

ALEXANDRE GODINHO PEREIRA

**NÍVEIS DE BETA-DEFENSINAS NO FLUIDO CREVICULAR
GENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA E
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2018**

Alexandre Godinho Pereira

**NÍVEIS DE BETA-DEFENSINAS NO FLUIDO CREVICULAR
GENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA E
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Otávio de Miranda Cota

Belo Horizonte
2018

Ficha Catalográfica

P436n Pereira, Alexandre Godinho.
2018 Níveis de beta-defensinas no fluido crevicular gengival
T de indivíduos com periodontite crônica e diabetes mellitus
tipo 2 / Alexandre Godinho Pereira. -- 2018.

69 f. : il.

Orientador: Luís Otávio de Miranda Cota.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Beta-defensinas. 2. Líquido do sulco gengival. 3. Periodontite crônica . 4. Diabetes mellitus tipo 2. 5. Hiperglicemia. I. Cota, Luís Otávio de Miranda. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar nesta trajetória acadêmica e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

Ao meu orientador, Luis Otávio de Miranda Cota, grande exemplo a ser seguido, por me confiar a continuação desta linha de pesquisa e também pelo direcionamento, paciência, disponibilidade e apoio que foram essenciais na superação dos inúmeros obstáculos enfrentados durante esta trajetória.

Às professoras Daniela Leal Zandim Barcelos e Lidiane Cristina Machado Costa pelo brilhante trabalho ao qual tive o privilégio de dar sequência.

À colega Kahena Rodrigues Soldati e a toda equipe do laboratório de Biologia Molecular da UNESP – Araraquara pelo auxílio na análise laboratorial.

Ao professor Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu pela colaboração imprescindível na análise estatística.

Aos professores José Eustáquio Costa e Fernando de Oliveira Costa pelo valioso apoio e aconselhamento.

Aos pacientes que se voluntariaram a participar deste estudo pela solicitude e altruísmo.

À Universidade Federal de Minas Gerais, professores, assistentes e colegas da pós-graduação.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro a este estudo.

Finalmente, minha gratidão aos meus pais, meus irmãos e a minha noiva Sabrina, por me fornecerem apoio incondicional e encorajamento ao longo dos meus anos de estudo. Essa conquista não teria sido possível sem vocês.

RESUMO

Evidências indicam um relacionamento bidirecional entre a periodontite crônica (PC) e o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Estudos recentes demonstraram que componentes da resposta imune inata, como as beta-defensinas humanas (hBD), podem apresentar-se alterados em indivíduos com DM2 ou PC. Tendo em vista que a resposta imune inata é a primeira barreira de defesa do organismo, alterações nas hBDs poderiam ser parcialmente responsáveis por um aumento na susceptibilidade dos indivíduos à PC. O presente estudo teve 2 propostas de investigação com objetivos específicos: (1) avaliar a influência da periodontite e da condição inflamatória do sítio nos níveis das hBDs-2 e -3 no fluido crevicular gengival (FCG) de indivíduos com e sem periodontite; e (2) avaliar a influência do DM2 e do controle glicêmico nos níveis das hBDs-1, -2 e -3 no FCG de indivíduos com e sem DM2. Para a proposta 1, foram selecionados indivíduos saudáveis (S) e com periodontite (P) entre os pacientes das clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Para a proposta 2 foram selecionados indivíduos com DM2 compensados (DM2c) e descompensados (DM2d) entre os usuários do sistema público de saúde da região metropolitana de Belo Horizonte, compreendendo 20 indivíduos em cada grupo. Todos os indivíduos foram submetidos a exame periodontal completo e dados médicos e sociodemográficos foram registrados. Amostras de FCG foram coletadas em sítios saudáveis (Ss) nos indivíduos sem periodontite; amostras de sítios saudáveis (Ps), com gengivite (Pg) e com periodontite (Pp) foram coletadas de indivíduos com periodontite. A quantificação das hBDs no FCG foi realizada pela técnica *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), método de sanduíche. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP UFMG (CAAE #0529.0.203.0001-11). Os níveis de hBDs foram comparados entre sítios saudáveis, sítios com gengivite e sítios com periodontite, aninhados em indivíduos com e sem periodontite, através de modelagem hierárquica linear. Os níveis de hBDs foram comparados entre indivíduos saudáveis, DM2c e DM2d por teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Dunn para comparações entre os pares. Os resultados mostraram que a periodontite foi associada a elevados níveis de hBD-2 (coeficiente 14,68; $p = 0,023$) e hBD-3 (coeficiente 1091.86, $p < 0.001$) no nível indivíduo, no entanto não houve efeito da condição do sítio sobre estes níveis. Foi ainda demonstrado que o DM2, independente do controle glicêmico, foi associado a níveis reduzidos de hBD-1 ($p < 0,001$), que o DM2 descompensado foi associado com níveis reduzidos de hBD-2 ($p < 0,01$); e que o DM2 não resulta em alteração nos valores de hBD-3. Uma maior expressão de hBD-2 e -3 no FCG de indivíduos com periodontite pode sugerir uma resposta normal do organismo perante à infecção dos tecidos gengivais ou ser considerado um fator parcialmente responsável pela resposta imunoinflamatória exacerbada comumente encontrada nestes indivíduos. O DM2 parecer afetar o padrão de expressão das hBD-1 e -2 de maneira distinta.

