sistema imune adaptativo, permitindo que o hospedeiro contenha, retarde ou impeça o crescimento microbiano imediatamente após uma infecção.

As beta defensinas humanas (hBDs) são exemplos de peptídeos antimicrobianos que têm mostrado uma comunicação direta com o sistema imune adaptativo, interagindo com quimiocinas específicas e com receptores Toll-like, resultando na modulação da resposta de células imunocompetentes do hospedeiro (YANG *et al.*, 1999; BIRAGYN *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2006). Assim, além do efeito antimicrobiano, as hBDs regulam a proliferação de células epiteliais, aumentam a fagocitose por macrófagos, são quimiotáticas para monócitos, macrófagos, linfócitos T e mastócitos, suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias para antígenos microbianos específicos, ativam e promovem a degranulação de mastócitos, regulam o sistema complemento, inibem a produção de glicocorticóides, e aumentam a resposta imune adaptativa (MCCORMICK & WEINBERG, 2010; KOHLGRAF *et al.*, 2010).

As hBDs se ligam a microrganismos e ou seus produtos, atenuando seu efeito tóxico ou a sua capacidade indutora de inflamação. Estes peptídeos podem se ligar à membrana microbiana, superfície de adesinas, lipopolissacarídeo (LPS), e toxinas bacterianas específicas. A hBD-3 se liga a produtos microbianos e a vírus, mais rapidamente que a hBD-1 e hBD-2 (KOHLGRAF *et al.*, 2010). A ligação destas hBDs com microrganismos ou seus produtos, tem implicações na interação dos mesmos com as superfícies

celulares e receptores. Segundo Pingel e colaboradores (2008), essa ligação promove a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, mas não da produção de quimiocinas (PINGEL *et al.*, 2008). Foi verificado que as beta defensinas são capazes de interagir com receptores CCR6 em células imune-efetoras selecionadas, como células dendríticas imaturas e células T e, por meio de quimiocinas, possibilitam o recrutamento destas células para os sítios de interesse (YANG *et al.*, 1999).

A primeira evidência de hBDs na cavidade bucal de mamíferos foi descrita em 1995 por Schonwetter e colaboradores (SCHONWETTER *et al.*, 1995). A partir de então, diversos pesquisadores têm mostrado a presença de hBDs na cavidade bucal de humanos (MATHEWS *et al.*, 1999; SAHASRABUDHE *et al.*, 2000; DALE *et al.*, 2001; DUNSCHE *et al.*, 2002). As hBDs são produzidas abundantemente nos tecidos bucais e glândulas salivares, podendo ser encontradas na saliva e fluido crevicular gengival. Apesar da identificação genômica de diferentes beta defensinas em humanos, aproximadamente 28 tipos de hBDs, as hBDs 1 a 4 são as mais estudadas (KOHLEGRAB *et al.*, 2010).

No tecido gengival, hBD-1 e hBD-2 estão localizadas no epitélio estratificado suprabasal e nas camadas mais externas do epitélio, o que é consistente com a formação da barreira epitelial (DALE *et al.*, 2001). Tanto hBD-1 como hBD-2 não são detectadas no epitélio juncional. Enquanto a hBD-2 está localizada nos estratos mais diferenciados do epitélio oral (granuloso e espinhoso), a hBD-3 está localizada no estrato basal menos diferenciado, nos queratinócitos, células de Langerhans e células de Merkel, sugerindo que a hBD-3 pode facilitar a comunicação entre os tecidos

gengival e conjuntivo, servindo como elo de ligação entre as respostas imune inata e adaptativa (HOSOKAWA *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2005). Foi verificado que a hBD-3 é produzida intensamente por células epiteliais no carcinoma *in situ*, e que esta produção estava correlacionada com o recrutamento e infiltração de monócitos/macrófagos exclusivamente no sítio da lesão (KAWSAR *et al.*, 2009).

Uma notável diferença na expressão de hBD-2 e hBD-3 foi verificada entre o epitélio oral e a maioria dos outros epitélios. Estas defensinas estão expressas apenas na presença de infecção ou inflamação na maioria dos tecidos, incluindo epitélio da pele, intestino e traquéia (O'NEIL *et al.*, 1999; ONG *et al.*, 2002). Entretanto, tanto a hBD-2 como a hBD-3 estão presentes no tecido gengival normal sem inflamação (DALE *et al.*, 2001). Diferenças na expressão da hBD-1 também têm sido encontrada em diferentes sítios da cavidade oral (MATHEWS *et al.*, 1999; DALE *et al.*, 2001). Um nível basal de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) foi verificado para as hBD-1, hBD-2 e hBD-3 em pacientes saudáveis e em pacientes com periodontite crônica. Entretanto, uma expressão significativamente maior de hBD-3 foi observada em tecidos de sítios saudáveis, comparado com tecidos de sítios com periodontite crônica, sugerindo um papel protetor desse peptídeo (BISSELL *et al.*, 2004). Além disso, os níveis de hBD-3 estavam inversamente correlacionados com a gravidade da doença e o grau de colonização por combinações de espécies bacterianas com elevado potencial periodontopatogênico. Assim, tanto fatores genéticos como proteases bacterianas/hospedeiro, presentes em sítios doentes, podem ser responsáveis pelo baixo nível de hBD-3 em indivíduos com periodontite (BRANCATISANO *et al.*, 2011).

O epitélio gengival de indivíduos periodontalmente saudáveis apresentou expressão significativamente maior de hBD-2 em comparação com tecidos clinicamente saudáveis de pacientes com periodontite crônica. Além disso, a avaliação dos níveis de expressão de hBD-1 e hBD-2, em tecidos do mesmo indivíduo, demonstrou que ambas defensinas estavam expressas em um nível mais elevado no epitélio da bolsa periodontal do que no epitélio gengival saudável adjacente. Esta observação sugere que níveis basais mais elevados de hBDs são protetores para periodontite crônica (LU *et al.*, 2004).

A expressão da hBD-1 e hBD-2 no tecido gengival de pacientes com gengivite, periodontite agressiva, e periodontite crônica foi investigada (VARDAR-SENGUL *et al.*, 2007). Expressões diferentes dos genes hBD-1 e hBD-2 foram observados nestes grupos de pacientes. Expressões de hBD-1 e hBD-2 foram menores nos tecidos gengivais de pacientes com gengivite do que nos tecidos de controles saudáveis. A expressão de hBD-1 foi reduzida e de hBD-2 foi aumentada em pacientes com periodontite agressiva em comparação com controles saudáveis. No entanto, pacientes com periodontite crônica apresentaram níveis mais elevados de hBD-1 em comparação com pacientes saudáveis, sugerindo que embora esses níveis mais elevados de hBD-1 possam ter oferecido um efeito protetor, eles não foram suficientes para evitar a infecção e destruição periodontal. O aumento da expressão de hBD-2 em pacientes com periodontite agressiva pode ser causada pela estimulação deste peptídeo antimicrobiano por *A. actinomycetemcomitans*. Este microrganismo foi capaz de estimular a expressão hBD-RNA em queratinócitos orais humanos *in vitro* (CHUNG & DALE, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

3.1.1 Avaliar a expressão quantitativa de hBD-1 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica saudáveis e portadores de diabetes mellitus tipo 2;

3.1.2 Avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica, saudáveis e portadores de diabetes mellitus tipo 2;

3.1.3 Avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre os índices glicêmicos de indivíduos portadores de diabetes mellitus.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Comparar a expressão quantitativa de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis de pacientes com e sem periodontite crônica;

3.2.2 Comparar a expressão quantitativa de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e sítios doentes, com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica;

3.2.3 Comparar a expressão quantitativa de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e sítios doentes , com gengivite e com periodontite, de indivíduos com

periodontite crônica e portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados;

3.2.4 Avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e doentes, com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica;

3.2.5 Avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e doentes, com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica e portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados;

3.2.6 Avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre os parâmetros clínicos periodontais em indivíduos com periodontite crônica saudáveis e portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados;

3.2.7 Avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre os índices glicêmicos (hemoglobina glicada e glicemia em jejum), em indivíduos com periodontite crônica e portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados.

4 HIPÓTESES

4.1 A expressão quantitativa de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis de indivíduos com periodontite crônica é menor em relação aos sítios saudáveis de indivíduos saudáveis;

4.2 A expressão quantitativa de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis é maior em relação aos sítios doentes ,com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica;

4.3 A expressão quantitativa de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e sítios doentes, com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica e portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados é maior em relação aos sítios saudáveis e sítios doentes, com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica e portadores de diabetes mellitus tipo 2 descompensados;

4.4 A terapia periodontal não-cirúrgica aumenta a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e doentes, com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica;

4.5 A terapia periodontal não-cirúrgica aumenta a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e doentes, com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica e portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados;

4.6 A terapia periodontal não-cirúrgica melhora os parâmetros clínicos periodontais em indivíduos com periodontite crônica saudáveis e portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados;

4.7 A terapia periodontal não-cirúrgica reduz os índices glicêmicos (hemoglobina glicada e glicemia em jejum) em indivíduos com periodontite crônica saudáveis e portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP UFMG) sob o número CAAE 0529.0.203.000-11 (Anexo 1).

Todos os pacientes foram informados sobre os objetivos do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) concordando com a sua participação (Anexo 2). Todos os direitos dos participantes foram preservados em todos os momentos.

Os dados clínicos e laboratoriais foram anotados em fichas individuais (Anexo 3, 4 e 5) e usados exclusivamente com finalidade científica.

Os indivíduos que apresentaram necessidades periodontais e/ou odontológicas adicionais foram encaminhados para o tratamento nas clínicas da Faculdade de Odontologia da UFMG.

6 ARTIGOS CIENTÍFICOS

A presente tese de doutorado apresentou diferentes propostas de investigação e será apresentada a seguir em 5 artigos científicos, com descrição de metodologia, resultados, discussão e conclusões específicas.

6.1 Artigo Científico 1

Expressão de beta-defensina humana 1 no fluido gengival em indivíduos com e sem periodontite crônica

Resumo

Objetivo: As beta-defensinas humanas (hBDs) contribuem para a imunidade inata por ação antimicrobiana e também são eficazes na resposta imune adaptativa, podendo desempenhar um papel fundamental na susceptibilidade às doenças da cavidade bucal. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com e sem periodontite crônica.

Materiais e Métodos: 20 indivíduos saudáveis e 20 indivíduos com periodontite crônica foram recrutados. As amostras de FCG foram coletadas de sítios saudáveis (Hh) dos indivíduos saudáveis e de sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp) dos pacientes com periodontite, totalizando 320 sítios. A quantificação das hBD-1 foi realizada pela técnica ELISA de sanduíche. A variância geral na expressão de hBD-1 foi estimada pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn para a comparação dos pares de interesse.

Resultados: Ao se comparar indivíduos saudáveis com indivíduos com periodontite, os níveis de hBD-1 em sítios Hh (229.52 ± 138.96) foram significativamente maiores quando comparados aos sítios Ph (53.88 ± 58.17) ($p < 0,001$). Não houve diferenças significativas, quando sítios Ph ($53,88 \pm 58,17$), Pg ($57,11 \pm 40,18$) e Pp ($55,31 \pm 37,28$) foram comparados entre si em indivíduos com periodontite ($p > 0,05$).

Conclusão: Este estudo mostrou menores níveis de hBD-1 no FCG de indivíduos com periodontite em comparação a indivíduos saudáveis. Isto sugere um potencial papel protetor na hBD-1 na susceptibilidade a periodontite crônica.

Palavras-chave: beta defensinas, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), periodontite crônica.

Introdução

Periodontite resulta da interação dinâmica e complexa entre o estímulo desencadeado por várias bactérias periodontopatogênicas com a resposta imuno-inflamatória (inata e adaptativa) do hospedeiro, sob a influência de diversos fatores ambientais e fatores de susceptibilidade genética (Dentino *et al.*, 2013; Slots, 2013).

As beta-defensinas humanas (hDBs) são exemplos de peptídeos antimicrobianos importantes para a resposta imune inata e também funcionam como imunomoduladores eficazes na resposta imune adaptativa (Yang *et al.*, 1999; Biragyn *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2006). Além do efeito antimicrobiano, as hBDs regulam a proliferação de células epiteliais, aumentam a fagocitose por macrófagos, são quimiotáticas para monócitos, macrófagos, linfócitos T e mastócitos, suprimem a produção de citocinas pró-

inflamatórias para antígenos microbianos específicos, ativam e promovem a degranulação de mastócitos, regulam o sistema complemento e inibem a produção de glicocorticóides (McCormick & Weinberg, 2010; Kohlgraf *et al.*, 2010).

As hBDs são expressas em uma grande variedade de tecidos e órgãos envolvidos na defesa do hospedeiro, contra microrganismos invasores, sendo produzidas abundantemente nos tecidos bucais e glândulas salivares, podendo ser encontradas na saliva e fluido crevicular gengival (FCG) (Diamond *et al.*, 2000; Kohlgraf *et al.*, 2010).

Fatores microbianos, fatores de desenvolvimento, citocinas, e, em alguns casos, os fatores neuroendócrinos regulam a síntese e liberação de defensinas (Ganz, 2003). Polimorfismos e variação nos níveis de expressão das hBDs podem estar associados com a susceptibilidade a doenças infecciosas bacterianas, doenças de Crohn, periodontite e fibrose cística (Kohlgraf *et al.*, 2010).

Uma resposta do hospedeiro eficaz em relação à presença bacteriana é mediada primariamente por neutrófilos, sendo caracterizada por um influxo de neutrófilos para o sulco gengival, seguida pela expressão e liberação de alfa e beta-defensinas (Puklo *et al.*, 2008).

A beta defensina-1 (hBD-1) é ativa contra as bactérias gram-negativas e leveduras, com atividade limitada contra bactérias gram-positivas (Quayle *et al.*, 1998). Estudos têm mostrado que a hBD-1 é regulada positivamente em vários tipos de epitélio (Darveau *et al.*, 1997; Page *et al.*, 1997). Além disso, estudos têm mostrado que a hBD-

1 é expressa constitutivamente em tecidos saudáveis e inflamados (Mathews *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1996; AAs *et al.*, 2005).

A expressão apropriada de hBDs pode contribuir para a manutenção da homeostasia periodontal, possivelmente pelo seu efeito antimicrobiano e promoção de respostas imunes adaptativas. Componentes da resposta imune inata como as hBDs, podem ter um papel chave na susceptibilidade ou resistência às doenças na cavidade oral (Joly *et al.*, 2005).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de pacientes saudáveis e pacientes com periodontite crônica.

Materiais e Métodos

Desenho de estudo e estratégia amostral

O presente estudo apresentou um desenho transversal e foi constituído por uma amostra de 40 indivíduos (23 homens e 17 mulheres), com uma faixa etária entre 18 e 79 anos de idade, sendo 20 indivíduos saudáveis (H) e 20 indivíduos com periodontite crônica (P), totalizando uma coleta de amostras de FCG em 320 sítios periodontais.

A amostra foi selecionada entre os pacientes da clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante o período de coleta de dados, de agosto de 2012 a dezembro de 2014, aproximadamente 360 indivíduos procuraram atendimento odontológico e foram considerados elegíveis para o estudo. De acordo com a acessibilidade e disponibilidade dos indivíduos na rotina de

atendimento, eles foram aleatoriamente convidados a participar do estudo, até a formação dos grupos. Todos os indivíduos foram submetidos a um exame periodontal de boca toda, incluindo registro dos parâmetros periodontais profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS) em 4 sítios periodontais (distal, vestibular, mesial e lingual) por um único investigador treinado. A concordância intra examinador para os parâmetros PS e NIC revelou valores de Kappa maiores que 90% e coeficiente de correlação intraclass maiores que 89%.

Indivíduos saudáveis deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais, $PS \leq 3\text{mm}$ e ausência de sítios com SS. Indivíduos com periodontite crônica deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais e pelo menos 4 dentes com um ou mais sítios com $PS \geq 4\text{mm}$ e $NIC \geq 3\text{mm}$ no mesmo sítio (Costa *et al.*, 2009; López *et al.*, 2002). Indivíduos com história de doenças sistêmicas, gestantes e lactantes, fumantes e ex-fumantes, indivíduos em uso de medicamentos que podem influenciar a saúde periodontal, que receberam tratamento periodontal nos últimos 6 meses ou que usaram antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 3 meses foram excluídos do estudo.

Coleta de amostras de fluido crevicular gengival

Após o exame periodontal inicial, amostras de FCG foram coletadas de todos os indivíduos. Em indivíduos saudáveis (H), amostras de FCG foram coletadas de sítios periodontais saudáveis (Hh, $n = 20$). Em indivíduos doentes (P), amostras de FCG foram coletadas de sítios periodontais saudáveis (Ph, $n = 20$) e doentes, sendo sítios

com gengivite (Pg, n = 20) e sítios com periodontite (Pp, n = 20), do mesmo paciente (Dommisch *et al.*, 2005; Brancatisano *et al.*, 2011).

Os sítios selecionados apresentavam os seguintes parâmetros clínicos: a) sítios saudáveis (Hh e Ph) – PS e NIC $\leq$ 3mm, sem SS b) sítios com gengivite (Pg) – PS e NIC $\leq$ 3mm e SS; c) sítios com periodontite (Pp) – PS $\geq$ 4mm, NIC $\geq$ 3mm e SS.

Em cada indivíduo saudável, 4 sítios foram coletados e, em cada indivíduo com periodontite, 4 sítios representativos de cada categoria (saudáveis, com gengivite e com periodontite) foram coletados, totalizando 12 sítios por indivíduo. Os sítios com periodontite foram selecionados de acordo com a maior PS em dentes diferentes não adjacentes.

Para coleta de amostras de FCG, tiras de papel Periopaper® (PerioCol Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA) foram inseridas no sulco gengival por 30 segundos. Tiras de papel contaminadas com sangue foram descartadas. As amostras representativas de uma mesma categoria no indivíduo foram colocadas em um tubo Eppendorf seco e congeladas a -80°C até o dia da análise laboratorial. O volume total obtido foi mensurado com um aparelho calibrado (Periotron 6000, IDE Interstate, Amityville, NY, USA).

Quantificação da beta-defensina humana 1

A quantificação de hBD-1 no FCG foi realizada pela técnica ELISA sanduíche (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), de acordo com as orientações do fabricante. Resumidamente, noventa e seis poços foram revestidos com 100 µL (0,25 µg/mL) de anticorpo específico anti hBD-1 por 12 horas. Após quatro lavagens com PBST (PBS com 0.05% Tween-20), os poços foram bloqueados por 1 hora à temperatura ambiente com 300 µL de uma solução bloqueadora (1% BSA em PBST). As placas foram lavadas e 100 µL das amostras ou da solução padrão foram adicionado aos respectivos poços em duplicata, e as placas foram incubadas por 2 horas. Após nova lavagem, 100 µL do anticorpo de detecção (0.5 µg/mL) foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas por mais 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas e 100 µL de estreptavidina-peroxidase (1:2000 in PBST) foi adicionado aos respectivos poços. Placas foram incubadas em temperatura ambiente por mais trinta minutos. Reações colorimétricas foram produzidas com a utilização de o-fenilenodiamina, na presença de 0,02% de H₂O₂. Após o bloqueio da reação com H₂SO₄ (2N), a absorbância foi medida por um leitor de ELISA.

Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais COEP/UFMG (CAAE – 0529.0.203.0001-11). Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente a entrada no estudo. Todos os direitos dos participantes foram preservados em todos os momentos.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A variância geral dos níveis de hBD-1 foi estimada pelo teste Kruskal-Walis, seguido do teste post-hoc de Dunn para a comparação dos pares de interesse. Os níveis de hBD-1 em sítios saudáveis (Hh) de indivíduos saudáveis foram inicialmente comparados com sítios saudáveis (Ph) de indivíduos com periodontite crônica. Posteriormente, os níveis de hBD-1 em sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp) foram comparados entre si em indivíduos com periodontite.

A relação entre os parâmetros clínicos periodontais dos indivíduos com periodontite e os níveis de hBD-1 nos sítios saudáveis (Ph), com gengivite (Pg) e com periodontite (Pp) foi avaliada através da correlação de Spearman.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Statistical Package for Social Sciences – IBM SPSS Statistics, versão 20 para Mac. Os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$.

Resultados

O grupo de indivíduos saudáveis sem periodontite foi composto por 7 mulheres e 13 homens, com idade média de $39,6 \pm 16,7$ anos (18 – 79). O grupo de indivíduos com periodontite crônica foi composto por 10 mulheres e 10 homens, com idade média de $44,4 \pm 10,2$ anos (25 – 68).

Além disso, os indivíduos saudáveis apresentavam: a) PS média de $1.7 \pm 0,2\text{mm}$; b) NIC médio de $2.0 \pm 0,5\text{mm}$. Os indivíduos com periodontite apresentavam: a) PS média de $4,2 \pm 2,6\text{mm}$ sendo $5,7 \pm 4,6\%$ dos sítios com PS de 4mm, $7,6 \pm 8,1\%$ dos sítios com PS de 5 a 6mm, e $2,1 \pm 3,4\%$ dos sítios com PS de 7mm ou mais; b) NIC médio de $3,1 \pm 0,7\text{mm}$, sendo $8,2 \pm 4,6\%$ dos sítios com NIC de 4mm, $12,4 \pm 11,1\%$ dos sítios com NIC de 5 a 6mm, e $4,4 \pm 6,1\%$ dos sítios com NIC de 7mm ou mais; c) $30,8 \pm 20,7\%$ dos sítios com SS.

Em relação aos níveis de hBD-1, a variância geral entre os diferentes sítios foi significativa (Kruskal-Wallis KW = 33.557, $p < 0,0001$). A figura 1 mostra a comparação dos níveis de hBD-1 nos sítios saudáveis de indivíduos com e sem periodontite. Foi demonstrado que os níveis de hBD-1 em Hh [229.52 ± 138.96 (59.74 – 570.28; mediana 199.26)] foi significativamente maior que em Ph [53.88 ± 58.17 (5.13 – 267.58; mediana 35.75)] ($p < 0,001$).

A figura 2 mostra a comparação dos níveis de hBD-1 nos sítios saudáveis e doentes de indivíduos com periodontite. Não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das comparações entre Ph, Pg [57.11 ± 40.18 (13.92 – 139.25; mediana 39.90)] e Pp [55.31 ± 37.28 (0.00 – 113.27; mediana 54.19)] ($p > 0,05$).

A tabela 1 mostra a correlação entre os parâmetros clínicos periodontais nos indivíduos com periodontite e os níveis de hBD-1 nos sítios saudáveis e doentes (gingivite e periodontite). Não foram encontradas correlações significativas.

Discussão

Estudos que avaliaram peptídeos antimicrobianos, em pacientes com periodontite estão disponíveis na literatura (Dunsche *et al.*, 2002; Bissel *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004; Dommish *et al.*, 2005; Hosokawa *et al.*, 2006; Vardar-Sengul *et al.*, 2007; Kuula *et al.*, 2008, Brancatisano *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012). No entanto, existe uma escassez de informações sobre a expressão de hBD-1 no FCG de indivíduos com periodontite.

O presente estudo teve como hipótese que a expressão quantitativa da hBD-1 em sítios saudáveis, de indivíduos sem periodontite, é maior em relação a sítios saudáveis de indivíduos com periodontite. Além disso, que a expressão de hBD-1 em sítios saudáveis, sítios com gengivite e sítios com periodontite seria diferente em indivíduos com periodontite. Até o presente momento, sob o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que compara a expressão de hBD-1 no fluido gengival de sítios saudáveis e doentes de indivíduos sem periodontite e com periodontite crônica.

Os resultados do presente estudo mostraram uma expressão mais elevada de hBD-1 em sítios saudáveis de indivíduos sem periodontite em relação aos sítios saudáveis de indivíduos com periodontite, confirmando nossa hipótese. Estes resultados corroboram os achados dos estudos de Brancatisano *et al.*, 2011; Hosokawa *et al.*, 2006; Bissell *et al.*, 2004; e Dunsche *et al.*, 2002. Brancatisano *et al.* (2011) avaliaram amostras de FCG e encontraram uma expressão de hBD-3 mais elevada, em sítios saudáveis de indivíduos saudáveis, e reduzida em sítios doentes de indivíduos com periodontite. Os estudos de Bissel *et al.* (2004) e Dunsche *et al.* (2002) mostraram uma expressão mais alta de hBDs em tecidos gengivais saudáveis, comparada à expressão de hBDs em

tecidos gengivais doentes de indivíduos com periodontite. Seguindo estes achados, Hosokawa *et al.* (2006) encontraram uma expressão elevada de RNAm para hBD-2 e hBD-3, em tecidos gengivais saudáveis, e uma pequena expressão de RNAm para hBD-2 e hBD-3, em tecidos gengivais inflamados.

Dessa forma, os achados do presente estudo seguiram a plausibilidade biológica do estudo de Brancatisano *et al.* (2011), que sugeriram as hBDs reduzidas na presença de periodontite, tanto pela presença de fatores genéticos como pela presença de proteases bacterianas/hospedeiro presentes em sítios doentes.

Entretanto, nossos resultados contradizem os achados dos estudos de Kuula *et al.* (2008); Vardar-Sengul *et al.* (2007) e Lu *et al.* (2004), que encontraram níveis mais elevados de hBD-1 em amostras de tecidos gengivais de indivíduos com periodontite comparado aos pacientes saudáveis periodontalmente.

Os achados do presente estudo não mostraram diferença na comparação da expressão de hBD-1 entre os sítios saudáveis, sítios com gengivite e sítios com periodontite, nos indivíduos com periodontite. Além disso, não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre os parâmetros clínicos periodontais nos indivíduos com periodontite e os níveis de hBD-1 nos sítios saudáveis e doentes (gengivite e periodontite). Esses resultados sugerem que a expressão reduzida de hBD-1 nos indivíduos com periodontite, independente do sítio, poderia ocorrer devido à presença de prováveis fatores genéticos. De fato, polimorfismo genético (Jurevic *et al.*, 2003) ou diferenças no número de cópias genômicas para hBDs específicas (Hollox *et al.*, 2003) foram

descritas como prováveis responsáveis por diferentes níveis de expressão do gene da hBD.

Embora o presente estudo tenha avaliado indivíduos e sítios saudáveis e doentes, com um total de 320 sítios periodontais incluídos, o tamanho amostral pode ser considerado uma limitação. Estudos futuros são necessários para comprovar nossos achados. Além disso, estudos incluindo avaliações microbiológicas e genéticas podem trazer maiores esclarecimentos sobre a regulação da expressão de hBD-1 nos sítios periodontais.

Conclusão

Com base nos resultados deste estudo, a expressão reduzida de hBD-1 em indivíduos com periodontite, sugere um potencial papel protetor na hBD-1 na susceptibilidade à periodontite crônica. A determinação do papel de diferentes defensinas no desenvolvimento da periodontite pode trazer um maior entendimento de sua etiopatogenia, além da possibilidade da criação de novos indicadores de risco e novas possibilidades terapêuticas.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos a todos os participantes do estudo pelo seu tempo e envolvimento.

Referências

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721–5732.
2. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E et al. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 2001;11:6644-6653.
3. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB Jr et al. Expression of β -defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2004;33:278-285.
4. Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res* 2011;90:241-245.
5. Costa FO, Guimaraes AN, Cota LO, Pataro AL, Segundo TK, Cortelli SC, Costa JE. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Science* 2009;51:199–206.
6. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000* 1997;14:12–32.
7. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol 2000* 2003;6:16-53.
8. Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russel JP, Bevins CL. Transcriptional regulation of B-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 2000;68:113- 119.

9. Dommisch H, Açil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:186-190.
10. Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002;2:121-124.
11. Feng Z, Dubyak GR, Lederman MM, Weinberg A. Cutting edge: human beta defensin 3—a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol* 2006;2:782-786.
12. Hollox EJ, Armour JA, Barber JC. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet* 2003;73:591-600.
13. Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H, Goncalves RB, Karimbux N, Napimoga MH et al. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. *Clin Exp Immunol* 2006;146:218-225.
14. Joly S, Organ CC, Johnson GK, McGray PB Jr, Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 2005;42:1073-1084.
15. Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. *J Clin Microbiol* 2003;41:90-96.
16. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA. Defensinas as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol* 2010;5:99-113.

17. Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, Romanos GE, Sorsa T. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol* 2008;53:175–186.
18. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002;73:911-924.
19. Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. Expression of human b-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2004;39; 221–227.
20. Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK et al. Production of β -defensin antimicrobial peptides by oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 1999;67:2740-2745.
21. McCormick TS, Weinberg A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate immunity. *Periodontol 2000* 2010;54:195-206.
22. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* 1997;14:216–248.
23. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GCN, Cortelli SC, Cortelli JR. Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Archives of oral biology* 2012;57:1609–1614.
24. Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, Eick S, Potempa J. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of

cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral Microbiol. Immunol* 2008;23:328–335.

25. Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 1998;152:1247–1258.
26. Slots J. Periodontology: past, present, perspectives. *Periodontol 2000* 2013; 62:7-19.
27. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999;286:525-528.
28. Tomas Ganz. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:710–720.
29. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodont Res* 2007;42:429-437.
30. Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Letters* 1996;366:319-322.

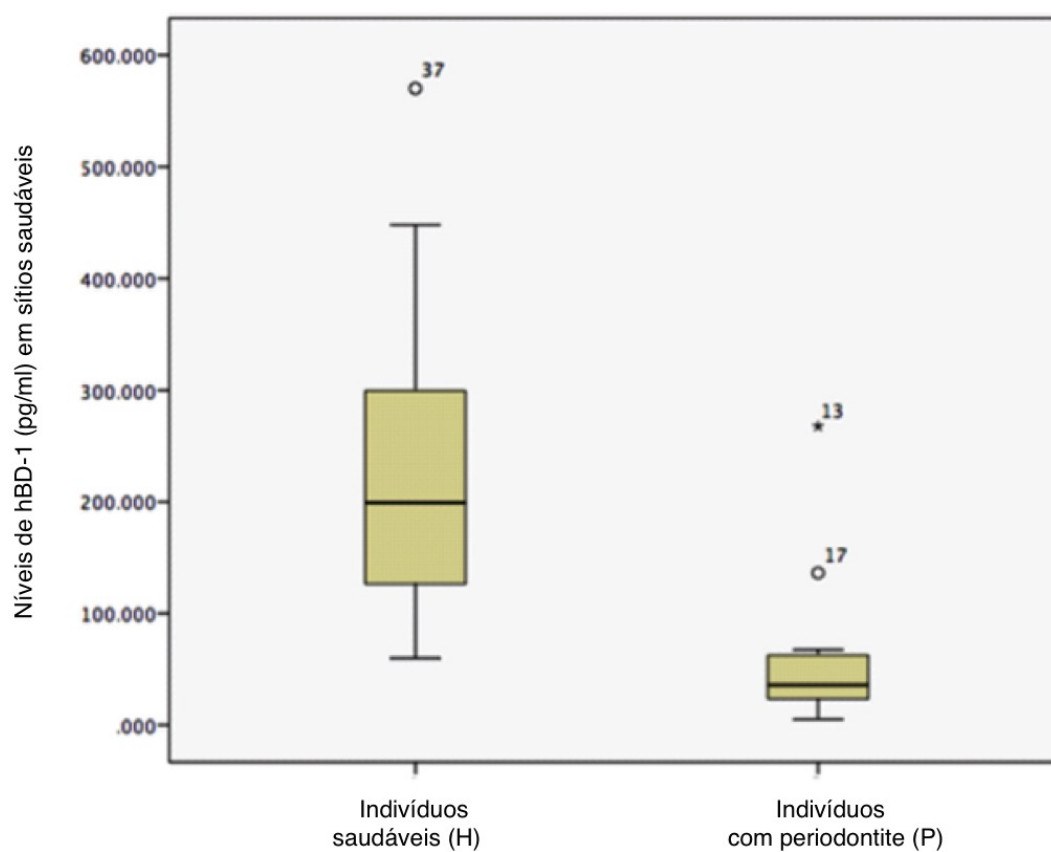


Figura 1. Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis em indivíduos saudáveis (H) e indivíduos com periodontite (P). Teste Dunn para comparação H vs. P ($p < 0,001$).

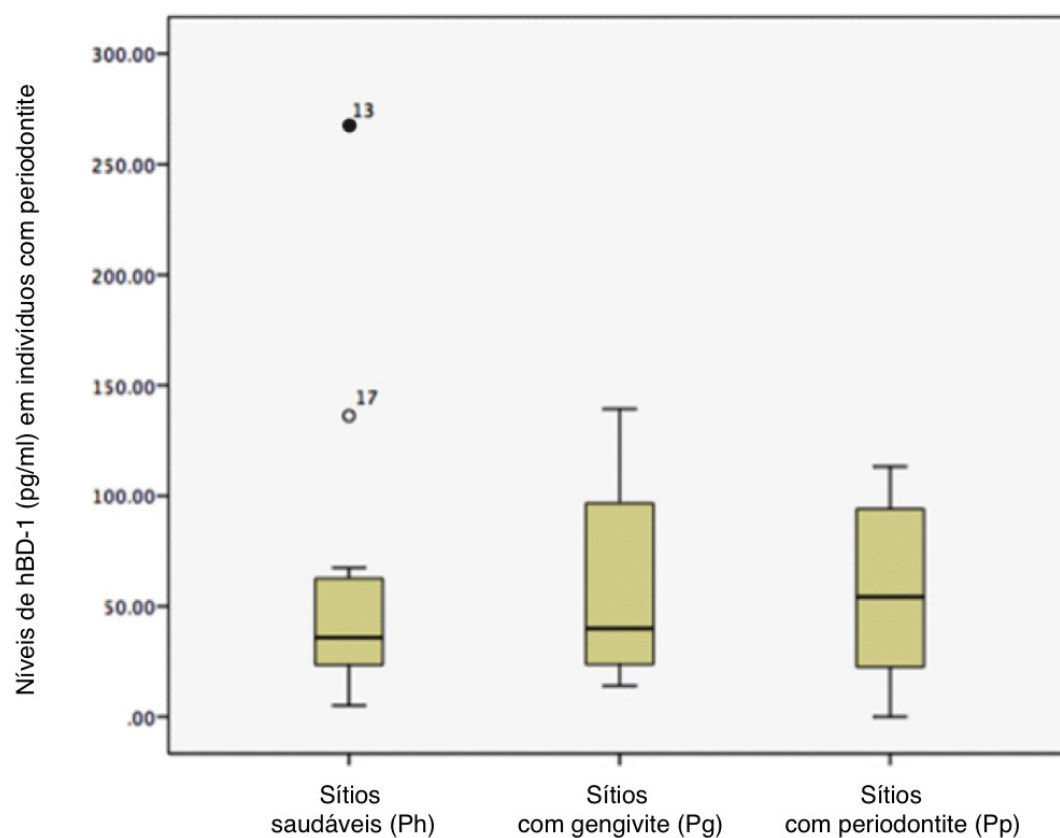


Figura 2. Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite em sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp). Teste Dunn para as comparações de pares: Ph vs. Pg ($p > 0,05$), Ph vs. Pp ($p > 0,05$), Pg vs. Pp ($p > 0,05$).

Tabela 1. Correlação entre parâmetros clínicos periodontais de indivíduos com periodontite e os níveis de beta defensina 1 (hBD-1) em sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp).

Parâmetros clínicos	Níveis de hBD-1		
	Sítios Ph	Sítios Pg	Sítios Pp
PS média (mm)	-0,263 (0,262)	-0,066 (0,782)	-0,173 (0,465)
% de sítios com PS $\geq$ 4mm	-0,053 (0,823)	0,088 (0,712)	-0,210 (0,374)
% de sítios com PS 5/6mm	-0,153 (0,520)	0,044 (0,855)	-0,018 (0,941)
% de sítios com PS $\geq$ 7mm	-0,223 (0,344)	-0,166 (0,483)	0,154 (0,517)
NIC médio (mm)	-0,096 (0,686)	0,130 (0,585)	-0,167 (0,481)
% de sítios com NIC $\geq$ 4mm	-0,044 (0,855)	0,082 (0,731)	-0,204 (0,389)
% de sítios com NIC 5/6mm	0,196 (0,409)	0,058 (0,808)	0,074 (0,757)
% de sítios com NIC $\geq$ 7mm	-0,057 (0,812)	0,055 (0,817)	0,201 (0,396)
% de sítios com SS	-0,210 (0,375)	-0,220 (0,352)	-0,281 (0,229)

Coeficiente de Correlação de Spearman (valor de p). PS = Profundidade de sondagem;

NIC = Nível de inserção clínica; SS = Sangramento à sondagem.

6.2 Artigo Científico 2

Efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão de beta-defensina humana 1 no fluido gengival em indivíduos com e sem periodontite crônica

Resumo

Objetivo: A expressão apropriada de beta defensinas pode contribuir para a manutenção da homeostasia periodontal, possivelmente pelo seu efeito antimicrobiano e promoção de respostas imunes adaptativas. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão quantitativa de beta defensina humana 1 (hBD-1) no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com e sem periodontite crônica.

Materiais e Métodos: 20 indivíduos saudáveis e 20 indivíduos com periodontite crônica foram recrutados. As amostras de FCG foram coletadas de sítios saudáveis (Hh), dos indivíduos saudáveis, e de sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp), dos indivíduos com periodontite crônica, totalizando 320 sítios, no baseline (T0). Os indivíduos com periodontite foram submetidos à terapia periodontal não-cirúrgica. Após 2 meses da terapia (T1), nova coleta de FCG foi realizada em todos os sítios coletados em T0. A quantificação das hBD-1 foi realizada pela técnica ELISA de sanduíche. Os níveis de hBD-1 em indivíduos com periodontite foram comparados entre T0 e T1 pelo teste de Wilcoxon. Os níveis de hBD-1 em indivíduos com periodontite em T1 foram também comparados com sítios saudáveis de indivíduos saudáveis pelo teste Dunn para comparações múltiplas.

Resultados: Ao se comparar níveis de expressão de hBD-1 em indivíduos com periodontite, nos sítios Ph (T0) ($53,88 \pm 58,17$) vs. Ph (T1) ($259,06 \pm 188,20$), Pg (T0)

(57,11 $\pm$ 40,18) vs. Pg (T1) (448,15 $\pm$ 307,23), Pp (T0) (55,31 $\pm$ 37,28) vs. Pp (T1) (473,78 $\pm$ 351,26). Os valores em todos os sítios foram significativamente maiores em T1 quando comparados a T0 ($p < 0,0001$). Ao se comparar níveis de hBD-1 nos sítios Ph, Pg e Pp (indivíduos com periodontite) em T1 com sítios controle Hh (indivíduos saudáveis, T0), foram observadas diferenças significativas. Teste de Kruskal-Wallis ($p = 0.017$), Hh vs. Pg (T1) ($p < 0,05$) e Hh vs. Pp (T1) ($p < 0,05$).

Conclusão: Este estudo mostrou que a terapia periodontal não-cirúrgica aumenta a expressão de hBD-1 em indivíduos com periodontite em todos os sítios (saudáveis e doentes), alcançando níveis similares a sítios saudáveis de indivíduos saudáveis.

Palavras-chave: beta defensinas, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), periodontite crônica, terapia periodontal não-cirúrgica.

Introdução

As beta-defensinas humanas (hBDs) são peptídeos antimicrobianos envolvidos na defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores, sendo expressos em uma grande variedade de tecidos e órgãos. Tecidos mucosos e epiteliais como pele, córnea, língua, gengiva, glândulas salivares, esôfago, intestino, rim, trato urogenital e epitélio respiratório, são fontes notáveis de beta defensinas (Diamond *et al.*, 2000; Schutte & Mccray, 2002).

As hBDs são sintetizadas em muitos tipos de células (incluindo linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e queratinócitos) e armazenadas em grânulos na região citoplasmática, permitindo rápida liberação dos peptídeos ativos quando da

infecção microbiana. Algumas defensinas são constitutivamente expressas enquanto outras podem ser induzidas (Zou *et al.*, 2007).

Algumas defensinas funcionam como imunomoduladores eficazes na imunidade adaptativa, por quimioatração seletiva de linfócitos T, monócitos e células dendríticas imaturas, portanto, a função imune de defensinas não está limitada à imunidade inata, mas também na imunidade adaptativa (Droin *et al.*, 2009).

A beta defensina-1 (hBD-1) é expressa constitutivamente em glândulas salivares e outros tecidos epiteliais (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998, Jurevic *et al.*, 2003). A hBD-1 é ativa contra as bactérias gram-negativas e leveduras, com atividade limitada contra bactérias gram-positivas (Quayle *et al.*, 1998). A maioria dos estudos têm mostrado a hBD-1 regulada positivamente em vários tipos de epitélio (Darveau *et al.*, 1997; Page *et al.*, 1997; Dommish *et al.*, 2005, Vardar-Sengul *et al.*, 2007). No entanto, outros estudos apresentaram uma regulação positiva da hBD-1 em resposta à inflamação (Aas *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004).

Ainda não está claro porque os níveis de expressão das hBDs podem variar entre indivíduos com periodontite e indivíduos saudáveis (Lu *et al.*, 2004; Kuula *et al.*, 2008; Brancatisano *et al.*, 2011). Concomitantemente, hipóteses foram apresentadas para explicar esta discrepância. A degradação das hBDs por bactérias ou enzimas derivados de bactérias e/ou do hospedeiro (Brancatisano *et al.*, 2011) e polimorfismos genéticos (Brancatisano *et al.*, 2011, Jurevic *et al.*, 2003), que podem promover uma expressão reduzida de hBDs.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão de hBD-1 em indivíduos com periodontite crônica.

Materiais e Métodos

Desenho de estudo e estratégia amostral

A amostra do presente estudo foi constituída por 40 indivíduos (23 homens e 17 mulheres), com uma faixa etária entre 18 e 79 anos de idade, sendo 20 indivíduos saudáveis (H) e 20 indivíduos com periodontite crônica (P). Todos os indivíduos foram selecionados entre os pacientes da clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante o período de coleta de dados, de agosto de 2012 a dezembro de 2014, aproximadamente 360 indivíduos procuraram atendimento odontológico e foram considerados elegíveis para o estudo. De acordo com a acessibilidade e disponibilidade dos indivíduos na rotina de atendimento, eles foram aleatoriamente convidados a participar do estudo, até a formação dos grupos. Todos os indivíduos foram submetidos a um exame periodontal de boca toda, incluindo registro dos seguintes parâmetros periodontais: profundidade de sondagem (PS), nível inserção clínica (NIC) e sangramento a sondagem (SS) em 4 sítios periodontais (distal, vestibular, mesial e lingual) por um único investigador treinado. A concordância intra examinador para os parâmetros PS e NIC revelou valores de Kappa maiores que 90% e coeficiente de correlação intraclass maiores que 89%.

Indivíduos saudáveis deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais, $PS \leq 3\text{mm}$ e ausência de sítios com SS. Indivíduos com periodontite crônica deveriam apresentar

um mínimo de 15 dentes naturais e pelo menos 4 dentes com um ou mais sítios com PS $\geq$ 4mm, NIC $\geq$ 3mm no mesmo sítio (Costa *et al.*, 2009; López *et al.*, 2002). Indivíduos com história de doenças sistêmicas, gestantes e lactantes, fumantes e ex-fumantes, indivíduos em uso de medicamentos que podem influenciar a saúde periodontal, que receberam tratamento periodontal nos últimos 6 meses ou que usaram antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 3 meses foram excluídos do estudo.

Coleta de amostras de fluido crevicular gengival

Amostras de FCG foram coletadas em 2 momentos distintos, sendo uma coleta no baseline (T0) e uma coleta 2 meses após a terapia periodontal não-cirúrgica (T1). Em indivíduos saudáveis (H), amostras de FCG foram coletadas de sítios periodontais saudáveis (Hh, n = 20) em T0. Em indivíduos doentes (P), amostras de FCG foram coletadas de sítios periodontais saudáveis (Ph, n = 20) e doentes, sendo sítios com gengivite (Pg, n = 20) e sítios com periodontite (Pp, n = 20) do mesmo paciente (Dommisch *et al.*, 2005, Brancatisano *et al.*, 2011), em T0 e T1 nos mesmos sítios.

Os sítios selecionados apresentavam os seguintes parâmetros clínicos: a) sítios saudáveis (Hh e Ph) – PS e NIC $\leq$ 3mm, sem SS; b) sítios com gengivite (Pg) – PS e NIC $\leq$ 3mm e SS; c) sítios com periodontite (Pp) – PS $\geq$ 4mm, NIC $\geq$ 3mm e SS.