Palavras-chave: Beta-defensinas. Diabetes mellitus. Periodontite crônica.

ABSTRACT

Crevicular fluid levels of beta-defensins in individuals with chronic periodontitis and type 2 diabetes

Scientific evidence indicates a bidirectional relationship between chronic periodontitis and Type 2 Diabetes Mellitus (DM2). Recent studies have shown that components of the innate immune response, such as human beta-defensins (hBDs), may be altered in individuals with CP or DM2. Given that the innate immune response is the body's first defense barrier against microbial invasion, changes in hBDs could partially account for an increase in the susceptibility CP. The present study had 2 research proposals with specific objectives: (1) to evaluate the influence of periodontitis and inflammatory site condition on hBDs-2 and -3 levels in the gingival crevicular fluid (GCF) of individuals with and without periodontitis; and (2) to assess the influence of DM2 and glycemic control on the levels of hBDs-1, -2 and -3 in the GCF of individuals with and without DM2. For the proposal 1, healthy subjects (H) and subjects with periodontitis (P) were selected among the patients from the School of Dentistry of the Federal University of Minas Gerais. For the proposal 2, individuals with DM2 with good (DM2g) and poor (DM2p) glycemic control were selected among the users of the public health system of the metropolitan area of Belo Horizonte, comprising 20 individuals in each group. All subjects underwent complete periodontal examination and medical and sociodemographic data were recorded. GCF samples were collected in healthy sites (Hh) from subjects without periodontitis; samples of healthy sites (Ph), gingivitis (Pg) and periodontitis (Pp) were collected from individuals with periodontitis. Quantification of hBDs in the GCF was performed by the Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA) sandwich method. The present study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais - COEP UFMG (CAAE # 0529.0.203.0001-11). Levels of hBDs were compared among healthy sites, sites with gingivitis and sites with periodontitis, nested in individuals with and without periodontitis, through linear hierarchical modeling. Levels of hBDs were compared between healthy subjects, with DM2 with good and poor glycemic control through the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test for pair-wise comparisons. Results showed that periodontitis was associated with high levels of hBD-2 (coefficient 14.68, $p = 0.023$) and hBD-3 (coefficient 1091.86, $p < 0.001$) at the individual level. However, there was no effect of the site condition on these levels. It was also demonstrated that DM2, regardless of the glycemic control, was associated with reduced levels of hBD-1 ($p < 0.001$), that DM2p was associated with reduced levels of hBD-2 ($p < 0.01$); and that DM2 did not result in changes in hBD-3 values. Increased expression of hBD-2 and -3 in the GCF of individuals with periodontitis may suggest either a normal response of the organism to the infection of the gingival tissues or can be considered a partially responsible factor for the exacerbated immunoinflammatory response commonly found in individuals with periodontitis. DM2 appears to affect the expression pattern of hBD-1 and -2 differently.

Keywords: Beta-defensin. Chronic periodontitis. Diabetes mellitus.