Em cada indivíduo sadio foram coletadas amostras de fluido em 4 sítios, e em cada indivíduo com periodontite, as amostras foram coletadas em 4 sítios representativos de cada categoria (saudáveis, com gengivite e com periodontite), totalizando 12 sítios por

indivíduo. Os sítios com periodontite foram selecionados de acordo com a maior PS em dentes diferentes não adjacentes.

Para coleta de amostras de FCG, tiras de papel Periopaper® (PerioCol Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA) foram inseridas no sulco gengival por 30 segundos. Tiras de papel contaminadas com sangue foram descartadas. As amostras representativas de uma mesma categoria no indivíduo foram colocadas em um tubo Eppendorf seco e congeladas a -80°C até o dia da análise laboratorial. O volume total obtido foi mensurado com um aparelho calibrado (Periotron 6000, IDE Interstate, Amityville, NY, USA).

Quantificação da beta-defensina humana 1

A quantificação de hBD-1 no FCG foi realizada pela técnica ELISA sanduíche (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), de acordo com as orientações do fabricante. Resumidamente, noventa e seis poços foram revestidos com 100 μL (0,25 $\mu\text{g/mL}$) de anticorpo específico anti hBD-1 por 12 horas. Após quatro lavagens com PBST (PBS com 0.05% Tween-20), os poços foram bloqueados por 1 hora à temperatura ambiente com 300 μL de uma solução bloqueadora (1% BSA em PBST). As placas foram lavadas e 100 μL das amostras ou da solução padrão foram adicionado aos respectivos poços em duplicata, e as placas foram incubadas por 2 horas. Após nova lavagem, 100 μL do anticorpo de detecção (0.5 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas por mais 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas e 100 μL de estreptavidina-peroxidase (1:2000 in PBST) foi adicionado aos respectivos poços.

Placas foram incubadas em temperatura ambiente por mais trinta minutos. Reações colorimétricas foram produzidas com a utilização de *o*-fenilenodiamina, na presença de 0,02% de H₂O₂. Após o bloqueio da reação com H₂SO₄ (2N), a absorbância foi medida por um leitor de ELISA.

Terapia periodontal não-cirúrgica

Após a realização do exame clínico periodontal, os indivíduos com periodontite foram submetidos à raspagem e ao alisamento radicular por quadrante, com curetas manuais tipo Gracey (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) e aparelho de ultrassom (Gnatus, Jet Sonic, Brussels, Belgium) sob anestesia local, em um total de quatro semanas. Todos os procedimentos periodontais foram realizados por um único periodontista treinado.

Após 2 meses da terapia periodontal não-cirúrgica (T1), novo exame clínico periodontal foi realizado, com registro de PS, NIC e SS. Nova coleta de amostras de FCG foram realizadas nos mesmos sítios coletados em T0. É importante ressaltar que, após a coleta em T1, os indivíduos com persistência de sítios com PS $\geq$ 4mm com SS ou supuração foram encaminhados para a realização de nova terapia não-cirúrgica ou cirúrgica, quando necessário.

Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais COEP/UFMG (CAAE – 0529.0.203.0001-11). Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo e assinaram um Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido previamente a entrada no estudo. Todos os direitos dos participantes foram preservados em todos os momentos.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os parâmetros periodontais e os níveis de hBD-1 foram comparados entre T0 e T1 pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Após a terapia não cirúrgica, em T1, a variância geral dos níveis de hBD-1 foi estimada pelo teste Kruskal-Walis, seguido do teste post-hoc de Dunn para a comparação dos pares de interesse: sítios Ph, Pg e Pp (indivíduos com periodontite) foram comparados entre si e com sítios controle Hh (indivíduos saudáveis).

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Statistical Package for Social Sciences – IBM SPSS Statistics, versão 20 para Mac. Os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$.

Resultados

O grupo de indivíduos saudáveis sem periodontite foi composto por 7 mulheres e 13 homens, com idade média de $39,6 \pm 16,7$ anos (18 – 79). O grupo de indivíduos com periodontite crônica foi composto por 10 mulheres e 10 homens, com idade média de $44,4 \pm 10,2$ anos (25 – 68).

Os parâmetros periodontais da amostra, no baseline (T0) e após a terapia não cirúrgica (T1) são mostrados na Tabela 1. Foi observado uma melhora significativa na maioria dos parâmetros periodontais em T1.

Em T0, os níveis de hBD-1 em sítios saudáveis (Hh) de indivíduos saudáveis foi $229.52 \pm 138,96$ (59,74 – 570,28; mediana 199,26); indivíduos com periodontite, os níveis de hDB-1 em sítios saudáveis (Ph) foi $53,88 \pm 58,17$ (5,13 – 267,58; mediana 35,75), em sítios com gengivite (Pg) foi $57,11 \pm 40,18$ (13,92 – 139,25; mediana 39,90), e em sítios com periodontite (Pp) foi $55,31 \pm 37,28$ (0,00 – 113,27; mediana 54,19). Em T1, nos indivíduos com periodontite, os níveis de hBD-1 em sítios saudáveis (Ph) foi $259,06 \pm 188,20$ (0,00 – 672,04; mediana 238,52), em sítios com gengivite (Pg) foi $448,15 \pm 307,23$ (0,00 – 1053,75; mediana 402,05), e em sítios com periodontite (Pp) foi $473,78 \pm 351,26$ (33,96 – 1449,43; mediana 376,24). A figura 1 mostra a comparação dos níveis de hDB-1 entre T0 e T1. Os valores em todos os sítios foram significativamente maiores em T1 quando comparados a T0 ($p < 0,0001$) (Figura 1).

Quando os níveis de hBD-1 nos sítios Ph, Pg e Pp (indivíduos com periodontite) em T1 foram comparados entre si e com sítios controle Hh (indivíduos saudáveis, T0), foram observadas diferenças significativas (Kruskal-Wallis KW = 10.152; $p = 0.017$), sendo que os níveis foram significativamente maiores em Pg (T1) e Pp (T1) (Figura 2).

Discussão

Há poucos estudos que avaliam o efeito da terapia periodontal sobre a expressão de

hBDs na literatura. De fato, Pereira *et al.*, 2012 avaliaram o efeito da terapia periodontal sobre os níveis de hBD-2 em indivíduos com periodontite crônica e Ebrahim (2013) estudou o efeito da terapia periodontal sobre a expressão de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 em indivíduos com periodontite agressiva.

O presente estudo teve a hipótese de que a terapia periodontal não-cirúrgica aumenta a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e doentes, com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica, sendo este o primeiro estudo que avalia o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão de hBD-1 em indivíduos com periodontite crônica.

A terapia periodontal não-cirúrgica, que consistiu em raspagem e alisamento radicular, foi eficiente na melhoria de todos os parâmetros clínicos periodontais. Estes resultados são corroborados pelos estudos de Gay *et al.* (2014); Koromantzios *et al.* (2011); Apatzidou & Kinane, 2010; Tervonen *et al.* (1991); e Chen *et al.* (2012), que avaliaram o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica em indivíduos com periodontite crônica.

Os resultados do presente estudo mostraram que após a terapia periodontal ocorreu aumento nos níveis de hBD-1, em indivíduos com periodontite, em todos os sítios (saudáveis e doentes), que ficaram mais elevados que os sítios saudáveis de indivíduos saudáveis.

Estes resultados corroboram com os achados dos estudos de Ebrahim (2013), que avaliaram o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre hBD-1, hBD-2 e hBD-3 em

indivíduos com periodontite agressiva. No baseline, a frequência de hBD-1 em indivíduos saudáveis foi 95%, enquanto que a frequência de hBD-1 em indivíduos com periodontite agressiva foi 30% e passou para 80% após 3 meses da terapia periodontal.

Estudos têm mostrado que hBDs desempenham um papel importante nas respostas imuno-inflamatórias de células dendríticas imaturas, células T de memória e monócitos. Os padrões de expressão de hBD-1, hBD-2, e hBD-3 fornecem evidências das barreiras antimicrobianas do epitélio gengival (Bensch *et al.*, 1995 e Nomura *et al.*, 2003), o que é consistente com os resultados do presente estudo a respeito da expressão de hBD-1. Em particular, o aumento da expressão de hBD-1 após a terapia periodontal. Estes achados podem indicar que a hBD-1 apresenta ação antimicrobiana, que foi reduzida em presença de inflamação periodontal. Após terapia periodontal, há um aumento da expressão de hBD-1, possivelmente pela redução da carga bacteriana.

Entretanto, os achados do presente estudo contradizem aos resultados de Pereira *et al.* (2012), que mostram uma expressão mais elevada de hBD-2 em indivíduos com periodontite crônica em relação aos indivíduos saudáveis. Além disso, mostraram uma redução da expressão de hBD-2 após a terapia periodontal não-cirúrgica. Mas, estes resultados controversos podem ter ocorrido por se tratar da beta-defensina 2. De fato, o estudo de Domisch *et al.* (2005) realizou uma análise comparativa da expressão de hBD-1, -2, e -3 nos tecidos gengivais saudáveis e inflamados, mostrando níveis de expressão diferentes para as três hBDs. Acrescentando, não existem outros estudos que avaliaram o efeito da terapia periodontal sobre a expressão de hBD-1 em

indivíduos com periodontite crônica, desta forma, não é possível realizar uma análise comparativa aos nossos resultados.

Os achados do presente estudo mostraram que após a terapia periodontal não-cirúrgica, os níveis de hBD-1 aumentaram em todos os sítios (saudáveis e doentes) de indivíduos com periodontite crônica. Estes resultados sugerem que a redução das bactérias nos sítios pode estar relacionada com o aumento da expressão de hBD-1. Estudos futuros incluindo avaliações microbiológicas podem trazer maiores esclarecimentos sobre a expressão de hBD-1 em sítios periodontais.

Conclusão

Assim, com base nos resultados deste estudo, a terapia periodontal não-cirúrgica foi capaz de aumentar a expressão de hBD-1 em indivíduos com periodontite crônica em todos os sítios (saudáveis e doentes), sugerindo que as alterações inflamatórias e infecciosas no periodonto podem afetar os níveis de hBD-1 no FCG. No entanto, mais estudos de intervenção são necessários para confirmar nossos achados.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos a todos os participantes do estudo pelo seu tempo e envolvimento.

Referências

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721–5732.
2. Apatzidou DA, Kinane DF. Nonsurgical mechanical treatment strategies for periodontal disease. *Dent Clin North Am* 2010;54:1-12.
3. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. HBD-1 a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995;368:331–335.
4. Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res* 2011;90:241-245.
5. Chen L, Luo G, Xuan D, Wei B, Liu F, Li J, Zhang J. Effects of non-surgical periodontal treatment on clinical response, serum inflammatory parameters, and metabolic control in patients with type 2 diabetes: a randomized study. *J Periodontol* 2012;83,435–443.
6. Costa FO, Guimaraes AN, Cota LO, Pataro AL, Segundo TK, Cortelli SC & Costa JE. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Science* 2009;51:199–206.
7. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000* 1997;14:12–32.
8. Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russel JP, Bevins CL. Transcriptional regulation of B-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 2000;68:113- 119.

9. Dommisch H, Ail Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:186-190.
10. Droin N, Hendra JB, Ducoroy P, Solary E. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. *J Proteomics* 2009;72:918-927.
11. Ebrahim MA. Expression of human beta defensins (HBDs) 1, 2 and 3 in gingival crevicular fluid of patients affected by localized aggressive periodontitis. *The Saudi Dental Journal* 2013;25:75–82.
12. Gay IC, Tran DT, Cavender AC, Weltman R, Chang J, Luckenbach E, Tribble GD. The effect of periodontal therapy on glycemic control in a Hispanic population with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 2014;41:673–680.
13. Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. *J Clin Microbiol* 2003;41:90-96.
14. Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol* 2011;38,142–147.
15. Krisanaprakornkit, S., A. Weinberg, C. N. Perez, and B. A. Dale. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect. Immun* 1998;66:4222–4228.

16. Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, Romanos GE, Sorsa T. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol* 2008;53:175–186.
17. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002;73:911-924.
18. Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. Expression of human b-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2004;39; 221–227.
19. Nomura I, Goleva E, Howell MD. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 2003;171:3262–3269.
20. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* 1997;14:216–248.
21. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GCN, Cortelli SC, Cortelli JR. Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Archives of oral biology* 2012;57:1609–1614.
22. Schutte BC, McCray PB Jr. B-defensins in lung host defense. *Annu Rev Physiol* 2002;64:709-748.
23. Tervonen T, Knuuttila M, Pohjamo L, Nurkkala H. Immediate response to nonsurgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1991;18,65–68.

24. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodont Res* 2007;42:429-437.
25. Zou J, Mercier C, Koussounadis A, Secombes C. Discovery of multiple b-defensin like homologues in teleost fish. *Mol Immunol* 2007;44:638-647.

Tabela 1. Caracterização periodontal da amostra no baseline (T0) e após terapia periodontal não-cirúrgica (T1).

Parâmetros periodontais	Indivíduos saudáveis	Indivíduos com periodontite		p*
		T0	T1	
PS média (mm)	1,70 ± 0,17 (1,47 – 2,01)	2,62 ± 0,58 (1,64 – 4,15)	2,20 ± 0,39 (1,61 – 3,35)	0,002
% de sítios com PS 4mm	NA	5,71 ± 4,61 (0,00 – 16,07)	3,01 ± 3,38 (0,00 – 10,71)	0,017
% de sítios com PS 5 a 6mm	NA	7,68 ± 8,07 (1,92 – 40,74)	2,88 ± 4,29 (0,00 – 19,44)	<0,0001
% de sítios com PS ≥7mm	NA	2,04 ± 3,35 (0,00 – 13,39)	0,81 ± 1,88 (0,00 – 7,14)	0,005
NIC médio	1,96 ± 0,53 (1,49 – 3,56)	3,02 ± 0,74 (1,85 – 4,91)	2,62 ± 0,73 (1,71 – 4,87)	0,002
% de sítios com NIC 4mm	NA	8,24 ± 4,62 (1,92 – 16,96)	6,27 ± 4,17 (0,89 – 15,62)	0,081
% de sítios com NIC 5 a 6mm	NA	12,43 ± 11,09 (2,17 – 41,66)	8,76 ± 12,03 (0,92 – 53,12)	0,010
% de sítios com NIC ≥7mm	NA	4,37 ± 6,07 (0,00 – 20,83)	2,55 ± 4,06 (0,00 – 13,09)	0,007
% de sítios com SS	NA	30,82 ± 20,73 (6,25 – 99,44)	15,04 ± 11,99 (2,67 – 44,04)	0,001

* Comparações entre T0 e T1, teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

NA = não se aplica; PS = Profundidade de sondagem; NIC = Nível de inserção clínica;

SS = Sangramento à sondagem.

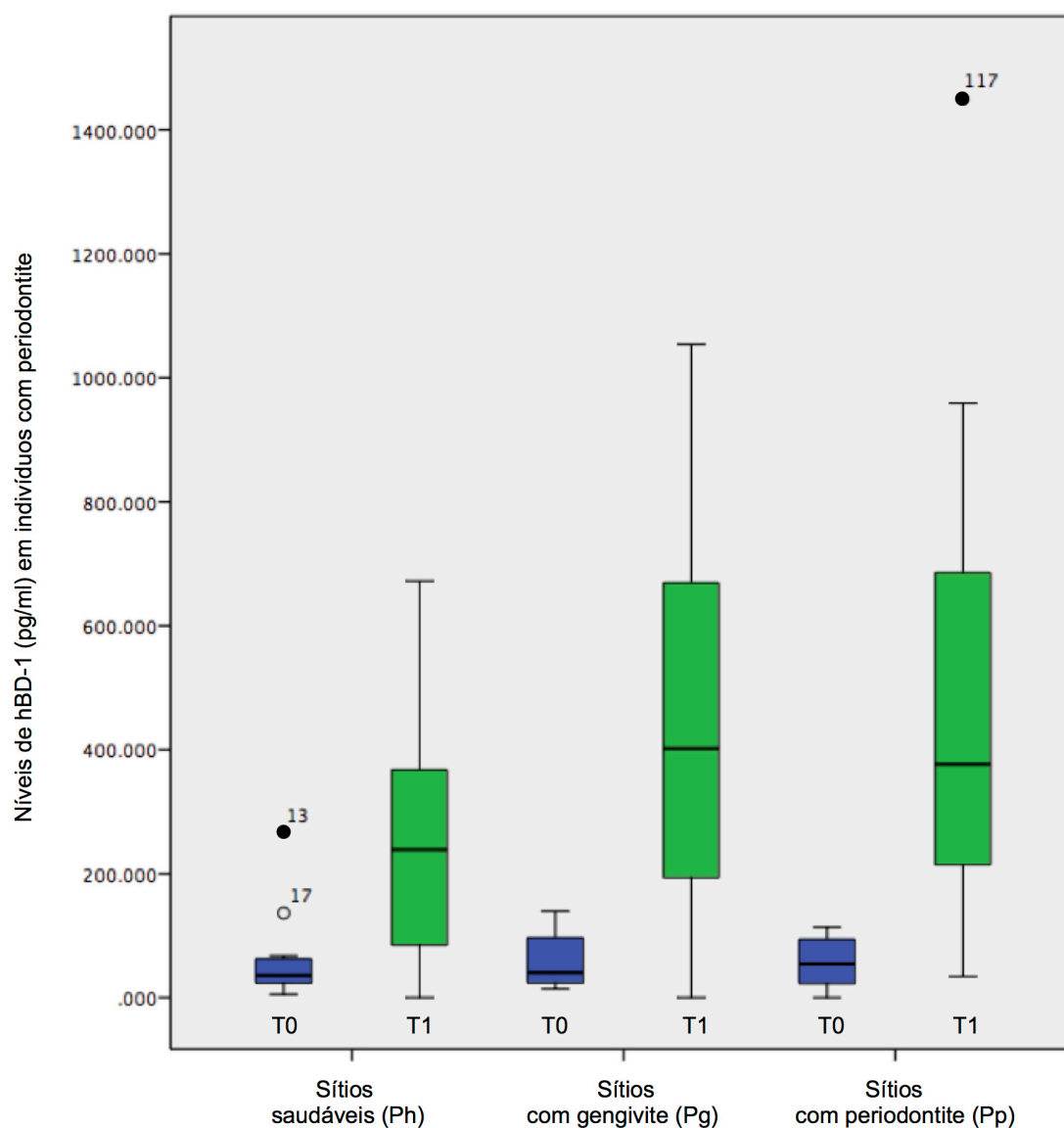


Figura 1. Comparação dos níveis de hBD-1 (pg/ml) nos indivíduos com periodontite nos sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp) entre o baseline (T0) e 2 meses após terapia não-cirúrgica (T1). Teste de Wilcoxon para amostras pareadas: Ph (T0) vs. Ph (T1) ($p < 0,0001$), Pg (T0) vs. Pg (T1) ($p < 0,0001$), Pp (T0) vs. Pp (T1) ($p < 0,0001$).

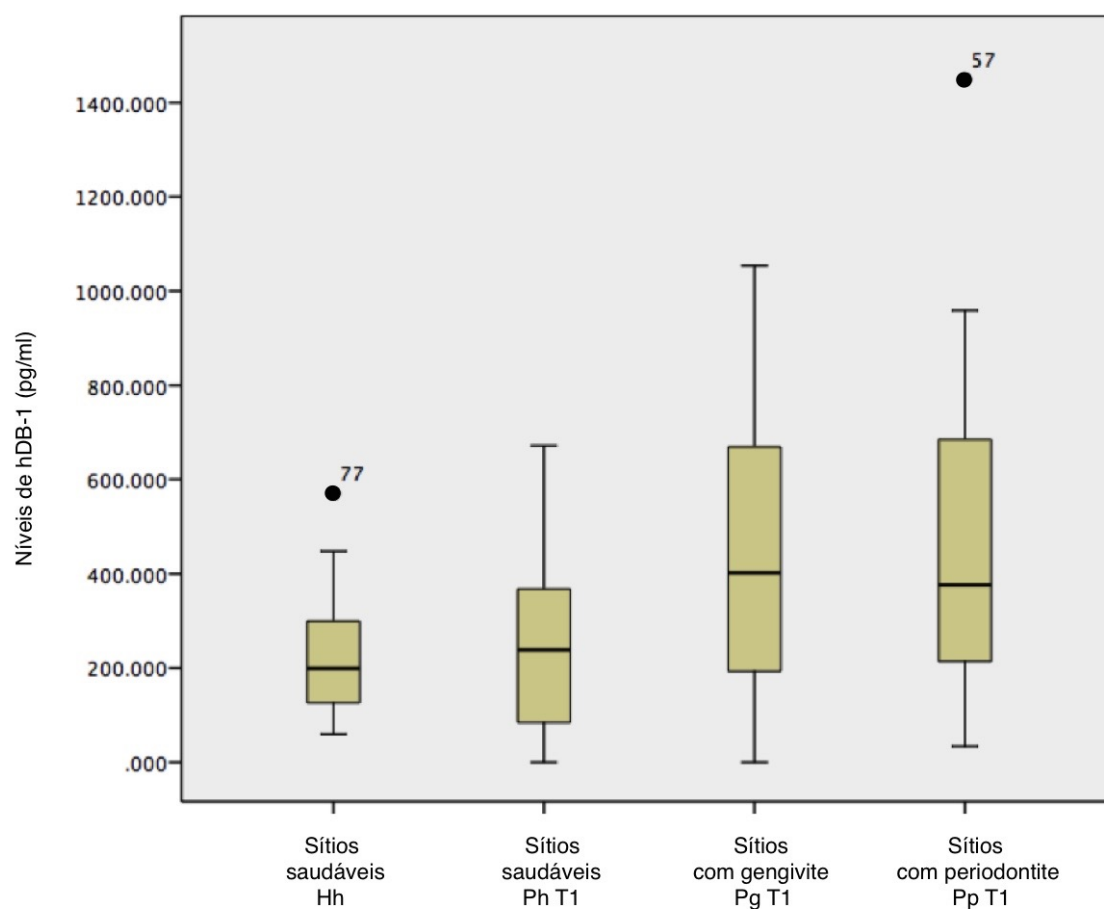


Figura 2. Comparação dos níveis de hBD-1 (pg/ml) entre sítios saudáveis (Ph), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp) nos indivíduos com periodontite 2 meses após terapia não-cirúrgica (T1) e sítios saudáveis (Hh) de indivíduos saudáveis (controle). Teste de Kruskal-Wallis ($p = 0.017$): Hh vs. Pg (T1) ($p < 0,05$) e Hh vs. Pp (T1) ($p < 0,05$).

6.3 Artigo Científico 3

Expressão de beta-defensina humana 1 no fluido gengival de indivíduos com periodontite crônica portadores de diabetes mellitus compensados e descompensados

Resumo

Objetivo: Beta-defensinas humanas (hBDs) contribuem para a imunidade inata por ação antimicrobiana, podendo desempenhar um papel fundamental na susceptibilidade às doenças da cavidade bucal. Evidências mostram que a hiperglicemia e a deficiência de insulina podem afetar a expressão de hBDs. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão quantitativa de hBD-1 no fluido crevicular gengival (FCG) de indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e periodontite crônica.

Materiais e Métodos: Uma amostra de 80 indivíduos foi dividida em 4 grupos (n = 20), sendo: a) grupo H – indivíduos saudáveis; b) grupo P – indivíduos com periodontite; c) grupo PDMc – indivíduos com DM2 compensados e periodontite; d) grupo PDMd – indivíduos com DM2 descompensados e periodontite. As amostras de FCG foram coletadas de sítios saudáveis (h) em indivíduos saudáveis e de sítios saudáveis (h), sítios com gengivite (g) e sítios com periodontite (p) em pacientes com periodontite, totalizando 800 sítios coletados. A quantificação das hBD-1 foi realizada pela técnica ELISA de sanduíche. A variância geral na expressão de hBD-1 foi estimada pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn, para a comparação dos pares de interesse. Sítios saudáveis de indivíduos saudáveis foram usados como controle positivo nas comparações.

Resultados: Não foram observadas diferenças significativas intragrupo na comparação dos níveis de hBD-1 entre sítios saudáveis, sítios com gengivite e sítios com periodontite. Diferenças significativas nos níveis de hBD-1 foram encontradas entre H(h) (229.52 ± 138.96) vs. P(h) (53.88 ± 58.17) ($p < 0,001$), P(h) (53.88 ± 58.17) vs. PDMc(h) ($256,63 \pm 177,57$) ($p < 0,001$), H(h) vs. PDMd(g) ($124,15 \pm 202,35$) ($p < 0,01$), P(g) vs. PDMc(g) ($219,74 \pm 155,80$) ($p < 0,05$), H(h) vs. P(p) ($55,31 \pm 37,28$) ($p < 0,01$), H(h) vs. PDMd(p) ($153,71 \pm 232,84$) ($p < 0,01$) e P(p) vs. PDMc(p) ($118,15 \pm 93,94$) ($p < 0,05$).

Conclusão: Os níveis elevados de hBD-1 em indivíduos diabéticos compensados, sugere uma possível influência do controle glicêmico na expressão de hBD-1. A expressão reduzida de hBD-1 em indivíduos diabéticos descompensados poderia explicar uma maior susceptibilidade à periodontite.

Palavras-chave: beta defensinas, controle glicêmico, diabetes mellitus, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), periodontite crônica.

Introdução

Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças crônicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante da deficiência na secreção do hormônio insulina, da ação alterada da insulina, ou ambos (ADA, 2001). O DM tem sido associado a muitas patologias bucais, incluindo o aumento da prevalência e gravidade da periodontite (MEALEY & MORITZ, 2003).

Componentes da resposta imune inata, como as beta defensinas humanas (hBDs), podem ter um papel chave na susceptibilidade às doenças na cavidade bucal. Além do efeito antimicrobiano direto, estes peptídeos são quimiotáticas para células fagocitárias e mastócitos, induzem mediadores inflamatórios, regulam eventos inflamatórios iniciais e aumentam a imunidade adaptativa. A expressão apropriada de beta defensinas pode contribuir para a manutenção da homeostasia periodontal, possivelmente pelo seu efeito antimicrobiano e promoção de respostas imunes adaptativas (Joly *et al.*, 2005).

A expressão de hBDs pode ser afetada pela hiperglicemia e deficiência de insulina (Lan *et al.*, 2011). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão quantitativa de hBD-1, no fluido crevicular gengival (FCG), de indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) compensados e descompensados com periodontite crônica.

Metodologia

Desenho de estudo e estratégia amostral

O presente estudo apresentou um desenho transversal e foi constituído por uma amostra de 80 indivíduos (43 homens e 37 mulheres), com uma faixa etária entre 18 e 79 anos de idade, divididos em 4 grupos (n = 20): a) grupo H – indivíduos saudáveis (sem DM2 e sem periodontite); b) grupo P – indivíduos com periodontite; c) grupo PDMc – indivíduos com DM2 compensados e periodontite; d) grupo PDMd – indivíduos com DM2 descompensados e periodontite.

A amostra foi selecionada entre os pacientes da clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante o período de coleta de dados, de agosto de 2012 a dezembro de 2014, aproximadamente 360 indivíduos procuraram atendimento odontológico e foram considerados elegíveis para o estudo. De acordo com a acessibilidade e disponibilidade dos indivíduos na rotina de atendimento, eles foram aleatoriamente convidados a participar do estudo, até a formação dos grupos. Todos os indivíduos foram submetidos a um exame periodontal de boca toda, incluindo registro dos parâmetros periodontais profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS) em 4 sítios periodontais (distal, vestibular, mesial e lingual), por um único investigador treinado. A concordância intra examinador para os parâmetros PS e NIC revelou valores de Kappa maiores que 90% e coeficiente de correlação intraclass maiores que 89%.

Indivíduos periodontalmente saudáveis deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais, $PS \leq 3\text{mm}$ e ausência de sítios com SS. Indivíduos com periodontite crônica deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais e pelo menos 4 dentes com um ou mais sítios com $PS \geq 4\text{mm}$, $NIC \geq 3\text{mm}$ no mesmo sítio (Costa *et al.*, 2009; López *et al.*, 2002).

O controle glicêmico do DM2 foi avaliado pela concentração de hemoglobina glicada A1c (%HbA1c). Indivíduos com HbA1c superior a 7% foram considerados portadores de

controle metabólico inadequado (Anonymous, 1998; Anonymous, 2009) e classificados como DM2 descompensados.

Indivíduos com história de doenças sistêmicas, gestantes e lactantes, fumantes e ex-fumantes, indivíduos em uso de medicamentos que podem influenciar a saúde periodontal, que receberam tratamento periodontal nos últimos 6 meses ou que usaram antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 3 meses foram excluídos do estudo.

Coleta de amostras de fluido crevicular gengival

Após o exame periodontal inicial, amostras de FCG foram coletadas de todos os indivíduos. Em indivíduos saudáveis, amostras de FCG foram coletadas de sítios periodontais saudáveis (h, n = 20). Em indivíduos doentes (portadores de DM2 e periodontite), amostras de FCG foram coletadas de sítios periodontais saudáveis (h, n = 20), e sítios periodontais com gengivite (g, n = 20) e com periodontite (p, n = 20) do mesmo paciente (Dommisch *et al.*, 2005; Brancatisano *et al.*, 2011), totalizando 800 sítios periodontais coletados.

Os sítios selecionados apresentavam os seguintes parâmetros clínicos: a) sítios saudáveis (Hh e Ph) – PS e NIC $\leq$ 3mm, sem SS; b) sítios com gengivite (Pg) – PS e NIC $\leq$ 3mm e SS; c) sítios com periodontite (Pp) – PS $\geq$ 4mm, NIC $\geq$ 3mm e SS.

Em cada indivíduo saudável, 4 sítios foram coletados e, em cada indivíduo com periodontite, 4 sítios representativos de cada categoria (saudáveis, com gengivite e com periodontite) foram coletados, totalizando 12 sítios por indivíduo. Os sítios com

periodontite foram selecionados de acordo com a maior PS em dentes diferentes não adjacentes.

Para coleta de amostras de FCG, tiras de papel Periopaper® (PerioCol Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA) foram inseridas no sulco gengival por 30 segundos. Tiras de papel contaminadas com sangue foram descartadas. As amostras representativas de uma mesma categoria no indivíduo foram colocadas em um tubo Eppendorf seco e congeladas a -80°C até o dia da análise laboratorial. O volume total obtido foi mensurado com um aparelho calibrado (Periotron 6000, IDE Interstate, Amityville, NY, USA).

Quantificação da beta-defensina humana 1

A quantificação de hBD-1 no FCG foi realizada pela técnica ELISA sanduíche (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), de acordo com as orientações do fabricante. Resumidamente, noventa e seis poços foram revestidos com 100 μL (0,25 $\mu\text{g/mL}$) de anticorpo específico anti hBD-1 por 12 horas. Após quatro lavagens com PBST (PBS com 0.05% Tween-20), os poços foram bloqueados por 1 hora à temperatura ambiente com 300 μL de uma solução bloqueadora (1% BSA em PBST). As placas foram lavadas e 100 μL das amostras ou da solução padrão foram adicionados aos respectivos poços em duplicata, e as placas foram incubadas por 2 horas. Após nova lavagem, 100 μL do anticorpo de detecção (0.5 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas por mais 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas e 100 μL de estreptavidina-peroxidase (1:2000 in PBST) foi adicionado aos respectivos poços. Placas foram incubadas em temperatura ambiente por mais trinta minutos. Reações

colorimétricas foram produzidas com a utilização de *o*-fenilenodiamina, na presença de 0,02% de H_2O_2 . Após o bloqueio da reação com H_2SO_4 (2N), a absorbância foi medida por um leitor de ELISA.

Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais COEP/UFMG (CAAE – 0529.0.203.0001-11). Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente a entrada no estudo. Todos os direitos dos participantes foram preservados em todos os momentos.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A variância geral dos níveis de hBD-1 foi estimada pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste post-hoc de Dunn para múltiplas comparações dos pares de interesse. Inicialmente, os níveis de hBD-1 foram comparados, intragrupo, em sítios saudáveis, sítios com gengivite e sítios com periodontite. Posteriormente, comparações intergrupo foram feitas para os sítios saudáveis, sítios com gengivite e sítios com periodontite entre os grupos periodontite crônica (P), portadores de DM2 compensados (PDMc) e descompensados (PDMd), usando os sítios saudáveis de indivíduos saudáveis (Hh) como controles.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Statistical Package for Social Sciences – IBM SPSS Statistics, versão 20 para Mac. Os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$.

Resultados

Os grupos do presente estudo apresentaram a seguinte composição em relação ao gênero e idade: a) grupo H – 7 mulheres e 13 homens, com idade média de $39,6 \pm 16,7$ anos (18 – 79); b) grupo P – 10 mulheres e 10 homens, com idade média de $44,4 \pm 10,2$ anos (25 – 68); c) PDMc – 7 mulheres e 13 homens, com idade média de $58,1 \pm 7,7$ anos (44 – 71); d) PDMd – 13 mulheres e 7 homens, com idade média de $52,4 \pm 13,5$ anos (27 – 70). A caracterização periodontal dos grupos é mostrada na Tabela 1.

Em relação aos níveis de hBD-1, a variância geral entre os diferentes sítios foi significativa (Kruskal-Wallis KW = 58,179, $p < 0,0001$). A figura 1 mostra a comparação intragrupo (P, PDMc, PDMd) dos sítios saudáveis, sítios com gengivite e sítios com periodontite. Não foram observadas diferenças significativas em nenhum grupo ($p > 0,05$).

A figura 2 mostra a comparação dos níveis de hBD-1 nos sítios saudáveis entre os diferentes grupos: H(h) [$229,52 \pm 138,96$ (59,74 – 570,28; mediana 199,26)], P(h) [$53,88 \pm 58,17$ (5,13 – 267,58; mediana 35,75)], PDMc(h) [$256,63 \pm 177,57$ (38,73 – 806,71; mediana 200,30)], e PDMd(h) [$160,06 \pm 177,95$ (0,00 – 722,16; mediana 99,56)].

Diferenças significativas foram observadas entre H(h) vs. P(h) e P(h) vs. PDMc(h) ($p < 0,001$).

A figura 3 mostra a comparação dos níveis de hBD-1 nos sítios com gengivite entre os diferentes grupos: P(g) [57,11 $\pm$ 40,18 (13,92 – 139,25; mediana 39,90)], PDMc(g) [219,74 $\pm$ 155,80 (20,97 – 495,17; mediana 192,00)], e PDMd(g) [124,15 $\pm$ 202,35 (0,00 – 687,27; mediana 60,50)]. O sítio saudável de indivíduos saudáveis (Hh) foi usado como controle positivo. Diferenças significativas foram observadas entre H(h) vs. P(g) ($p < 0,01$), H(h) vs. PDMd(g) ($p < 0,01$), P(g) vs. PDMc(g) ($p < 0,05$).

A figura 4 mostra a comparação dos níveis de hBD-1 nos sítios com periodontite entre os diferentes grupos: P(p) [55,31 $\pm$ 37,28 (0,00 – 113,27; mediana 54,19)], PDMc(p) [118,15 $\pm$ 93,94 (5,88 – 308,98; mediana 108,65)], e PDMd(p) [153,71 $\pm$ 232,84 (0,00 – 889,77; mediana 3,23)]. O sítio saudável de indivíduos saudáveis (Hh) foi usado como controle positivo. Diferenças significativas foram observadas entre H(h) vs. P(g) ($p < 0,01$), H(h) vs. PDMd(g) ($p < 0,01$), P(g) vs. PDMc(g) ($p < 0,05$).

Discussão

Estudos que avaliam peptídeos antimicrobianos, em indivíduos com periodontite e/ou DM estão disponíveis na literatura (Brancatisano *et al.*, 2011; Ertugurl *et al.*, 2012). No entanto, existe uma escassez de informações sobre a comparação da expressão de hBDs em indivíduos com periodontite, sem DM, e portadores de DM2 compensados ou descompensados.

O presente estudo teve a hipótese de que a expressão quantitativa de hBD-1, em sítios saudáveis e doentes (gingivite e periodontite) de indivíduos sem DM2, é diferente em relação aos mesmos sítios de indivíduos portadores de DM2 compensados ou descompensados. Este é o primeiro estudo que investiga a expressão de hBD-1 no fluido gengival de indivíduos portadores de DM2 compensados ou descompensados.

Os resultados do presente estudo mostraram que os indivíduos do grupo PDMd apresentaram um percentual elevado de sítios com PS alterada e com SS. Estes achados concordam com o estudo de Mealey e Oates (2006). Periodontites são mais graves em indivíduos com DM descompensados em relação a indivíduos portadores de DM compensados (Mealey e Oates, 2006).

Ao comparar os níveis de hBD-1 intragrupo, os achados do presente estudo não mostraram diferença na expressão de hBD-1 entre os sítios saudáveis, sítios com gingivite e sítios com periodontite em todos os grupos. Esses resultados sugerem que a expressão de hBD-1 pode estar alterada devido a fatores intrínsecos do indivíduo, como fatores genéticos, e não por fatores locais como a presença de inflamação. De fato, polimorfismo genético (Jurevic *et al.*, 2003) ou diferenças no número de cópias genômicas para hBDs específicas (Hollox *et al.*, 2003), foram descritas como prováveis responsáveis por diferentes níveis de expressão do gene da defensina. Além disso, estes resultados corroboram com os achados do nosso primeiro estudo, desta linha de pesquisa, que não mostraram diferença na comparação da expressão de hBD-1 entre

os sítios saudáveis, sítios com gengivite e sítios com periodontite nos indivíduos com periodontite.

Na comparação da expressão de hBD-1 em sítios saudáveis entre os grupos, os achados mostraram uma expressão de hBD-1 mais elevada em H(h) em relação a P(h). Estes resultados sugerem que a periodontite reduz a expressão de hBD-1, uma vez que o indivíduo com periodontite pode apresentar fatores genéticos, que independente do sítio ser saudável, há uma alteração na expressão de hBD-1. Nossos achados seguiram a plausibilidade biológica do estudo de Brancatisano *et al.* (2011), que sugeriram as hBDs reduzidas na presença de periodontite, pela incapacidade intrínseca dos indivíduos com periodontite produzirem as hBDs.

Na comparação da expressão de hBD-1 em sítios saudáveis e em sítios com gengivite entre os grupos, os indivíduos do grupo PDMc foram semelhantes aos indivíduos do grupo H. Da mesma forma, na comparação da expressão de hBD-1 entre sítios com periodontite, os indivíduos do grupo PDMc foram significativamente maiores que os indivíduos do grupo P. Isto sugere que indivíduos com DM2 compensado podem ser tratados de maneira similar ao paciente não diabético na maioria dos procedimentos dentários de rotina, o que está de acordo com os achados de Lalla & D'Ambrosio (2001).

Nossos achados sugerem, hipoteticamente, que os indivíduos com DM compensado possuem um fator de proteção para a expressão de hBD-1, ou melhor, não alteram a expressão da defensina em relação ao controle positivo. Este fato talvez ocorra pela

eficácia do controle glicêmico, através do tratamento farmacológico nestes indivíduos com DM compensado, o que não ocorre nos indivíduos diabéticos descompensados. De fato, o estudo de Froy *et al.* (2007), avaliou o efeito do tratamento com insulina sobre os níveis de beta defensinas em ratos diabéticos e encontraram resultados sugestivos de que a glicose sanguínea elevada e/ou deficiência de insulina anula o nível de expressão de hBDs e receptores toll-like, explicando as doenças infecciosas recorrentes durante o diabetes. Além disso, Barnea *et al.* (2008) mostraram níveis de hBD-1 elevados, após o tratamento com insulina, em células de rim embrionário, e sugeriram que a sinalização de insulina é importante para uma expressão ótima de hBD, pela elevação dos níveis intracelulares de glicose e pela mediação da expressão do gene da hBD.

Na comparação da expressão de hBD-1 em sítios com gengivite e em sítios com periodontite entre os grupos, encontramos uma expressão maior no grupo controle positivo em relação ao grupos P e PDMd, possivelmente pelo perfil microbiológico ou inflamatório nestes 2 últimos grupos. Estes resultados corroboram com os achados dos estudos de Brancatisano *et al.* (2011); Lan *et al.* (2011); Hosokawa *et al.* (2006); Bissel *et al.* (2004) e Dunsche *et al.* (2002), que encontraram expressões mais elevadas de hBDs em sítios de indivíduos saudáveis em relação aos sítios de indivíduos com periodontite. Além disso, Lan *et al.* (2011) mostraram que condições de glicose elevada inibiram a expressão de hBD-3 em queratinócitos epidermais de ratos. De fato, nossos resultados mostraram uma menor expressão de hBD-1 em sítios com periodontite no grupo PMDd, sugerindo que o descontrole metabólico do DM agrava ainda mais os sítios com periodontite, resultando na menor expressão de hBD-1.

Entretanto, nossos resultados contradizem com achados dos estudos de Ertugrul *et al.* (2012); Pereira *et al.* (2012); Kuula *et al.* (2008); Vardar-Sengul *et al.* (2007); Lu *et al.* (2005) e Page & Malik (2003). Ertugrul *et al.* (2012) avaliaram a expressão de hBD-1 e hBD-3 em fluido gengival, e encontraram níveis significativamente mais elevados de hBDs no grupo de indivíduos com DM2 e com periodontite, seguido do grupos de indivíduos com DM2 e com gengivite, sem DM2 e com periodontite, sem DM2 e com gengivite, respectivamente. Pereira *et al.* (2012) mostraram uma expressão significativamente menor de hBD-2 no fluido gengival do grupo controle comparada ao grupo com periodontite crônica. Kuula *et al.* (2008); Vardar-Sengul *et al.* (2007) e Lu *et al.* (2005), encontraram níveis mais elevados de hBD-1 em amostras de tecidos gengivais de indivíduos com periodontite, comparado aos indivíduos saudáveis periodontalmente. Page & Malik (2003) encontraram níveis elevados de RNAm para hBD-1 em ratos diabéticos comparados aos ratos controles.

Embora um total de 800 sítios periodontais tenham sido avaliados em uma amostra de 80 indivíduos, estudos futuros, envolvendo amostras maiores, se mostram necessários, para confirmar nossos achados. Além disso, estudos comparativos incluindo a avaliação de indivíduos portadores de DM compensados e descompensados, sem periodontite podem trazer maiores esclarecimentos sobre a expressão de hBD-1 e o papel do controle glicêmico nesta expressão e na susceptibilidade às doenças periodontais.

Conclusão

A ausência de alteração na expressão de hBD-1 em indivíduos diabéticos compensados, em relação aos indivíduos saudáveis, parece sugerir que o controle glicêmico pode influenciar a expressão de hBD-1. Além disso, a redução na expressão de hBD-1 poderia explicar, em parte, a susceptibilidade à periodontite em indivíduos diabéticos descompensados.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos a todos os participantes do estudo pelo seu tempo e envolvimento.

Referências

1. American Diabetes Association (ADA). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26(Suppl.1): S5-20.
2. Anonymous. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-853.
3. Anonymous. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009;32 Suppl 1:S62-67.
4. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB Jr et al. Expression of β -defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2004;33:278-285.

1. Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res* 2011;90:241-245.
2. Costa FO, Guimaraes AN, Cota LO, Pataro AL, Segundo TK, Cortelli SC, Costa JE. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Science* 2009;51:199–206.
3. Dommisch H, Açil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:186-190.
4. Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002;2:121-124.
5. Ertugrul AS, Dikilitas A, Sahin H, Alpaslan N, Bozoglan A, Tekin Y. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensins 1 and 3 in subjects with periodontitis and/or type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *J Periodont Res* 2012; 1-8.
6. Froy O, Hananel A, Chapnik N, Madar Z. Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta-defensins and Toll-like receptors in diabetic rats. *Mol Immunol* 2007;44(5):796-802.
7. Hollox EJ, Armour JA, Barber JC. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet* 2003;73:591-600.
8. Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H, Goncalves RB, Karimbux N, Napimoga MH et al. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. *Clin Exp Immunol*

- 2006;146:218-225.
9. Joly S, Organ CC, Johnson GK, McGray PB Jr, Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 2005;42:1073-1084.
 10. Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. *J Clin Microbiol* 2003;41:90-96.
 11. Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, Romanos GE, Sorsa T. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol* 2008;53:175–186.
 12. Lalla Rajesh V, D'Ambrosio A. Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *The Journal of the American Dental Association* 2001;122;10:1425-1432
 13. Lan CC, Wu CS, Huang SM, Kuo HY, Wu IH, Wen CH et al. High glucose environment inhibits p38MAPK signaling and reduces human beta-defensin 3 expressions in Keratinocytes. *Mol Med* 2011;17:771-779.
 14. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002;73:911-924.
 15. Lu Q, Samaranayake LP, Darveau RP, Jin L. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. *J Periodont Res* 2005;40:474-481.