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	8
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos da proposta 1	13
2.1.1 Objetivo geral	13
2.1.2 Objetivos específicos.....	13
2.2 Objetivos da proposta 2.....	13
2.2.1 Objetivo geral	13
2.2.2 Objetivos específicos.....	13
3 METODOLOGIA EXPANDIDA	14
3.1 Desenho do estudo	14
3.2 Linha de pesquisa	14
3.3 Cálculo amostral.....	14
3.4 Seleção dos participantes	14
3.5 Considerações éticas	16
3.6 Coleta dos dados médicos, odontológicos e sociodemográficos	16
3.7 Exame clínico periodontal	16
3.8 Exame radiográfico	17
3.9 Coleta de amostras de fluido crevicular gengival (FCG)	17
3.10 Quantificação das beta-defensinas humanas.....	17
3.11 Análise estatística	18
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	20
4.1 Artigo científico 1	20
4.2 Artigo científico 2.....	43
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE A — Termo de consentimento livre e esclarecido	65
APÊNDICE B — Ficha de seleção de pacientes.....	66

APÊNDICE C — Ficha socioeconômica	67
APÊNDICE D — Ficha de exame clínico periodontal.....	68
ANEXO A — Aprovação do COEP.....	69

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A Periodontite Crônica (PC) é uma doença infecciosa inflamatória resultante da interação entre o biofilme bacteriano e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro (MEYLE; CHAPPLE, 2015). Devido ao seu caráter multifatorial, a PC pode ser influenciada por doenças sistêmicas, como o Diabetes Mellitus (DM) (TAYLOR, 2001).

O DM é um grupo de doenças metabólicas crônicas complexas e, dentre suas variações, o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais comum, sendo responsável por 90% a 95% dos casos (ADA, 2018). Esta forma de diabetes é causada principalmente por resistência à insulina, que pode, ou não, estar associada com defeitos secretórios (ADA, 2018).

A condição hiperglicêmica crônica, frequentemente encontrada nos portadores de DM2, foi relacionada com o aumento da prevalência à PC (KHADER *et al.*, 2006; MEALEY; OATES; AAP, 2006), no entanto, os mecanismos envolvidos na interação entre estas duas doenças ainda não foram completamente elucidados (MEALEY; OATES; AAP, 2006).

Estudos recentes demonstraram que componentes da resposta imune inata, como as beta-defensinas, podem apresentar-se alterados tanto em indivíduos portadores de DM2 (YILMAZ *et al.*, 2015) quanto em indivíduos portadores de PC (BRANCATISANO *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2018). Tendo em vista que a resposta imune inata é a primeira barreira de defesa do organismo contra a invasão microbiana, alterações nas beta-defensinas humanas (hBDs) podem, teoricamente, ser parcialmente responsáveis por um aumento na susceptibilidade dos indivíduos à PC (DALE *et al.*, 2001; JOLY *et al.*, 2005).

As hBDs são uma classe de peptídeos antimicrobianos, componentes do sistema imune inato, que são expressos nas membranas celulares em todas as células epiteliais (DALE *et al.*, 2001; JOLY *et al.*, 2005). Nos tecidos periodontais, as hBDs -1, -2, -3 e -4 são encontradas principalmente em queratinócitos (LU *et al.*, 2005; VANKEERBERGHEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2016), sendo também secretadas na saliva e no fluido crevicular gengival (FCG) (LU *et al.*, 2005).

Diferentemente de outros tecidos epiteliais, em que as hBDs -2 e -3 são expressas somente em presença de infecção ou inflamação (O'NEIL *et al.*, 1999; LIU

et al., 1998; LEHMANN, 2002), nos tecidos gengivais clinicamente saudáveis elas são localizadas em um nível de expressão contínuo (BISSEL *et al.*, 2004; DOMMISCH *et al.*, 2005). Isto decorre, provavelmente, devido à interação constante do epitélio bucal com microrganismos comensais (KRISANAPRAKORNKIT *et al.*, 2000). Entretanto, suas localizações, bem como os seus níveis, podem ser alterados por diversas condições, tanto infecciosas como imunoinflamatórias (VANKEERBERGHEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2016).

A localização das hBDs, em saúde periodontal, é variável conforme o seu tipo. A expressão de hBD-1 e -2 concentra-se geralmente nas camadas superficiais espinhosa e granulosa do epitélio (DALE *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2004). A expressão de hBD-4 ocorre em todas as camadas (LI *et al.*, 2016). Por outro lado, a hBD-3 foi localizada principalmente na camada basal do epitélio gengival (YILMAZ *et al.*, 2015) e, além de ser encontrada em células epiteliais, ela foi detectada também em células de Langerhans e de Merkel (LU *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que nenhuma hBD foi localizada no tecido conjuntivo ou no epitélio juncional (LU *et al.*, 2004, 2005).

Em tecidos gengivais com presença de inflamação, o padrão de expressão é semelhante, exceto pelo fato de que, nestes casos, a expressão de hBD2 se estende sobre a camada basal e a de hBD-3 estende sobre as camadas superficiais (LU *et al.*, 2005; YILMAZ *et al.*, 2015). Outra variação que ocorre em presença de inflamação é a variação nas concentrações destes peptídeos, entretanto os resultados presentes na literatura são altamente divergentes (BISSEL *et al.*, 2004; BRANCATISANO *et al.*, 2011; DOMMISCH *et al.*, 2005; DUNSCHE *et al.*, 2002; HOSOKAWA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2014; MATHEWS *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2012; VARDAR-SENGUL *et al.*, 2007; YONG *et al.*, 2015; ZORINA *et al.*, 2016).

Estas variações podem estar associadas com os diversos mecanismos envolvidos na indução das hBDs. Foi demonstrado que mediadores inflamatórios apresentam a capacidade de induzir a expressão das hBDs (O'NEIL *et al.*, 1999). Outro fator indutivo demonstrado é a interação entre as hBDs e patógenos ou produtos de patógenos (KRISANAPRAKORNKIT *et al.*, 2000). Estudos em culturas de células verificaram que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (KRISANAPRAKORNKIT *et al.*, 1998; NOGUCHI *et al.*, 2003; HOSOKAWA *et al.*, 2006; TAGUCHI; IMAI, 2006; GURSOY *et al.*, 2012) foram capazes de estimular a

expressão das hBDs. Além disso, Vankeerberghen *et al.* (2005) observaram que o nível de indução se relaciona com o tipo do microrganismo e com tipo da hBD, e que esta indução é variável conforme as cepas utilizadas.

Uma vez liberadas no tecido, cada defensina exerce uma função específica e sua atuação ocorre em conjunto com uma complexa cadeia de eventos decorrentes dos processos imunoinflamatórios em resposta a infecção tecidual (MCCORMICK; WEINBERG, 2010). Estes mecanismos de atuação podem ser divididos em dois principais: atividade antimicrobiana direta e atividade imunomodulatória.

Têm-se pensado que a atividade antimicrobiana direta ocorre pela ligação à membrana bacteriana, o que gera a formação de poros e, conseqüentemente, o extravasamento do conteúdo celular. Esta ligação é auxiliada pela atração entre as hBDs, que apresentam características catiônicas (+), e as membranas celulares bacterianas, que apresentam características aniônicas (-) (YANG *et al.*, 2004).

Esta atividade é altamente variável e dependente do tipo de defensina e do espécime microbiano (OUHARA *et al.*, 2005). Foi demonstrado, em um estudo *in vitro*, que patógenos comumente associados com doenças bucais (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei*) apresentam algum grau de susceptibilidade às hBDs (OUHARA *et al.*, 2005).

Dentre as hBDs encontradas nos tecidos bucais, a hBD-3 se destaca por ser a mais potente bactericida em comparação à -1 e -2 (LEE *et al.*, 2013). Foi verificado inclusive que, em concentrações de 50 mg/mL, estes peptídeos apresentam capacidade bactericida superior à solução de 2% de clorexidina em biofilmes compostos por *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus mutans*, e *Enterococcus faecalis* (LEE *et al.*, 2013).

Ademais, foi demonstrado que as hBDs podem apresentar potencial antimicrobiano variável de acordo com sua conformação estrutural (SCHROEDER *et al.*, 2011). Em condições ideais, a expressão de hBD-1 ocorre na forma oxidada hBD-1ox, no entanto, em ambientes reduzidos ou em presença de redutases teciduais como tiorredoxina, as ligações dissulfeto presentes na estrutura destes peptídeos podem ser reduzidas alterando sua forma de hBD-1ox para hBD-1red, aumentando

significativamente a sua atividade antimicrobiana (SCHROEDER *et al.*, 2011; RASCHIG *et al.*, 2018).