16. Barnea M, Madar Z, Froy O. Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;367(2):452–456.
17. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol 2000* 2003;32:59-81.
18. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289–1303.
19. Page RA, Malik AN. Elevated levels of beta defensin-1 mRNA in diabetic kidneys of GK rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:513–521.
20. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GCN, Cortelli SC, Cortelli JR. Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Archives of oral biology* 2012;57:1609–1614.
21. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodont Res* 2007;42:429-437.

Tabela 1. Caracterização periodontal dos grupos do estudo.

Parâmetros periodontais	Indivíduos saudáveis (H)	Indivíduos com periodontite (P)	Indivíduos com periodontite e DM compensados (DMc)	Indivíduos com periodontite e DM descompensados (DMd)
PS média (mm)	1,70 ± 0,17 (1,47 – 2,01)	2,62 ± 0,58 (1,64 – 4,15)	2,78 ± 0,60 (2,20 – 4,18)	2,82 ± 0,76 (1,54 – 4,73)
% de sítios com PS 4mm	NA	5,71 ± 4,61 (0,00 – 16,07)	4,49 ± 4,34 (0,00 – 16,66)	7,85 ± 7,35 (0,92 – 32,95)
% de sítios com PS 5 a 6mm	NA	7,68 ± 8,07 (1,92 – 40,74)	11,26 ± 8,22 (3,12 – 31,81)	10,87 ± 8,38 (2,67 – 34,72)
% de sítios com PS ≥7mm	NA	2,04 ± 3,35 (0,00 – 13,39)	5,80 ± 8,76 (0,00 – 29,16)	3,29 ± 4,94 (0,00 – 16,66)
NIC médio	1,96 ± 0,53 (1,49 – 3,56)	3,02 ± 0,74 (1,85 – 4,91)	3,75 ± 1,17 (2,33 – 6,30)	3,59 ± 1,20 (2,21 – 6,05)
% de sítios com NIC 4mm	NA	8,24 ± 4,62 (1,92 – 16,96)	9,26 ± 6,40 (0,00 – 25,00)	10,73 ± 6,66 (0,92 – 30,20)
% de sítios com NIC 5 a 6mm	NA	12,43 ± 11,09 (2,17 – 41,66)	17,09 ± 8,40 (4,16 – 31,66)	17,37 ± 11,77 (4,54 – 44,11)
% de sítios com NIC ≥7mm	NA	4,37 ± 6,07 (0,00 – 20,83)	10,63 ± 13,03 (0,00 – 46,66)	9,86 ± 10,70 (0,00 – 32,35)
% de sítios com SS	NA	30,82 ± 20,73 (6,25 – 99,44)	42,62 ± 21,46 (12,50 – 84,09)	50,41 ± 23,85 (15,62 – 94,44)

PS = Profundidade de sondagem; NIC = Nível de inserção clínica; SS = Sangramento à sondagem.

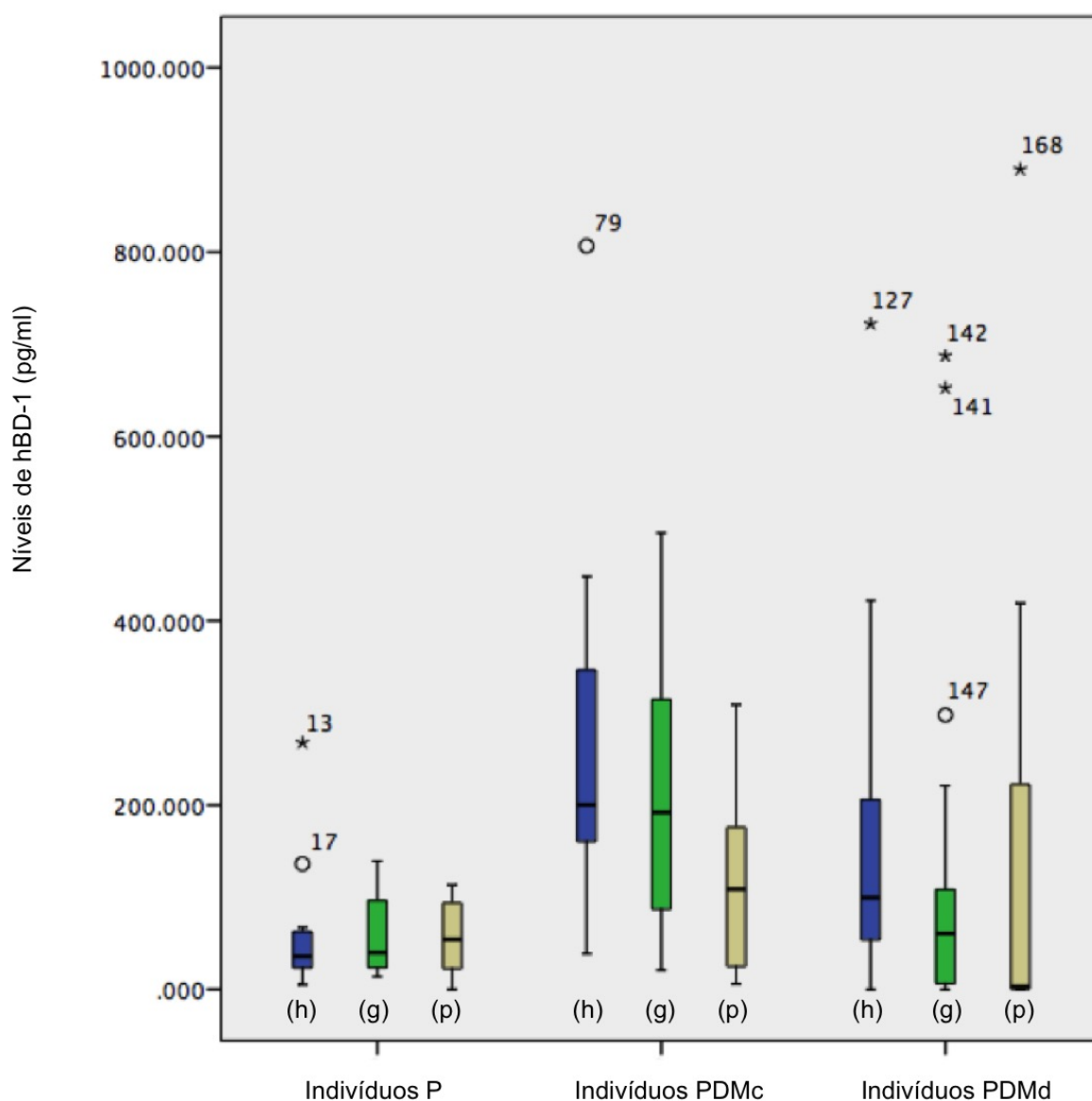


Figura 1. Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis (h), com gengivite (g), e com periodontite (p) nos diferentes grupos. Teste Dunn para comparação intragrupo dos pares: a) grupo P – h vs. g, h vs. p, g vs. p ($p > 0,05$); b) grupo PDMc – h vs. g, h vs. p, g vs. p ($p > 0,05$); c) grupo PDMd – h vs. g, h vs. p, g vs. p ($p > 0,05$).

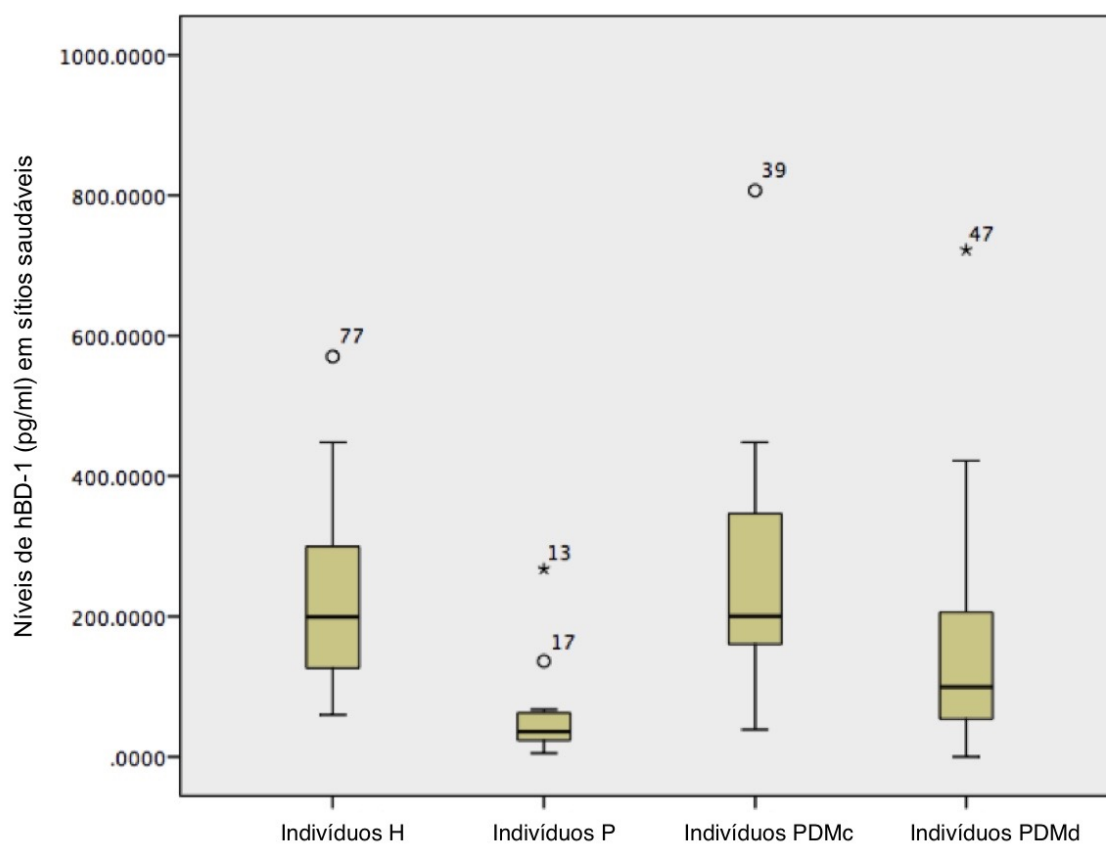


Figura 2. Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis em indivíduos saudáveis (H), indivíduos com periodontite (P), indivíduos com periodontite e diabetes mellitus compensados (PDMc) e indivíduos com periodontite e diabetes mellitus descompensados (PDMd). Teste Dunn para comparação dos pares: H vs. P ($p < 0,001$), P vs. PDMc ($p < 0,001$); demais comparações ($p > 0,05$).

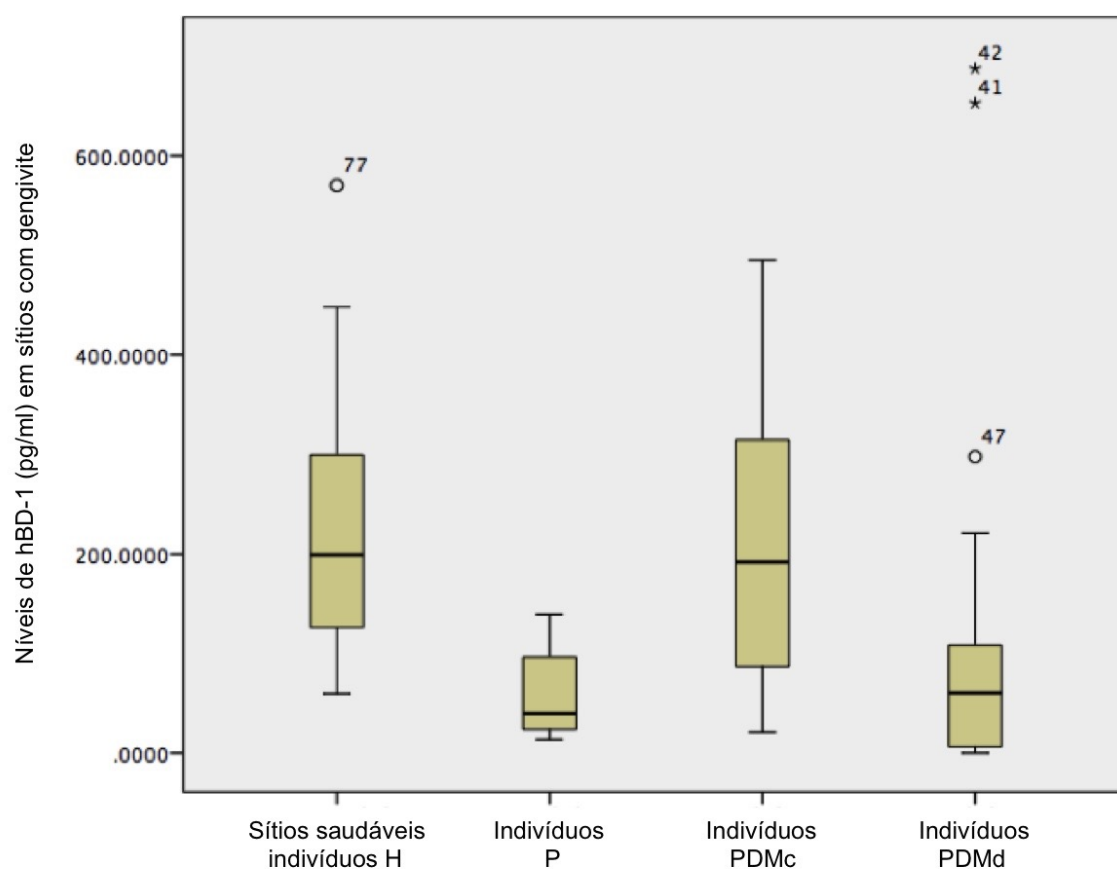


Figura 3. Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis em indivíduos saudáveis (H), e sítios com gengivite em indivíduos com periodontite (P), indivíduos com periodontite e diabetes mellitus compensados (PDMc) e indivíduos com periodontite e diabetes mellitus descompensados (PDMd). Teste Dunn para comparação dos pares: H vs. P ($p < 0,01$), H vs. PDMd ($p < 0,01$), P vs. PDMc ($p < 0,05$); demais comparações ($p > 0,05$).

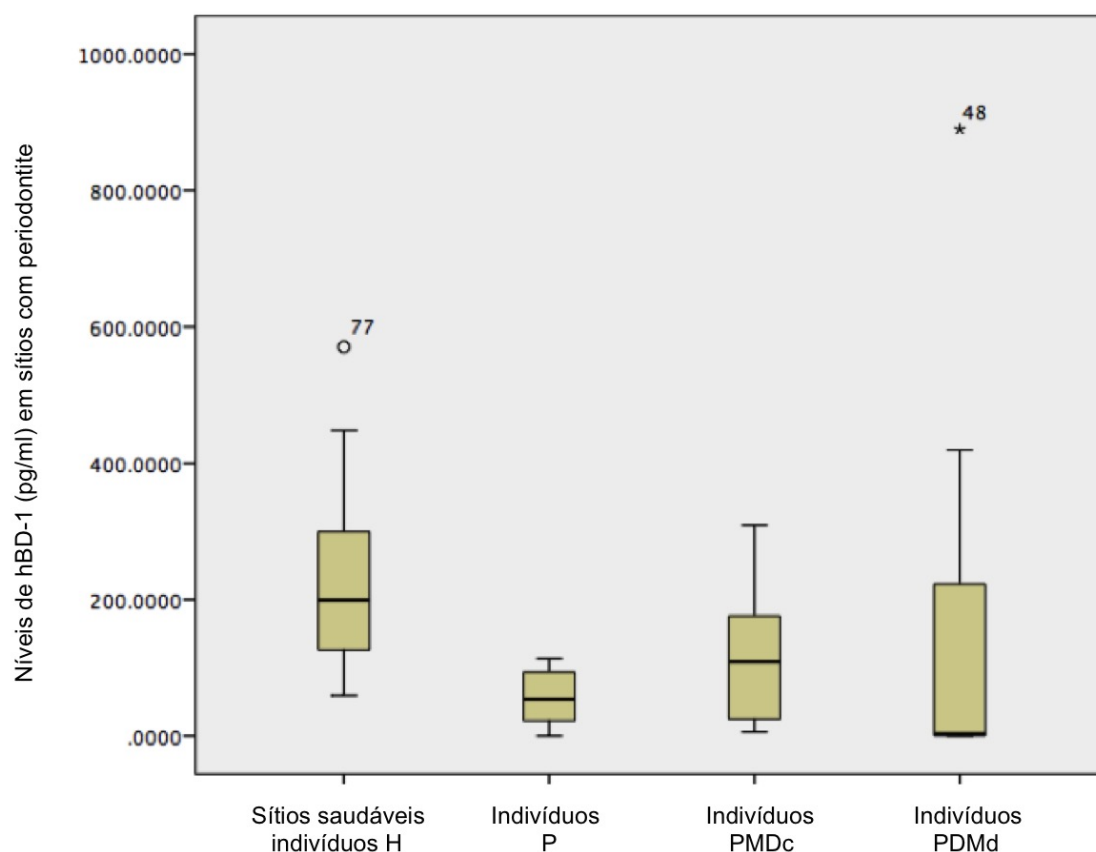


Figura 4. Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis em indivíduos saudáveis (H), e sítios com periodontite de indivíduos com periodontite (P), indivíduos com periodontite e diabetes mellitus compensados (PDMc) e indivíduos com periodontite e diabetes mellitus descompensados (PDMd). Teste Dunn para comparação dos pares: H(p) vs. P(p) ($p < 0,01$), H(p) vs. PDMd(p) ($p < 0,05$); demais comparações ($p > 0,05$).

6.4 Artigo Científico 4

Efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre os níveis de beta-defensina humana 1 em indivíduos portadores de diabetes mellitus compensados e descompensados

Resumo

Objetivo: Beta-defensinas humanas (hBDs) contribuem para a imunidade inata por ação antimicrobiana e parecem ter sua expressão afetada pela inflamação e pela hiperglicemia. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão quantitativa de beta defensina humana 1 (hBD-1) no fluido crevicular gengival (FCG) de indivíduos com periodontite crônica e Diabetes Mellitus (DM) compensado e descompensado.

Materiais e Métodos: Uma amostra de 40 indivíduos foi dividida em 2 grupos (n = 20), sendo: a) PDMc – indivíduos com DM2 compensados e periodontite; b) PDMd – indivíduos com DM2 descompensados e periodontite. As amostras de FCG foram coletadas de sítios saudáveis (h), sítios com gengivite (g) e sítios com periodontite (p) dos indivíduos com periodontite crônica e diabetes mellitus compensado (DMc) e descompensado (DMd), totalizando 480 sítios, no baseline (T0). Os indivíduos foram submetidos a terapia periodontal não-cirúrgica. Após 2 meses da terapia (T1), nova coleta de FCG foi realizada em todos os sítios coletados em T0. A quantificação das hBD-1 foi realizada pela técnica ELISA de sanduíche. Os níveis de hBD-1 intragrupo foram comparados entre T0 e T1 pelo teste de Wilcoxon. Os níveis de hBD-1 intergrupo foram comparados pelo teste Dunn para comparações múltiplas.

Resultados: Os sítios com periodontite dos indivíduos do grupo PDMc foram significativamente maiores em T1 [$196,95 \pm 106,35$ (24,70 – 360,78; mediana 192,12)] em relação a T0 [$118,15 \pm 93,94$ (5,88 – 308,98; mediana 108,65)], ($p < 0,001$). Em indivíduos do grupo PDMd não foram encontradas diferenças significativas em todos os sítios entre T1 e T0 ($p > 0,05$).

Conclusão: Os níveis elevados de glicemia podem ser responsáveis pela dificuldade do indivíduo diabético descompensado elevar a expressão de hBD-1 após a terapia periodontal não-cirúrgica, o que pode contribuir para uma resposta pior ao tratamento periodontal.

Palavras-chave: beta-defensinas, diabetes mellitus, periodontite crônica, terapia periodontal não-cirúrgica.

Introdução

As beta defensinas humanas (hBD) são peptídeos antimicrobianos importantes para a defesa inata e aumentam a resposta imune adaptativa (McCormick e Weinberg, 2010; Kohlgraf *et al.*, 2010). Defensinas se ligam a microrganismos e/ou seus produtos, atenuando seu efeito tóxico ou a sua capacidade indutora de inflamação. Estes peptídeos podem se ligar à membrana microbiana, superfície de adesinas, LPS e toxinas bacterianas específicas (Kohlgraf *et al.*, 2010).

A expressão de hBDs pode ser alterada pela presença de inflamação. De fato, evidências mostram expressões variadas de hBD-1 em indivíduos com periodontite (Dunsche *et al.*, 2002; Bissel *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004; Dommish *et al.*, 2005; Hosokawa *et al.*, 2006; Vardar-Sengul *et al.*, 2007; Kuula *et al.*, 2008, Brancatisano *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012).

Além disso, a expressão de defensinas pode ser afetada por quadros de hiperglicemia. As condições de glicose elevada podem contribuir para a ocorrência de doenças infecciosas associadas com feridas diabéticas (Lan *et al.*, 2011). Evidências sugerem que níveis mais elevados de hBDs são liberados em tecidos de indivíduos portadores de DM tratados com insulina quando comparados a indivíduos não tratados. Adicionalmente, também tem sido demonstrado que níveis elevados de hiperglicemia são capazes de reduzir a expressão de hDBs em células epiteliais (Lan *et al.*, 2011).

Estudos mostram que a terapia periodontal não-cirúrgica, melhora os parâmetros clínicos periodontais (Gay *et al.*, 2014; Koromantzios *et al.*, 2011; Tervonen *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2012) e contribui para a redução de índices glicêmicos (Gay *et al.*, 2014; Kiran *et al.*, 2005; Koromantzios *et al.*, 2011), o que, possivelmente, influenciará a expressão de beta defensinas.

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão quantitativa de hBD-1 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica e diabetes compensado e descompensado.

Metodologia

Desenho de estudo e estratégia amostral

A amostra do presente estudo foi constituída por 40 indivíduos (20 homens e 20 mulheres), com uma faixa etária entre 27 e 71 anos de idade. Os indivíduos foram divididos em 2 grupos, sendo: a) grupo PDMc – indivíduos com DM2 compensados e periodontite; b) grupo PDMD – indivíduos com DM2 descompensados e periodontite.

A amostra foi selecionada entre os pacientes da clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante o período de coleta de dados, de agosto de 2012 a dezembro de 2014, aproximadamente 360 indivíduos procuraram atendimento odontológico e foram considerados elegíveis para o estudo. De acordo com a acessibilidade e disponibilidade dos indivíduos na rotina de atendimento, eles foram aleatoriamente convidados a participar do estudo, até a formação dos grupos. Todos os indivíduos foram submetidos a um exame periodontal de boca toda, incluindo registro dos parâmetros periodontais profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS), em 4 sítios periodontais (distal, vestibular, mesial e lingual), por um único investigador treinado. A concordância intra examinador para os parâmetros PS e NIC revelou valores de Kappa maiores que 90% e coeficiente de correlação intraclass maiores que 89%.

Indivíduos saudáveis deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais, PS e NIC $\leq 3\text{mm}$ e ausência de sítios com SS. Indivíduos com periodontite crônica deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais e presença de 4 ou mais dentes com um

ou mais sítios com PS $\geq$ 4mm e NIC $\geq$ 3mm no mesmo sítio (Costa *et al.*, 2009; López *et al.*, 2002).

O controle glicêmico do DM2 foi avaliado pela concentração de hemoglobina glicada A1c (%HbA1c). Indivíduos com HbA1c superior a 7% foram considerados portadores de controle metabólico inadequado (Anonymous, 1998; Anonymous, 2009) e classificados como DM2 descompensados.

Indivíduos com história de doenças sistêmicas, gestantes e lactantes, fumantes e ex-fumantes, indivíduos em uso de medicamentos que podem influenciar a saúde periodontal, que receberam tratamento periodontal nos últimos 6 meses ou que usaram antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 3 meses foram excluídos do estudo.

Coleta de amostras de fluido crevicular gengival

Amostras de FCG foram coletadas em 2 momentos distintos, sendo uma coleta no baseline (T0) e uma coleta 2 meses após a terapia periodontal não-cirúrgica (T1). As amostras de FCG foram coletadas de sítios periodontais saudáveis (h, n = 20) e sítios periodontais doentes, sendo sítios com gengivite (g, n = 20) e sítios com periodontite (p, n = 20) do mesmo indivíduo (Dommisch *et al.*, 2005; Brancatisano *et al.*, 2011), em T0 e após a terapia, em T1, nos mesmos sítios.

Os sítios selecionados apresentavam os seguintes parâmetros clínicos: a) sítios saudáveis (Ph) – PS $\leq$ 3mm, NIC $\leq$ 3mm e sem SS; b) sítios com gengivite (Pg) – PS $\leq$ 3mm e NIC $\leq$ 3mm e SS; c) sítios com periodontite (Pp) – PS $\geq$ 4mm, NIC $\geq$ 3mm e SS.

Em cada indivíduo, 4 sítios representativos de cada categoria (saudáveis, com gengivite e com periodontite) foram coletados, totalizando 12 sítios. Os sítios com periodontite foram selecionados de acordo com a maior PS em dentes diferentes não adjacentes.

Para coleta de amostras de FCG, tiras de papel Periopaper® (PerioCol Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA) foram inseridas no sulco gengival por 30 segundos. Tiras de papel contaminadas com sangue foram descartadas. As amostras representativas de uma mesma categoria no indivíduo foram colocadas em um tubo Eppendorf seco e congeladas a -80°C até o dia da análise laboratorial. O volume total obtido foi mensurado com um aparelho calibrado (Periotron 6000, IDE Interstate, Amityville, NY, USA).

Quantificação da beta-defensina humana 1

A quantificação de hBD-1 no FCG foi realizada pela técnica ELISA sanduíche (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), de acordo com as orientações do fabricante. Resumidamente, noventa e seis poços foram revestidos com 100 μL (0,25 $\mu\text{g/mL}$) de anticorpo específico anti hBD-1 por 12 horas. Após quatro lavagens com PBST (PBS com 0.05% Tween-20), os poços foram bloqueados por 1 hora à temperatura ambiente com 300 μL de uma solução bloqueadora (1% BSA em PBST). As placas foram lavadas e 100 μL das amostras ou da solução padrão foram adicionado aos respectivos poços em duplicata, e as placas foram incubadas por 2 horas. Após nova lavagem, 100 μL do anticorpo de detecção (0.5 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado aos poços e as placas foram

incubadas por mais 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas e 100 µL de estreptavidina-peroxidase (1:2000 in PBST) foi adicionado aos respectivos poços. Placas foram incubadas em temperatura ambiente por mais trinta minutos. Reações colorimétricas foram produzidas com a utilização de o-fenilenodiamina, na presença de 0,02% de H₂O₂. Após o bloqueio da reação com H₂SO₄ (2N), a absorbância foi medida por um leitor de ELISA.

Terapia periodontal não-cirúrgica

Após a realização do exame clínico periodontal, os indivíduos foram submetidos a raspagem e alisamento radicular (RAR) por quadrante, com curetas manuais tipo Gracey, sob anestesia local, em um total de quatro semanas e instruções de higiene bucal. Todos os procedimentos periodontais foram realizados por um único periodontista treinado.

Após 2 meses da terapia periodontal não-cirúrgica (T1), novo exame clínico periodontal foi realizado, com registro de PS, NIC e SS. Nova coleta de amostras de FCG foram realizadas nos mesmos sítios coletados em T0. É importante ressaltar que, após a coleta em T1, os indivíduos com persistência de sítios com PS ≥ 4mm com SS ou supuração foram encaminhados para a realização de nova terapia não-cirúrgica ou cirúrgica, quando necessário.

Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais COEP/UFMG (CAAE – 0529.0.203.0001-11). Todos os

participantes foram informados dos objetivos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente a entrada no estudo. Todos os direitos dos participantes foram preservados em todos os momentos.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os parâmetros periodontais e os níveis de hBD-1 foram comparados intragrupo entre T0 e T1 pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Statistical Package for Social Sciences – IBM SPSS Statistics, versão 20 para Mac. Os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$.

Resultados

Os grupos do presente estudo apresentaram a seguinte composição em relação ao gênero e idade: a) PDMc – 7 mulheres e 13 homens, com idade média de $58,1 \pm 7,7$ anos (44 – 71); b) PDMd – 13 mulheres e 7 homens, com idade média de $52,4 \pm 13,5$ anos (27 – 70). A caracterização periodontal dos grupos é mostrada na Tabela 1.

Os parâmetros periodontais da amostra, no baseline (T0) e após a terapia não cirúrgica (T1) são mostrados na Tabela 1. Foi observado uma melhora significativa na maioria dos parâmetros periodontais em T1.

A Figura 1 mostra a comparação dos níveis de hBD-1 nos diferentes sítios dos grupos do estudo entre T0 e T1. No grupo PDMc, em T0 o nível de hBD-1 em sítios saudáveis PDMc(h) foi $250,63 \pm 177,57$ (38,73 – 806,71; mediana 200,30), em sítios com gengivite PDMc(g) foi $219,74 \pm 155,80$ (20,97 – 495,17; mediana 192,00), e em sítios com periodontite PDMc(p) foi $118,15 \pm 93,94$ (5,88 – 308,98; mediana 108,65); em T1, o nível de hBD-1 em sítios saudáveis PDMc(h) foi $251,51 \pm 250,55$ (0,00 – 882,13; mediana 193,44), em sítios com gengivite PDMc(g) foi $179,08 \pm 115,30$ (0,00 – 334,95; mediana 106,08), e em sítios com periodontite PDMc(p) foi $196,95 \pm 106,35$ (24,70 – 360,78; mediana 192,12). Os valores foram significativamente maiores somente nos sítios com periodontite T1 quando comparados a T0 ($p < 0,001$) (Figura 1).

No grupo PDMd, em T0 o nível de hBD-1 em sítios saudáveis PDMd(h) foi $160,06 \pm 177,95$ (0,00 – 722,16; mediana 99,56), em sítios com gengivite PDMd(g) foi $124,15 \pm 202,36$ (0,00 – 687,27; mediana 60,50), e em sítios com periodontite PDMd(p) foi $153,71 \pm 232,84$ (0,00 – 889,77; mediana 3,23); em T1, os nível de hBD-1 em sítios saudáveis PDMd(h) foi $184,61 \pm 140,59$ (3,23 – 557,47; mediana 203,11), em sítios com gengivite PDMd(g) foi $111,43 \pm 74,04$ (0,00 – 342,43; mediana 107,18), e em sítios com periodontite PDMd(p) foi $91,75 \pm 69,58$ (0,00 – 216,64; mediana 82,24). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de hBD-1 em T1 quando comparados a T0 ($p > 0,05$) (Figura 1).

Discussão

Este é o primeiro estudo de intervenção a avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre a expressão quantitativa de hBD-1 no FCG de indivíduos com periodontite crônica e diabetes mellitus compensado e descompensado. Na literatura, há apenas um estudo Ertugral *et al.* (2011), que avalia a expressão de hBDs em indivíduos com periodontite e diabetes, no entanto, não diferenciaram indivíduos diabéticos compensados de descompensados, além de não terem avaliado o efeito da terapia periodontal sobre a expressão das defensinas.

O presente estudo teve a hipótese de que a terapia periodontal não-cirúrgica aumenta a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e doentes, com gengivite e com periodontite, de indivíduos com periodontite crônica e diabetes mellitus compensados e descompensados.

Os achados do presente estudo mostraram que os indivíduos do grupo PDMd apresentaram um percentual elevado de sítios com PS alterada e com SS. Estes achados corroboram com o estudo de Mealey e Oates (2006). Estes concluíram que indivíduos com diabetes descompensado apresentam formas mais graves de periodontite em relação a indivíduos portadores de DM compensado (Mealey e Oates, 2006).

Ainda em relação aos parâmetros clínicos periodontais, nossos achados mostraram uma melhora após a terapia periodontal não-cirúrgica, que consistiu em raspagem e alisamento radicular. Nossos resultados seguem os achados positivos dos estudos de Gay *et al.* (2014), Koromantzios *et al.* (2011), Tervonen *et al.* (1991), e Chen *et al.*

(2012), que avaliaram o efeito da terapia periodontal em indivíduos portadores de DM2. Os achados do estudo de Gay *et al.* (2014) mostraram que a terapia periodontal não-cirúrgica melhorou os parâmetros clínicos periodontais no grupo teste, em relação ao grupo controle, que recebeu instruções de higiene bucal, sem terapia mecânica profissional. Koromantzios *et al.* (2011) avaliaram o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica em indivíduos com DM2 e periodontite de moderada a grave. Mostraram uma redução nas bolsas mais profundas e moderadas e aumento nos sítios com PS de 1 a 3 mm. O grupo controle também seguiu uma tendência similar para a redução das bolsas mais profundas e um aumento no número de bolsas rasas, porém, em uma magnitude menor, quando comparado aos resultados do grupo de teste. Os estudos de Tervonen *et al.* (1991) e Chen *et al.* (2012) mostraram uma redução nos parâmetros clínicos periodontais após a raspagem e alisamento radicular em pacientes com DM2 e periodontite crônica de leve a moderada. No entanto, os estudos de Jones *et al.* (2007) e Yun *et al.* (2007) contradizem nossos achados, demonstrando que o tratamento periodontal não promoveu melhora nos parâmetros clínicos periodontais em indivíduos com Diabetes Mellitus.

Os resultados do presente estudo mostraram níveis mais elevados de hBD-1 em sítios com periodontite dos indivíduos diabéticos compensados, após a terapia periodontal, enquanto os níveis de hBD-1 continuaram reduzidos em todos os sítios dos indivíduos diabéticos descompensados, mesmo após o tratamento periodontal. Estes resultados seguem os achados do estudo 3, desta mesma linha de pesquisa, que apresentou níveis mais elevados de hBD-1 em indivíduos com diabetes compensado, e níveis reduzidos em indivíduos diabéticos descompensados.

Estes achados sugerem que a glicemia parece ter um efeito importante nos níveis de hBD-1. Nossos pressupostos podem ser apoiados pelos resultados dos estudos de Lan *et al.*, 2011, Barnea *et al.*, 2008 e Froy *et al.*, 2007. Lan *et al.* (2011) mostraram que condições de glicose elevada inibiram a expressão de hBD-3 em queratinócitos epidermais de ratos. Barnea *et al.*, (2008) encontraram níveis de hBD-1 elevados após o tratamento com insulina, em células de rim embrionário, e sugeriram que a sinalização de insulina é importante para uma expressão ótima de hBD pela elevação dos níveis intracelulares de glicose e pela mediação da expressão do gene da defensina. Froy *et al.*, (2007) avaliaram o efeito do tratamento com insulina sobre os níveis de beta defensinas em ratos diabéticos, e encontraram resultados sugestivos de que a glicose sanguínea elevada, e/ou deficiência de insulina, anula o nível de expressão de defensinas e receptores toll-like, explicando as doenças infecciosas recorrentes durante o DM.

Conclusão

A terapia periodontal não cirúrgica parece não ser capaz de aumentar a expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de indivíduos portadores de DM descompensados. Os índices glicêmicos elevados parecem influenciar, direta ou indiretamente, os níveis de hBD-1 nos sítios periodontais, mesmo após a terapia periodontal não-cirúrgica, sugerindo uma potencial contribuição para uma resposta deficiente ao tratamento periodontal.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos a todos os participantes do estudo pelo seu tempo e envolvimento.

Referências

1. Anonymous. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-853.
2. Anonymous. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009;32 Suppl 1:S62-67.
3. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB Jr et al. Expression of β -defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2004;33:278-285.
4. Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res* 2011;90:241-245.
5. Chen L, Luo G, Xuan D, Wei B, Liu F, Li J, Zhang J. Effects of non-surgical periodontal treatment on clinical response, serum inflammatory parameters, and metabolic control in patients with type 2 diabetes: a randomized study. *J Periodontol* 2012;83,435–443.
6. Costa FO, Guimaraes AN, Cota LO, Pataro AL, Segundo TK, Cortelli SC, Costa JE. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Science* 2009;51:199–206.

7. Dommisch H, Açil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:186-190.
8. Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002;2:121-124.
9. Ertugrul AS, Dikilitas A, Sahin H, Alpaslan N, Bozoglan A, Tekin Y. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensins 1 and 3 in subjects with periodontitis and/or type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *J Periodont Res* 2012; 1-8.
10. Froy O, Hananel A, Chapnik N, Madar Z. Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta defensins and Toll-like receptors in diabetic rats. *Mol Immunol* 2007;44(5):796-802.
11. Gay IC, Tran DT, Cavender AC, Weltman R, Chang J, Luckenbach E, Tribble GD. The effect of periodontal therapy on glycemic control in a Hispanic population with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 673–680.
12. Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H, Goncalves RB, Karimbux N, Napimoga MH et al. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. *Clin Exp Immunol* 2006;146:218-225.
13. Jones JA, Miller DR, Wehler CJ, Rich SE, Krall-Kaye EA, McCoy LC, Christiansen CL, Rothendler JA, Garcia RI. Does periodontal care improve glycaemic control?

The department of veterans affairs dental diabetes study *J Clin Periodontol* 2007;34, 46–52.

14. Kiran M, Arpak N, Unsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2005;32:266–272.
15. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol* 2010;5:99-113.
16. Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol* 2011;38,142–147.
17. Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, Romanos GE, Sorsa T. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol* 2008;53:175–186.
18. Lan CC, Wu CS, Huang SM, Kuo HY, Wu IH, Wen CH et al. High glucose environment inhibits p38MAPK signaling and reduces human beta-defensin 3 expressions in Keratinocytes. *Mol Med* 2011;17:771-779.
19. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002;73:911-924.
20. Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2004;39:221-227.

21. Barnea M, Madar Z, Froy O. Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;367(2):452–456.
22. McCormick TS, Weinberg A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontol 2000* 2010;54:195-206.
23. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289–1303.
24. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GCN, Cortelli SC, Cortelli JR. Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Archives of oral biology* 2012;57:1609–1614.
25. Tervonen T, Knuuttila M, Pohjamo L, Nurkkala H. Immediate response to nonsurgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1991;18,65–68.
26. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodont Res* 2007;42:429-437.
27. Yun F, Firkova EI, Jun-Qi L, Xun H. Effect of non-surgical periodontal therapy on patients with type 2 diabetes mellitus. *Folia Medica* 2007;8(49):32–36.

Tabela 1. Comparação dos parâmetros periodontais entre o baseline (T0) e 2 meses após a terapia periodontal não-cirúrgica (T1).

Parâmetros Periodontais	Indivíduos PDMc			Indivíduos PDMd		
	T0	T1	p*	T0	T1	p*
PS média (mm)	2,78 ± 0,60 (2,20 – 4,18)	2,04 ± 0,44 (1,57 – 3,38)	<0,0001	2,82 ± 0,76 (1,54 – 4,73)	2,47 ± 1,14 (1,42 – 4,90)	0,007
% de sítios com PS 4mm	4,49 ± 4,34 (0,00 – 16,66)	2,90 ± 3,26 (0,00 – 11,66)	0,078	7,85 ± 7,35 (0,92 – 32,95)	2,63 ± 3,21 (0,00 – 10,27)	0,001
PS 5 a 6mm	11,26 ± 8,22 (3,12 – 31,81)	3,26 ± 7,02 (0,00 – 30,95)	<0,0001	10,87 ± 8,38 (2,67 – 34,72)	2,24 ± 3,76 (0,00 – 12,90)	<0,0001
PS ≥7mm	5,80 ± 8,76 (0,00 – 29,16)	1,36 ± 3,46 (0,00 – 15,00)	0,002	3,29 ± 4,94 (0,00 – 16,66)	1,62 ± 5,24 (0,00 – 23,43)	0,123
NIC médio (mm)	3,75 ± 1,17 (2,33 – 6,30)	2,97 ± 0,81 (1,95 – 4,94)	<0,0001	3,59 ± 1,20 (2,21 – 6,05)	3,04 ± 1,02 (1,95 – 5,36)	0,002
% de sítios com NIC 4mm	9,26 ± 6,40 (0,00 – 25,00)	6,71 ± 3,47 (1,78 – 13,63)	0,086	10,73 ± 6,66 (0,92 – 30,20)	8,41 ± 4,73 (2,38 – 23,80)	0,251
NIC 5 a 6mm	17,09 ± 8,40 (4,16 – 31,66)	14,23 ± 11,86 (0,00 – 39,28)	0,099	17,37 ± 11,77 (4,54 – 44,11)	12,33 ± 12,40 (0,00 – 44,11)	0,002
NIC ≥7mm	10,63 ± 13,03 (0,00 – 46,66)	5,30 ± 7,55 (0,00 – 26,00)	0,001	9,86 ± 10,70 (0,00 – 32,35)	5,46 ± 8,47 (0,00 – 25,00)	0,001
% de sítios com SS	42,62 ± 21,46 (12,50 – 84,09)	19,64 ± 15,51 (3,94 – 66,66)	<0,0001	50,41 ± 23,85 (15,62 – 94,44)	25,65 ± 16,02 (3,40 – 56,25)	<0,0001

* teste de Wilcoxon. PS = Profundidade de sondagem; NIC = Nível de inserção clínica;

SS = Sangramento à sondagem.

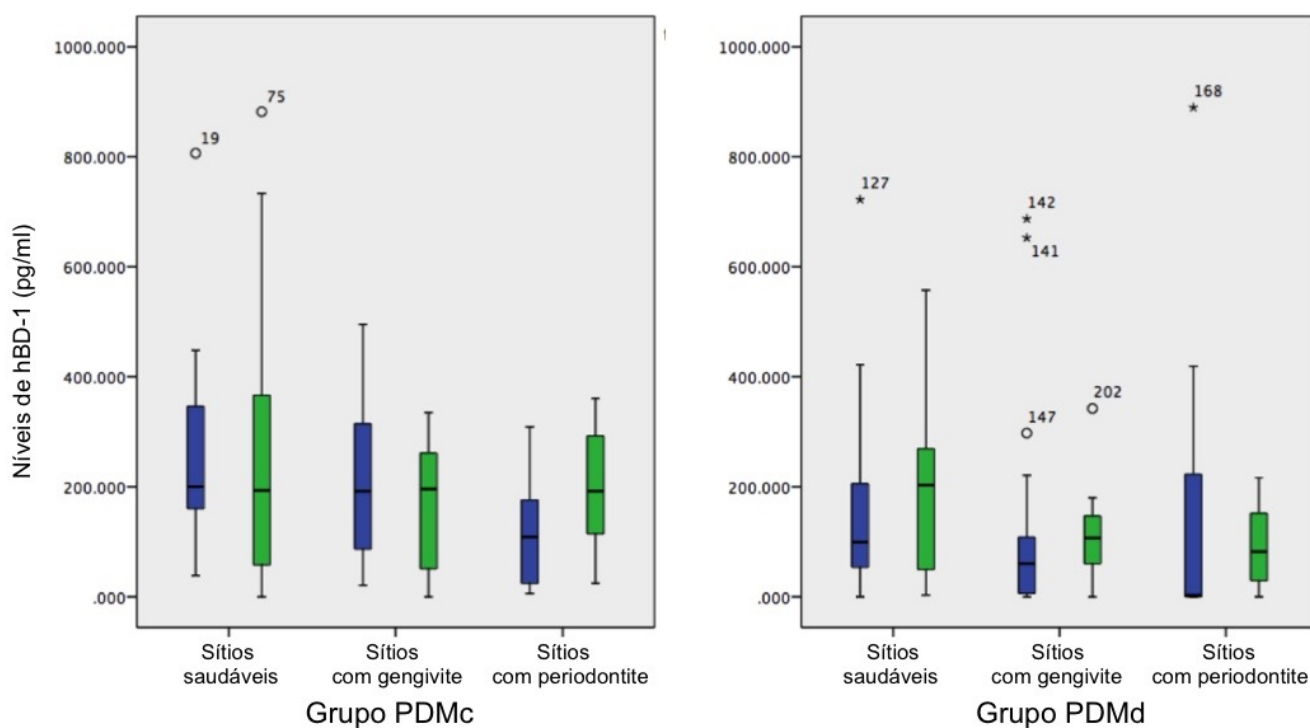


Figura 1. Comparação dos níveis de hBD-1 (pg/ml) nos sítios saudáveis (h), sítios com gengivite (g) e sítios com periodontite (p) entre o baseline (T0) e 2 meses após terapia não-cirúrgica (T1) para os indivíduos com periodontite e diabetes mellitus compensados (PDMc) e descompensados (PDMd). Teste de Wilcoxon para amostras pareadas: PDMc [h(T0) vs. h(T1), $p = 0,940$; g(T0) vs. g(T1), $p = 0,478$; p(T0) vs. p(T1), **$p = 0,004$**], PDMd [h(T0) vs. h(T1), $p = 0,351$; g(T0) vs. g(T1), $p = 0,313$; p(T0) vs. p(T1), $p = 0,411$].