Com relação à atividade imunomodulatória, esta também é altamente variável e dependente do tipo de defensina, apresentando diversas propriedades como: (1) ativação e quimiotaxia para células de defesa (hBD-1, -2, -3 e -4) (YANG *et al.*, 1999; GARCIA *et al.*, 2011; FUNDERBURG *et al.*, 2007); (2) indução a osteoclastogênese via RANKL (hBD-1) (MAKEUDOM *et al.*, 2017); (3) ativação e degranulação de mastócitos (hBD-2) (NIYONSABA *et al.*, 2001); e (4) inibição da autofagia em macrófagos (hBD-2 e -3) (WU *et al.*, 2018).

Dentre as atividades imunomodulatórias, as hBDs apresentam capacidades anti-inflamatórias, e a hBD-3 é a que mais se destaca por apresentar potentes propriedades anti-periodontite como: (1) redução de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, e MMP-9) em periodonto exposto a *P. gingivalis* (PARK *et al.*, 2017); (2) redução da diferenciação de osteoclastos e da perda óssea em modelo de periodontite induzida em ratos (CUI *et al.*, 2017); (3) promoção a adesão e proliferação de fibroblastos em superfícies radiculares com periodontite (WANG *et al.*, 2011); e (4) promoção da proliferação e migração de queratinócitos pela ativação de IL-8, IL-18 e IL-20 (WANG *et al.*, 2011).

É indiscutível que as hBDs são componentes importantes do sistema imunológico na manutenção da homeostase tecidual (MATHEWS *et al.*, 1999; DALE *et al.*, 2001; DUNSCHÉ *et al.*, 2002; BISSELL *et al.*, 2004; MCCORMICK; WEINBERG, 2010; LIU *et al.*, 2014). No entanto, a literatura atual apresenta grande divergência de resultados sobre a influência da periodontite (BISSELL *et al.*, 2004; BRANCATISANO *et al.*, 2011; DOMMISCH *et al.*, 2005; DUNSCHÉ *et al.*, 2002; HOSOKAWA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2014; MATHEWS *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2012, 2013; VARDAR-SENGUL *et al.*, 2007; YONG *et al.*, 2015), bem como de outros fatores como o diabetes mellitus (ERTUGRUL *et al.*, 2013; YILMAZ *et al.*, 2015, 2018), na expressão destes peptídeos. Portanto, maiores esclarecimentos sobre a expressão de hBDs em indivíduos com periodontite ou portadores de diabetes mellitus tornam-se necessários.

Assim, em 2012, foi iniciada uma linha de pesquisa para avaliação da expressão de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 em indivíduos com periodontite, bem como a influência do DM2, do controle glicêmico e do tratamento periodontal nesta expressão.

Um primeiro estudo avaliou os níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e doentes em indivíduos com e sem PC (COSTA *et al.*, 2018). O presente estudo é parte integrante desta linha de pesquisa e apresenta 2 propostas específicas de investigação, que serão apresentadas neste documento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos da proposta 1

2.1.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão quantitativa das hBDs-2 e -3 no FCG de indivíduos portadores de periodontite crônica e indivíduos saudáveis.

2.1.2 Objetivos específicos

Comparar a expressão quantitativa das hBDs-2 e -3 no FCG entre indivíduos com e sem periodontite crônica.

Comparar a expressão quantitativa das hBDs-2 e -3 no fluido FCG entre sítios saudáveis e doentes (gengivite ou periodontite) em indivíduos com e sem periodontite crônica.

2.2 Objetivos da proposta 2

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão quantitativa das hBDs-1, -2 e -3 no FCG de indivíduos com e sem DM2.

2.2.2 Objetivos específicos

Comparar a expressão quantitativa das hBDs-1, -2 e -3 no FCG entre indivíduos saudáveis e portadores de DM2.

Avaliar a influência do controle glicêmico nos níveis das hBDs-1, -2 e -3 entre indivíduos portadores de DM2 compensados e descompensados.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1 Desenho do estudo

Estudo Transversal Comparativo.