6.5 Artigo Científico 5

Efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre os índices glicêmicos de indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados: um ensaio clínico controlado.

Resumo

Objetivo: A periodontite crônica é uma doença infecciosa inflamatória com potenciais efeitos sistêmicos. Evidências sugerem que a periodontite pode afetar o controle glicêmico do diabetes mellitus. Este estudo de intervenção teve o objetivo de avaliar o efeito do terapia periodontal não-cirúrgica sobre os parâmetros periodontais e os índices glicêmicos de indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

Materiais e Métodos: Foram incluídos 40 indivíduos, divididos em 2 grupos: a) PDMc = 20 indivíduos com periodontite e DM2 compensada; b) grupo PDMd = 20 indivíduos com periodontite e DM2 descompensada. No baseline (T0), foi realizado exame periodontal completo e exames de glicemia em jejum e hemoglobina glicada. Todos pacientes foram submetidos à raspagem e alisamento radicular. Após 2 meses da terapia periodontal (T1), foi realizado novo exame periodontal completo e exames de glicemia em jejum e hemoglobina glicada.

Resultados: Houve melhora significativa nos parâmetros periodontais avaliados de T0 para T1 para os 2 grupos. Houve uma redução significativa da hemoglobina glicada no grupo PDd de T0 ($9,59 \pm 1,54$) para T1 ($8,55 \pm 1,34$) ($p = 0,039$).

Conclusão: A terapia periodontal não-cirúrgica reduziu significativamente os níveis de hemoglobina glicada em indivíduos descompensados, indicando um potencial efeito do tratamento periodontal no controle glicêmico.

Palavras-chave: controle glicêmico, diabetes mellitus, hemoglobina glicada, periodontite crônica, terapia periodontal não-cirúrgica.

Introdução

A periodontite é uma doença infecciosa crônica dos tecidos de suporte dental. Em decorrência do seu caráter multifatorial, a periodontite pode ter seu início e sua progressão modificada por fatores sistêmicos específicos, como o Diabetes Mellitus (DM) (Eberhard *et al.*, 2008).

O DM é um grupo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, a qual é o resultado da deficiência total ou parcial na secreção de insulina e/ou resistência do organismo à sua ação (Amos, 1997). Estima-se que 346 milhões de indivíduos sejam portadores de DM e, segundo a previsão da World Health Organization (WHO), este número aumentará para 439 milhões de pessoas, aproximadamente 10% de adultos, em 2030 (WHO, 2011).

Na hiperglicemia, ocorre um acúmulo de produtos finais de glicosilação (AGEs), no plasma e tecidos. Os AGEs se formam através da glicosilação e oxidação de proteínas e lipídeos e têm a capacidade de se ligarem a receptores de membrana (RAGE). A interação AGE-RAGE em células endoteliais provoca um aumento da permeabilidade vascular e favorece a formação de trombos. Já em monócitos/macrófagos, a interação

aumenta o estresse oxidativo celular, o que resulta em maior produção e secreção de citocinas inflamatórias, como interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β , IL-6) e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), associadas à diferenciação e atividade osteoclástica e também à produção de metaloproteinases da matriz (MMPs), com destruição do colágeno, atuando, portanto, efetivamente na patogênese da periodontite (Mealey & Oates, 2006).

A presença de periodontite pode resultar em um aumento sistêmico dos níveis de citocinas inflamatórias, como: IL-6, TNF- α , proteína C reativa e fibrinogênio. Indivíduos diabéticos apresentam altos níveis destes marcadores inflamatórios no sangue, os quais são relacionados à resistência à insulina. Desta forma, a presença da periodontite resulta em elevação dos níveis sanguíneos destes marcadores, o que induz resistência à insulina, prejudicando o controle glicêmico (Mealey & Oates, 2006; Page, 1998).

A periodontite e o Diabetes Mellitus (DM) são doenças crônicas complexas, com uma relação bidirecional discutível (Taylor *et al.*, 2013). Indivíduos com DM têm um risco aumentado de desenvolver a forma mais grave de periodontite e é biologicamente plausível que a não resolução da inflamação crônica derivada da periodontite, cause impacto sobre o controle glicêmico do diabético, piorando também suas complicações (Chapple & Genco, 2013; Garcia *et al.*, 2015).

O controle glicêmico é avaliado pelo nível de hemoglobina glicada (HbA1c), que reflete os níveis séricos de glicose, durante um tempo de 120 dias, nas células sanguíneas vermelhas, sendo considerada uma medida robusta do controle glicêmico (Engelgau *et al.*, 1997; Maggs *et al.*, 1998; Yale *et al.*, 2001; Hundal *et al.*, 2002; Knowler *et al.*, 2002,

Selvin *et al.*, 2004).

As doenças infecciosas agudas e crônicas podem influenciar negativamente o controle glicêmico (Sammalkorpi, 1989; Chapple & Genco, 2013; Garcia *et al.*, 2015). Adicionalmente, foi demonstrado que os níveis de HbA1c podem ser afetados, adversamente, pela inflamação sistêmica (Shoelson *et al.*, 2006). Neste contexto, e para as últimas décadas, uma ligação biologicamente plausível entre o controle metabólico e periodontite tem sido investigado (Taylor, 2001; Taylor *et al.*, 2013).

Algumas evidências apontam que o adequado tratamento periodontal pode contribuir positivamente no controle dos níveis de HbA1c, sendo a periodontite uma condição que pode predispor à ocorrência de complicações do DM (Engebretson & Kocher, 2013). Tendo em vista a elevada prevalência de indivíduos portadores de DM tipo 2 (DM2) na população mundial, e considerando-se os elevados índices de periodontite e perda dental relacionados à presença do DM, torna-se ainda mais importante o controle e o gerenciamento dessas doenças. O controle da periodontite pode trazer novas estratégias para o controle glicêmico e contribuir para a melhora na qualidade de vida dos indivíduos diabéticos.

Assim, o objetivo deste estudo de intervenção foi avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre os parâmetros periodontias e os índices glicêmicos de indivíduos portadores de DM2 compensados, descompensados e periodontite crônica.

Materiais e Métodos

Desenho de estudo e estratégia amostral

A amostra do presente estudo compreendeu 40 indivíduos (20 homens e 20 mulheres) com uma faixa etária entre 27 e 71 anos de idade ($55,23 \pm 9,47$). Os indivíduos foram divididos entre 2 grupos, sendo: a) PDMc = 20 indivíduos com periodontite e DM2 compensada; b) grupo PDMD = 20 indivíduos com periodontite e DM2 descompensada.

Todos os indivíduos foram selecionados entre os pacientes da clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante o período de coleta de dados, de agosto de 2012 a dezembro de 2014, aproximadamente 360 indivíduos procuraram atendimento odontológico e foram considerados elegíveis para o estudo. De acordo com a acessibilidade e disponibilidade dos indivíduos na rotina de atendimento, eles foram aleatoriamente convidados a participar do estudo, até a formação dos grupos. Todos os indivíduos foram submetidos a um exame periodontal de boca toda, incluindo registro dos seguintes parâmetros periodontais: profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento a sondagem (SS) em 4 sítios periodontais (distal, vestibular, mesial e lingual) por um único investigador treinado. A concordância intra examinador para os parâmetros PS e NIC revelou valores de Kappa maiores que 90% e coeficiente de correlação intraclass maiores que 89%.

Indivíduos deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais e pelo menos 4 dentes com um ou mais sítios com $PS \geq 4\text{mm}$, $NIC \geq 3\text{mm}$ no mesmo sítio (Costa *et al.*, 2009; López *et al.*, 2002).

O controle glicêmico do DM2 foi avaliado pela concentração de hemoglobina glicada A1c (%HbA1c). Indivíduos com HbA1c superior a 7% foram considerados portadores de controle metabólico inadequado (Anonymous, 1998; Anonymous, 2009) e classificados como DM2 descompensados.

Indivíduos com história de doenças sistêmicas (com exceção do DM) , gestantes e lactantes, fumantes e ex-fumantes, indivíduos em uso de medicamentos que poderiam influenciar a saúde periodontal, que receberam tratamento periodontal nos últimos 6 meses ou que usaram antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 3 meses foram excluídos do estudo.

Terapia periodontal não-cirúrgica

Após a realização do exame clínico periodontal e dos exames laboratoriais para avaliação dos parâmetros glicêmicos no baseline (T0), todos os indivíduos receberam instruções de higiene bucal e foram submetidos a raspagem e alisamento radicular por quadrante realizada com um aparelho de ultrassom (Gnatus, Jet Sonic, Brussels, Belgium) e curetas manuais tipo Gracey (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) sob anestesia local, em um total de quatro semanas. Todos os procedimentos periodontais foram realizados por um único periodontista treinado.

Após 2 meses da terapia periodontal não-cirúrgica (T1), novo exame clínico periodontal foi realizado, com registro de PS, NIC e SS. Além disso, novos exames laboratoriais para avaliação dos parâmetros glicêmicos foram realizados.

É importante ressaltar que, após T1, os indivíduos com persistência de sítios com PS $\geq$ 4mm, com SS ou supuração, foram encaminhados para a realização de nova terapia não-cirúrgica ou cirúrgica, quando necessário.

Avaliação das variáveis sócio-demográficas

Em T0, foram coletados dados em relação às seguintes variáveis sócio-demográficas: gênero, idade, peso, altura, IMC, renda familiar, situação conjugal e escolaridade.

Avaliação dos parâmetros glicêmicos

Exames laboratoriais de glicemia em jejum e HbA1c foram realizados para todos os participantes em T0 e T1. Mudança nos níveis de HbA1c foi considerado o desfecho primário.

Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais COEP/UFMG (CAAE – 0529.0.203.0001-11). Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente a entrada no estudo. Todos os direitos dos participantes foram preservados em todos os momentos.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Inicialmente, no baseline (T0), os grupos foram comparados entre si em relação a variáveis

sociodemográficas de interesse e os parâmetros periodontais pelo Qui-quadrado ou Exato de Fisher, teste t para amostras independentes, e teste de Mann-Whitney. Os grupos foram comparados em relação a parâmetros periodontais e parâmetros glicêmicos entre T0 e T1 pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Statistical Package for Social Sciences – IBM SPSS Statistics, versão 20 para Mac. Os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$.

Resultados

Uma caracterização dos grupos em relação às variáveis sócio-demográficas de interesse é apresentada na Tabela 1. Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação a gênero, idade, peso, altura, índice de massa corporal (IMC), renda familiar e situação conjugal.

A tabela 2 apresenta a caracterização periodontal dos grupos e a comparação dos parâmetros periodontais entre T0 e T1.

A caracterização e a comparação dos índices glicêmicos entre T0 e T1 é mostrado na Tabela 3. Foi observado que houve uma redução significativa da hemoglobina glicada no grupo de indivíduos descompensados PDMd ($p = 0,039$).

Discussão

Periodontite e DM estão intimamente associados e são doenças crônicas altamente prevalentes, com muitas semelhanças em patogênese e biologia molecular (Mealey &

Oates, 2006). É possível que a periodontite pode servir como iniciadora ou propagadora de resistência à insulina, agravando assim o controle glicêmico dos indivíduos afetados (Mealey & Oates, 2006; Taylor *et al.*, 2013).

Os resultados do presente estudo mostraram uma redução significativa dos níveis de HbA1c no grupo de indivíduos portadores de DM2 descompensados. Entretanto, é importante notar que os níveis de HbA1c continuaram acima de 7%, limiar considerado para se caracterizar um controle metabólico inadequado (Anonymous, 1998; Anonymous, 2009). Estes resultados são corroborados pelo estudo de Gay *et al.* (2014), Kiran *et al.* (2005) e Koromantzos *et al.* (2011). Nestes estudos, a terapia periodontal não-cirúrgica reduziu os níveis de HbA1c em 40% a 80% em relação ao grupo controle, que recebeu apenas instruções de higiene bucal, sem terapia mecânica profissional.

A redução da HbA1c é um desfecho de sucesso estabelecido no tratamento do DM2. A revisão sistemática e meta-análise de Engebretson & Kocher (2013) estudou o efeito do tratamento periodontal sobre os resultados do DM. Concluíram que as evidências derivadas de ensaios clínicos randomizados mostraram que a terapia periodontal resulta em uma média de redução de hemoglobina glicada de 36% (IC 95% 0,19 – 0,54) aos 3 meses. No presente estudo, a redução foi de 10,84%. No entanto, os achados do estudo de Chen *et al.* (2012) diferiram dos resultados do presente estudo ao mostrarem que o tratamento periodontal não promoveu melhora no status metabólico dos grupos participantes.

Os mecanismos da plausibilidade biológica seriam que a resolução da inflamação periodontal, após a terapia, promoveria uma redução dos níveis de mediadores inflamatórios localmente e, portanto, redução dos níveis destes mediadores na circulação sanguínea. Evidências sugerem que mediadores chave neste processo poderiam ser a IL-6 e o TNF- α , que são indutores de proteínas da fase aguda, tais como PCR, e ambos têm provado ser prejudicial para a sinalização intracelular de insulina (Page, 1998; Hotamisligil, 2000; Rotter *et al.*, 2003; Mealey & Oates, 2006). A redução dos níveis destes mediadores, como resultado da terapia periodontal poderia, teoricamente, levar a uma melhoria no controle glicêmico. No entanto, essas hipóteses continuam a ser formalmente testadas.

No presente estudo, a terapia periodontal não-cirúrgica foi eficiente na melhoria dos parâmetros clínicos periodontais. Estes resultados são corroborados pelos estudos de Gay *et al.* (2014); Koromantzos *et al.* (2011); Tervonen *et al.* (1991) e Chen *et al.* (2012), que avaliaram o efeito da terapia periodontal em indivíduos portadores de DM2. Os achados do estudo de Gay *et al.* (2014) mostraram que a terapia periodontal não-cirúrgica melhorou os parâmetros clínicos periodontais no grupo teste, em relação ao grupo controle, que recebeu instruções de higiene bucal, sem terapia mecânica profissional. Koromantzos *et al.* (2011) avaliaram o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica em indivíduos com DM2 e periodontite de moderada a grave. Mostraram uma redução nas bolsas mais profundas e moderadas e aumento nos sítios com PS de 1 a 3 mm. O grupo controle também seguiu uma tendência similar para a redução das bolsas mais profundas e um aumento no número de bolsas rasas, porém em uma magnitude menor quando comparado aos resultados do grupo de teste. Os estudos de Tervonen

et al. (1991) e Chen *et al.* (2012) mostraram uma redução nos parâmetros clínicos periodontais, após a raspagem e alisamento radicular, em pacientes com DM2 e periodontite crônica de leve a moderada. No entanto, os estudos de Jones *et al.* (2007) e Yun *et al.* (2007) contradizem nossos achados, demonstrando que o tratamento periodontal não promoveu melhora nos parâmetros clínicos periodontais em pacientes com DM.

Algumas limitações do presente estudo podem ser apontadas, como o tamanho amostral e a ausência de um grupo sem tratamento. Assim, estudos randomizados, multicêntricos, com um tempo de acompanhamento maior tornam-se necessários para confirmar nossos resultados e avaliar o impacto do tratamento periodontal sobre os índices glicêmicos. Entretanto, um cálculo a posteriori do poder do nosso estudo, considerando os resultados obtidos e um tamanho de efeito de 0,6 (d de Cohen), indicou um poder (β) de 77%.

Conclusão

A terapia periodontal não-cirúrgica, além de levar a uma melhora significativa nos parâmetros clínicos periodontais avaliados, foi capaz de reduzir os níveis de HbA1c em indivíduos diabéticos descompensados, sugerindo um potencial efeito do tratamento periodontal no controle glicêmico do DM.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos à todos os participantes do estudo pelo seu tempo e envolvimento.

Referências

1. Amos AF, MacCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997;14(5): S1-5.
2. Anonymous. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-853.
3. Anonymous. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009;32 Suppl 1:S62-67.
4. Chapple ILC, Genco R, and on behalf of working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* 2013;40 (Suppl. 14): S106–S112.
5. Chen L, Luo G, Xuan D, Wei B, Liu F, Li J, Zhang J. Effects of non-surgical periodontal treatment on clinical response, serum inflammatory parameters, and metabolic control in patients with type 2 diabetes: a randomized study. *J Periodontol* 2012;83,435–443.

6. Costa FO, Guimaraes AN, Cota LO, Pataro AL, Segundo TK, Cortelli SC, Costa JE. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Science* 2009;51:199–206.
7. Eberhard J, Jervoe-Storm PM, Needleman I, Worthington H, Jepsen S. Full-mouth treatment concepts for chronic periodontitis: a systematic review. *J Clinical Periodontol* 2008; 35: 591-604.
8. Engebretson S, Kocher T. Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2013;40 (Suppl.14): S153–S163.
9. Engelgau MM, Thompson TJ, Herman WH, Boyle JP, Aubert RE, Kenny SJ, Badran A, Sous ES, Ali MA. Comparison of fasting and 2-hour glucose and HbA1c levels for diagnosing diabetes. Diagnostic criteria and performance revisited. *Diabetes Care* 1997;20,785–791.
10. Garcia D, Tarima S, Okunseri C. Periodontitis and Glycemic Control in Diabetes: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* 2015; 86(4):499-506.
11. Gay IC, Tran DT, Cavender AC, Weltman R, Chang J, Luckenbach E, Tribble GD. The effect of periodontal therapy on glycemic control in a Hispanic population with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 673–680.
12. Hotamisligil, G. S. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2003;24(Suppl 4):S23– S27.
13. Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Investigation* 2002;109,1321–1326.

14. Jones JA, Miller DR, Wehler CJ, Rich SE, Krall-Kaye EA, McCoy LC, Christiansen CL, Rothendler JA, Garcia RI. Does periodontal care improve glycaemic control? The department of veterans affairs dental diabetes study *J Clin Periodontol* 2007;34, 46–52.
15. Kiran M, Arpak N, Unsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2005;32:266–272.
16. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New England J Med* 2002;346, 393–403.
17. Koromantzios PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol* 2011;38,142–147.
18. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002;73:911-924.
19. Maggs DG, Buchanan TA, Burant CF, Cline G, Gumbiner B, Hsueh WA, Inzucchi S, Kelley D, Nolan J, Olefsky JM, Polonsky KS, Silver D, Valiquett TR, Shulman GI. Metabolic effects of troglitazone monotherapy in type 2 diabetes mellitus. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals Internal Med* 1998;128, 176–185.
20. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289–1303.

21. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 1998;3:108-120.
22. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:45777– 45784.
23. Sammalkorpi K. Glucose intolerance in acute infections. *J Internal Medicine* 1989;225:15–19.
24. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Annals Internal Medicine* 2004;141:421–431.
25. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The J Clin Investigation* 2006;116, 1793–1801.
26. Taylor GW. Bidirectional interrelationships. between diabetes, and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* 2001;6:99-112.
27. Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology* 2013;40(14):113–134.
28. Tervonen T, Knuuttila M, Pohjamo L, Nurkkala H. Immediate response to nonsurgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1991;18,65–68.
29. World Health Organization (2011) Fact Sheet No. 312. Diabetes [WWW document]. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> [accessed on 21 October 2015].

30. Yale JF, Valiquett TR, Ghazzi MN, Owens-Grillo JK, Whitcomb RW, Foyt HL. The effect of a thiazolidinedione drug, troglitazone, on glycemia in patients with type 2 diabetes mellitus poorly controlled with sulfonylurea and metformin. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals Internal Med* 2001;134,737–745.
31. Yun F, Firkova EI, Jun-Qi L, Xun H. Effect of non-surgical periodontal therapy on patients with type 2 diabetes mellitus. *Folia Medica* 2007;8(49):32–36.

Tabela 1. Caracterização da amostra em relação a variáveis sócio-demográficas de interesse.

Variáveis	Grupo PDMc	Grupo PDMd	P
Gênero			
mulheres	7 (35%)	13 (65%)	0,058*
homens	13 (65%)	7 (35%)	
Idade (anos)			
	58,05 ± 7,71 (44 – 71)	52,40 ± 10,39 (27 – 70)	0,059**
Peso (kg)			
	79,50 ± 14,26 (59 – 124)	76,80 ± 16,68 (52 – 126)	0,585**
Altura (m)			
	1,65 ± 0,10 (1,43 – 1,82)	1,62 ± 0,08 (1,48 – 1,75)	0,283**
IMC			
	29,26 ± 5,55 (22,04 – 45,55)	29,42 ± 6,76 (20,31 – 47,02)	0,745***
Renda Familiar			
<5 salários mínimos	10 (50%)	13 (65%)	0,337*
≥5 salários mínimos	10 (50%)	7 (35%)	
Situação Conjugal			
com companheiro	16 (80%)	17 (85%)	1.00*
sem companheiro	4 (20%)	3 (15%)	
Escolaridade			
<8anos	4 (20%)	16 (80%)	0,001*
de 8 a 12 anos	15 (75%)	3 (15%)	
>12 anos	1 (5%)	1 (5%)	

* teste Qui-quadrado ou exato de Fisher;

** teste t para amostras independentes;

*** teste Mann-Whitney.

IMC = índice de massa corporal.

Tabela 2. Comparação dos parâmetros periodontais entre o baseline (T1) e 2 meses após a terapia periodontal não-cirúrgica.

Parâmetros periodontais	Grupo PDMc		p
	T0	T1	
PS média (mm)	2,78 ± 0,60 (2,20 – 4,18)	2,04 ± 0,44 (1,57 – 3,38)	<0,0001
% de sítios com PS 4 mm	4,49 ± 4,34 (0,00 – 16,66)	2,90 ± 3,26 (0,00 – 11,66)	0,078
% de sítios com PS 5 a 6 mm	11,26 ± 8,22 (3,12 – 31,81)	3,26 ± 7,01 (0,00 – 30,95)	<0,0001
% de sítios com PS ≥ 7 mm	5,80 ± 8,76 (0,00 – 29,16)	5,29 ± 7,55 (0,00 – 26,47)	0,002
NIC médio	3,75 ± 1,17 (2,33 – 6,30)	2,97 ± 0,80 (1,95 – 4,94)	<0,0001
% de sítios com NIC 4 mm	9,26 ± 6,40 (0,00 – 25,00)	6,70 ± 3,46 (1,78 – 13,63)	0,086
% de sítios com NIC 5 a 6mm	17,09 ± 8,40 (4,16 – 31,66)	14,23 ± 11,85 (0,00 – 39,28)	0,099
% de sítios com NIC ≥ 7 mm	10,63 ± 13,03 (0,00 – 46,66)	5,29 ± 7,55 (0,00 – 26,47)	0,001
% de sítios com SS	42,62 ± 21,46 (12,50 – 84,09)	19,63 ± 15,51 (3,94 – 66,66)	<0,0001
	Grupo PDMd		
	T0	T1	
PS média (mm)	2,82 ± 0,76 (1,54 – 4,73)	2,47 ± 1,14 (1,42 – 4,90)	0,007
% de sítios com PS 4 mm	7,85 ± 7,35 (0,92 – 32,95)	2,63 ± 3,21 (0,00 – 10,27)	0,001
% de sítios com PS 5 a 6 mm	10,87 ± 8,38 (2,67 – 34,72)	2,24 ± 3,76 (0,00 – 12,90)	<0,0001
% de sítios com PS ≥ 7 mm	3,29 ± 4,94 (0,00 – 16,66)	1,62 ± 5,24 (0,00 – 23,43)	0,123
NIC médio	3,59 ± 1,20 (2,21 – 6,05)	3,04 ± 1,02 (1,95 – 5,36)	0,002
% de sítios com NIC 4 mm	10,73 ± 6,66 (0,92 – 30,20)	8,41 ± 4,73 (2,38 – 23,80)	0,251
% de sítios com NIC 5 a 6mm	17,37 ± 11,77 (4,54 – 44,11)	12,33 ± 12,40 (0,00 – 44,11)	0,002
% de sítios com NIC ≥ 7 mm	9,86 ± 10,70 (0,00 – 32,35)	5,46 ± 8,47 (0,00 – 25,00)	0,001
% de sítios com SS	50,41 ± 23,85 (15,62 – 94,44)	25,65 ± 16,02 (3,40 – 56,25)	<0,0001

* teste de Wilcoxon para comparações entre T0 e T1. PS = Profundidade de sondagem; NIC = Nível de inserção clínica; SS = Sangramento à sondagem.

Tabela 3. Caracterização dos índices glicêmicos no baseline (T0) e 2 meses após a terapia periodontal não-cirúrgica (T1).

Índices Glicêmicos	Grupo PDMc			Grupo PDMd		
	T0	T1	p*	T0	T1	p*
Glicemia em Jejum (mg/dl)	126,30 ± 26,88	125.60 ± 44,59	0,687	93,30 ± 115,08	148,79 ± 50.14	0,121
Hemoglobina Glicada (%)	6,38 ± 0,45	6,77 ± 1,27	0,150	9,59 ± 1,54	8,55 ± 1,34	0,039

*teste de Wilcoxon para comparações entre T0 e T1.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para as diferentes propostas de investigação deste estudo, em relação à expressão de hBD-1 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica e DM compensado e descompensado, bem como o efeito da terapia periodontal sobre esta expressão e sobre os índices glicêmicos, as seguintes considerações finais foram estabelecidas:

- A expressão quantitativa de hBD-1 é reduzida em indivíduos com periodontite, além de não existir diferença entre os níveis de hBD-1 entre sítios saudáveis e doentes destes indivíduos, o que pode sugerir um potencial papel protetor da hBD-1 na susceptibilidade à periodontite crônica.
- A terapia periodontal não-cirúrgica elevou a expressão quantitativa de hBD-1 em sítios saudáveis e doentes de indivíduos com periodontite crônica.
- A expressão quantitativa de hBD-1 é maior em indivíduos com periodontite e diabetes compensado, sugerindo que o controle glicêmico influencia a expressão de hBD-1.
- A terapia periodontal não-cirúrgica não eleva os níveis de hBD-1 em diabéticos descompensados. Com isso, podemos sugerir que os índices glicêmicos elevados interferem na expressão de hBD-1, o que pode contribuir para uma resposta deficiente a terapia periodontal nestes indivíduos.

- A terapia periodontal não-cirúrgica reduz os parâmetros clínicos periodontais em indivíduos com periodontite crônica e diabetes compensado e descompensado.
- A terapia periodontal não-cirúrgica reduz a hemoglobina glicada em diabéticos descompensados.

Nesse sentido, este estudo sugere um possível papel protetor da hBD-1 na susceptibilidade à periodontite crônica, além de ressaltar a importância da terapia periodontal como uma nova estratégia para auxiliar o controle glicêmico, podendo assim, contribuir para a melhora na qualidade de vida dos indivíduos diabéticos.

Finalmente, estudos futuros envolvendo populações diferentes devem ser conduzidos para aumentar a compreensão sobre a expressão de hBDs em indivíduos com periodontite e DM, bem como o efeito da terapia periodontal nesta expressão.

8 REFERÊNCIAS

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721–5732.
2. Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem* 2005;280:12087-12095.
3. American Diabetes Association (ADA). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26(Suppl.1): S5-20.
4. Amos AF, MacCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997;14:S1-5.
5. Anonymous. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-853.
6. Anonymous. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009;32(Suppl 1):S62-67.
7. Barnea M, Madar Z, Froy o. Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;367(2):452–456.

8. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. HBD-1 a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995;368:331–335.
9. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E et al. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 2001;11:6644-6653.
10. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB Jr et al. Expression of β -defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2004;33:278-285.
11. Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res* 2011;90:241-245.
12. Chapple ILC, Genco R, and on behalf of working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* 2013; 40 (Suppl. 14): S106–S112.
13. Chen L, Luo G, Xuan D, Wei B, Liu F, Li J, Zhang J. Effects of non-surgical periodontal treatment on clinical response, serum inflammatory parameters, and metabolic control in patients with type 2 diabetes: a randomized study. *J Periodontol* 2012;83,435–443.
14. Chung WO, Dale BA. Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. *Infect Immun* 2004;72:352-358.

15. Costa FO, Guimaraes AN, Cota LO, Pataro AL, Segundo TK, Cortelli SC, Costa JE. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Science* 2009;51:199–206.
16. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R *et al.* Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodont Res* 2001;36:285-294.
17. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000* 1997;14:12–32.
18. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 1997;14:29–34.
19. Demmer RT, Holtfreter B, Desvarieux M, Jacobs DRJr, Kerner W, Nauck M, Volzke H, Kocher T. The influence of type 1 and type 2 diabetes on periodontal disease progression: prospective results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Diabetes Care* 2012 35, 2036–2042.
20. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol 2000* 2003;61(1):16-53.
21. Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russel JP, Bevins CL. Transcriptional regulation of B-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 2000;68(1):113- 119.
22. Dommisch H, Açı Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:186-190.

23. Droin N, Hendra JB, Ducoroy P, Solary E. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. *J Proteomics* 2009;72:918-927.
24. Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002;2:121-124.
25. Eberhard J, Jervoe-Storm PM, Needleman I, Worthington H, Jepsen S. Full-mouth treatment concepts for chronic periodontitis: a systematic review. *J Clinical Periodontol* 2008; 35: 591-604.
26. Ebrahim MA. Expression of human beta defensins (HBDs) 1, 2 and 3 in gingival crevicular fluid of patients affected by localized aggressive periodontitis. *The Saudi Dental Journal* 2013;25:75–82.
27. Engebretson S, Kocher T. Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2013; 40 (Suppl. 14): S153–S163.
28. Engelgau MM, Thompson TJ, Herman WH, Boyle JP, Aubert RE, Kenny SJ, Badran A, Sous ES, Ali MA. Comparison of fasting and 2-hour glucose and HbA1c levels for diagnosing diabetes. Diagnostic criteria and performance revisited. *Diabetes Care* 1997;20,785–791.
29. Ertugrul AS, Dikilitas A, Sahin H, Alpaslan N, Bozoglan A, Tekin Y. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensins 1 and 3 in subjects with periodontitis and/or type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *J Periodont Res* 2012; 1-8.

30. Feng Z, Dubyak GR, Lederman MM, Weinberg A. Cutting edge: human beta defensin 3—a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol* 2006;2:782-786.
31. Froy O, Hananel A, Chapnik N, Madar Z. Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta-defensins and Toll-like receptors in diabetic rats. *Mol Immunol* 2007;44(5):796-802.
32. Garcia D, Tarima S, Okunseri C. Periodontitis and Glycemic Control in Diabetes: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* 2015; 86(4):499-506.
33. Gay IC, Tran DT, Cavender AC, Weltman R, Chang J, Luckenbach E, Tribble GD. The effect of periodontal therapy on glycemic control in a Hispanic population with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 673–680.
34. Gursoy UK, Kononen E. Understanding the roles of gingival beta-defensins. *J Oral Microbiol* 2012;4:1-10.
35. Hancock RE, Brown KL, Mookherjee N. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* 2006;4:315-322.
36. Hollox EJ, Armour JA, Barber JC. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet* 2003;73:591-600.
37. Hotamisligil, G. S. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2003;24(Suppl 4):S23– S27.
38. Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Investigation* 2002;109,1321–1326.

39. Joly S, Organ CC, Johnson GK, McGray PB Jr, Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 2005;42:1073-1084.
40. Jones JA, Miller DR, Wehler CJ, Rich SE, Krall-Kaye EA, McCoy LC, Christiansen CL, Rothendler JA, Garcia RI. Does periodontal care improve glycaemic control? The department of veterans affairs dental diabetes study *J Clin Periodontol* 2007;34, 46–52.
41. Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. *J Clin Microbiol* 2003;41:90-96.
42. Kawsar HI, Weinberg A, Hirsch SA, Venizelos A, Howell S, Jiang B et al. Overexpression of human beta-defensin-3 in oral dysplasia: potential role in macrophage trafficking. *Oral Oncol* 2009;45:696-702.
43. Kinane DF, Shiba .H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000* 2005; 39(1):91-117.
44. Kiran M, Arpak N, Unsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2005;32:266–722.
45. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New England J Med* 2002;346, 393–403.
46. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA. Defensinas as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol* 2010;5:99-113.

47. Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol* 2011;38:142–147.
48. Krisanaprakornkit, S., A. Weinberg, C. N. Perez, and B. A. Dale. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect. Immun* 1998;66:4222–4228.
49. Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, Romanos GE, Sorsa T. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol* 2008;53:175–186.
50. Laine ML, Crielaard W, Loos B. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000* 2012;58:37-68.
51. Lalla Rajesh V., D'Ambrosio Joseph A. Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *The Journal of the American Dental Association* 2001; 122;10:1425-1432
52. Lan CC, Wu CS, Huang SM, Kuo HY, Wu IH, Wen CH et al. High glucose environment inhibits p38MAPK signaling and reduces human beta-defensin 3 expressions in Keratinocytes. *Mol Med* 2011;17:771-779.
53. Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16:329-334.
54. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002;73:911-924.

55. Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2004;39:221-227.
56. Lu Q, Samaranayake LP, Darveau RP, Jin L. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. *J Periodont Res* 2005;40:474-481.
57. Maggs DG, Buchanan TA, Burant CF, Cline G, Gumbiner B, Hsueh WA, Inzucchi S, Kelley D, Nolan J, Olefsky JM, Polonsky KS, Silver D, Valiquett TR, Shulman GI. Metabolic effects of troglitazone monotherapy in type 2 diabetes mellitus. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals Internal Med* 1998;128, 176–185.
58. Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK et al. Production of β -defensin antimicrobial peptides by oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 1999;67:2740-2745.
59. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol 2000* 2003;32:59-81.
60. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289–1303.
61. McCormick TS, Weinberg A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontol 2000* 2010;54:195-206.
62. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71(11):1699-1707.

63. Morita I, Inagaki K, Nakamura F, Noguchi T, Matsubara T, Yoshii S, Nakagaki H, Mizuno K, Sheiham A. & Sabbah W. Relationship between periodontal status and levels of glycated hemoglobin. *Journal of Dental Research* 2012;91:161–166.
64. Nomura I, Goleva E, Howell MD. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 2003;171:3262–3269.
65. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999;163:6718-6724.
66. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002;347:1151-1160.
67. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* 1997;14:216–248.
68. Page RA, Malik AN. Elevated levels of beta defensin-1 mRNA in diabetic kidneys of GK rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:513–521.
69. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GCN, Cortelli SC, Cortelli JR. Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Archives of oral biology* 2012;57:1609–1614.
70. Pingel LC, Kohlgraf KG, Hansen CJ, Eastman CG, Dietrich DE, Burnell KK et al. Human beta-defensin 3 binds to hemagglutinin B (rHagB), a non-fimbrial adhesin from *Porphyromonas gingivalis*, and attenuates a pro-inflammatory cytokine

- response. *Immunol Cell Biol* 2008;86:643-649.
71. Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, Eick S, Potempa J. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral Microbiol. Immunol* 2008;23(4):328–335.
 72. Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 1998;152:1247–1258.
 73. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:45777– 45784.
 74. Sammalkorpi K. Glucose intolerance in acute infections. *J Internal Medicine* 1989;225:15–19.
 75. Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res* 2000;9:1669-1674.
 76. Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 1995;269:1645-1648.
 77. Schutte BC, McCray PB Jr. B-defensins in lung host defense. *Annu Rev Physiol* 2002;64:709-748.
 78. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden

- SH. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Annals Internal Medicine* 2004;141,421–431.
79. Seppala B, Seppala M, Ainamo J. A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1993;20,161–165.
 80. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The J Clin Investigation* 2006;116, 1793–1801.
 81. Slots J. Periodontology: past, present, perspectives. *Periodontol 2000* 2013; 62(1):7-19.
 82. Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 2010;53(1):138-153.
 83. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996;67,1085–1093.
 84. Taylor GW. Bidirectional interrelationships. between diabetes, and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* 2001;6:99-112.
 85. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis* 2008;14:191-203.
 86. Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology* 2013;40(14):113–134.
 87. Tervonen T, Knuuttila M, Pohjamo L, Nurkkala H. Immediate response to nonsurgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1991;18,65–68.

88. Tomas Ganz. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:710–720.
89. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 2002;30,182–192.
90. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodont Res* 2007;42:429-437.
91. Weinberg A, Krissanaprakornkit S, Dale BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:399-414.
92. World Health Organization (2011) Fact Sheet No. 312. Diabetes [WWW document]. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> [accessed on 21 October 2015].
93. Yale JF, Valiquett TR, Ghazzi MN, Owens-Grillo JK, Whitcomb RW, Foyt HL. The effect of a thiazolidinedione drug, troglitazone, on glycemia in patients with type 2 diabetes mellitus poorly controlled with sulfonylurea and metformin. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals Internal Med* 2001;134,737–745.
94. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999;286:525-528.
95. Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000* 2007;43(1):102-132.

96. Yun F, Firkova EI, Jun-Qi L, Xun H. Effect of non-surgical periodontal therapy on patients with type 2 diabetes mellitus. *Folia Medica* 2007;8(49):32–36.
97. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;6870:389-395.
98. Zhang J, Sun X, Xiao L, Xie C, Xuan D, Luo G. Gene polymorphisms and periodontitis. *Periodontol 2000* 2011;56:102-124.
99. Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensina hBD-1 in human secretoy glands and epithelial cells. *FEBS Letters* 1996;366:319-322.
100. Zou J, Mercier C, Koussounadis A, Secombes C. Discovery of multiple b-defensin like homologues in teleost fish. *Mol Immunol* 2007;44:638-647.

8 ANEXOS

ANEXO 01

Parecer no. (CAAE – 0529.0.203.0001-11) - Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais COEP/UFMG.

ANEXO 02

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

ANEXO 03

Ficha de seleção de pacientes

ANEXO 04

Ficha sócio-econômica

ANEXO 5

Ficha de exame clínico periodontal

ANEXO 01



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

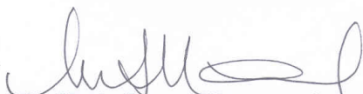
Projeto: CAAE – 0529.0.203.000-11

Interessado(a): Prof. José Eustáquio da Costa
Depto. Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 10 de janeiro de 2012, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Comparação da expressão de beta defensinas humanas no fluido gengival crevicular e no tecido gengival de pacientes saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2 com doença periodontal**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO 02

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você esta sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BETA-DEFENSINAS HUMANAS NO FLUIDO GENGIVAL CREVICULAR E NO TECIDO GENGIVAL DE PACIENTES SAUDÁVEIS E PACIENTES COM DIABETES TIPO 2 COM DOENÇA PERIODONTAL”. Essa pesquisa será realizada por mim Daniela Leal Zandim-Barcelos, pós-doutoranda em Periodontia pela UFMG, e orientada pelo professor José Eustáquio da Costa.

A doença periodontal é uma doença que acomete os dentes, gengiva e osso, gerando uma inflamação da gengiva, sangramento e perda do osso em volta dos dentes. O diabetes é uma doença sistêmica que tem sido associada ao aumento da ocorrência e gravidade da doença periodontal. Evidências indicam que há uma relação direta entre diabetes e doença periodontal. Assim, o objetivo principal desta pesquisa é verificar se os mecanismos de defesa presentes na gengiva de pacientes saudáveis são diferentes dos encontrados em pacientes com diabetes.

Para a realização desta pesquisa, precisamos da participação voluntária de indivíduos saudáveis e de indivíduos com diabetes. Três grupos serão incluídos no estudo: 1) grupo controle – pacientes saudáveis, sem doença sistêmica; 2) grupo de pacientes com diabetes controlada; 3) grupo de pacientes com diabetes não controlada. Será necessário realizar uma coleta, com a utilização de papel absorvente, do fluido presente no sulco gengival e uma coleta de um fragmento da gengiva (que chamamos de amostra). A remoção deste pequeno pedaço da gengiva só será realizada se houver indicação de cirurgia como parte do tratamento periodontal. Esta coleta não representa qualquer risco, incômodo ou prejuízo para o seu tratamento, pois faz parte do procedimento cirúrgico. Todas as informações coletadas terão finalidade exclusivamente científica e serão mantidas em sigilo. Em hipótese alguma o seu nome será divulgado. A sua participação é voluntária. Você poderá desistir de participar e cancelar o seu consentimento em qualquer momento da pesquisa. A desistência ou a não aceitação em fazer parte dessa pesquisa não irá interferir no seu tratamento na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor possíveis fatores associados à maior ocorrência e gravidade da doença periodontal em pacientes com diabetes.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG: _____, aceito participar de forma voluntária do ☐ grupo controle, ☐ grupo com diabetes controlada, ☐ grupo com diabetes não controlada (marcar um X na opção correspondente) deste estudo, e afirmo estar devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, quanto à preservação da minha imagem e quanto ao destino dos dados coletados. Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo as coletas e a utilização das amostras neste projeto de pesquisa.

Sei que posso desistir a qualquer momento sem que isso acarrete qualquer tipo de prejuízo para meu tratamento na Clínica de Periodontia da FO-UFMG. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____.

Assinatura

Pesquisadores responsáveis:

Daniela Leal Zandim-Barcelos Contato: (31) 8592-0918

José Eustáquio da Costa Contato: (31) 9981-4573

FO-UFMG Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha-Telefone: (31) 3409-2412 COEP: Comitê de Ética na Pesquisa Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II, 2º andar Telefone: (31) 3409-4592

ANEXO 03**FICHA DE SELEÇÃO DE PACIENTES****Identificação**

Nome:
Data de Nascimento
Idade
Gênero
Telefone de contato
Data do exame

Dados gerais

Doença sistêmica: () não ()sim Qual _____

Diabetes: () não ()sim

Diabetes compensado () descompensado () **HbA1c > 7% - descompensados**

Tem alguma doença que interfere no perfil imunológico () não ()sim

Necessita de profilaxia antibiótica antes do tratamento () não ()sim

Uso de antibiótico ou antiinflamatório nos últimos 3 meses: () não ()sim

Uso regular (2x ao dia) de antisseptico nos últimos 3 meses: () não ()sim

Tratamento periodontal nos últimos 6 meses: () não ()sim

Uso de PPR ou prótese total: () não ()sim

Uso de aparelho ortodôntico: () não ()sim

Fumo: ()nunca fumou () ex-fumante ()fumante

Gestantes e lactantes: () não ()sim

Dados bucais e periodontais

Tem mais de 15 dentes () não ()sim

Periodontite crônica () não ()sim

Situação Final

INCLUÍDO

EXCLUÍDO

ANEXO 04**FICHA SOCIODEMOGRÁFICA**

Nome:		
Número		
Idade	Gênero	
Renda familiar: () $\leq$ 5 salários mínimos () maior 5 salários mínimos		
Escolaridade: () < 8 anos () 8-12 anos () $\geq$ 12 anos		
Condição de vida: () com acompanhante () sem acompanhante		
Peso	Altura	IMC
Ultima visita ao dentista		
Diabetes () sim () não		
Fumo () não fuma () ex-fumante () fumante		
Hipertensão : () sim () não		
Uso de álcool: () não ou ocasionalmente () regular – 2 a 3 vezes por semana		
() intensivo – 4 a 5 vezes por semana		
() álcool dependente $\geq$ 6 vezes por semana () CAGE () AUDIT		

ANEXO 5

FICHA DE EXAME CLÍNICO PERIODONTAL

FICHA PERIODONTAL (PERIODONTOGRAMA) - MODELO FOUFGM

Nome: _____ Reg. Nº: _____
Tel: _____ Profissão: _____ Gênero: _____ Raça: _____
Data do exame: ____/____/____ Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ anos
Aluno: _____ Período: _____

[illegible]