3.2 Linha de pesquisa

Epidemiologia e Controle das Doenças Bucais.

3.3 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi realizado por software estatístico (*GPower 3.1 Statistical Power Analysis for Windows, Düsseldorf, Germany*) considerando os valores médios das hBDs de estudos prévios (DOMMISCH *et al.*, 2005; BRANCATISANO *et al.*, 2011; ERTUGRUL *et al.*, 2013; YILMAZ *et al.*, 2018) para um tamanho de efeito de 0,30, um nível de significância de 0,05 e um poder do estudo de 0,80. O cálculo amostral *a priori* resultou em um tamanho de amostra de ~20 indivíduos por grupo.

3.4 Seleção dos participantes

Para a proposta de investigação 1, os participantes foram selecionados entre os pacientes da Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais e compreendeu 40 indivíduos (23 homens e 17 mulheres), entre 18 e 79 anos. Os indivíduos foram divididos entre 2 grupos, sendo: Grupo 1 = saudáveis (S); Grupo 2 = periodontite crônica (P).

Basicamente, durante o período de coleta de dados, de agosto de 2012 a dezembro de 2014, aproximadamente 360 indivíduos procuraram atendimento odontológico na unidade do estudo e foram considerados elegíveis e convidados a participar do estudo. De acordo com a acessibilidade e disponibilidade dos mesmos na rotina de atendimento odontológico, os indivíduos que preenchiam os critérios de inclusão foram incluídos no estudo até o tamanho amostral em cada grupo ser alcançado.

Indivíduos considerados periodontalmente saudáveis (S) deveriam apresentar ≥ 20 dentes naturais, Profundidade de Sondagem (PS) ≤ 3 mm e $< 20\%$ Sangramento à Sondagem (SS). Indivíduos com periodontite crônica (P) deveriam apresentar ≥ 15 dentes naturais e ≥ 4 dentes com ≥ 1 sítios com PS ≥ 4 mm e Nível de Inserção Clínica (NIC) ≥ 3 mm no mesmo sítio (LÓPEZ *et al.*, 2002).

Foram excluídos do estudo: gestantes, lactantes, fumantes e ex-fumantes, portadores de doenças sistêmicas, indivíduos com histórico de tratamento periodontal nos últimos 6 meses, indivíduos com uso de medicamentos que poderiam influenciar a saúde periodontal ou que tenham usado antibióticos e/ou anti-inflamatórios nos últimos 3 meses.

Para a proposta de investigação 2, os participantes foram selecionados entre os usuários do sistema público de saúde da região metropolitana do município de Belo Horizonte (Unidades de Atenção Básica - postos de saúde - e especializada – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais – FOUFMG) e compreendeu 60 indivíduos (24 homens e 36 mulheres), com faixa etária entre 18 e 79 anos. Os indivíduos foram divididos entre 3 grupos, sendo: Grupo 1 = Saudáveis (S); Grupo 2 = Diabetes Mellitus tipo 2 compensado (DM2c); e Grupo 3 = Diabetes Mellitus tipo 2 descompensado (DM2d).

Durante o período de coleta de dados, que ocorreu entre agosto de 2017 a janeiro de 2018, aproximadamente 300 indivíduos portadores de DM2 foram avaliados. Os indivíduos foram selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade até que o tamanho amostral em cada grupo fosse alcançado. Cabe ressaltar que para o grupo controle (Grupo 1) foram utilizados os dados dos indivíduos saudáveis coletados na estratégia amostral da proposta de investigação 1.

Indivíduos diabéticos foram definidos por diagnóstico médico prévio e o controle glicêmico foi avaliado pelo nível de hemoglobina glicada (HbA1c) com ponto de corte de $>7\%$ para definição de DM2 descompensado. Este ponto de corte foi baseado no último consenso da Associação Americana do Diabetes (ADA, 2018).

Foram excluídos do estudo: gestantes, lactantes, fumantes e ex-fumantes, portadores de doenças sistêmicas com exceção de DM2, indivíduos com uso de medicamentos que poderiam influenciar a saúde periodontal ou que tenham usado antibióticos e/ou anti-inflamatórios nos últimos 3 meses.

3.5 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP UFMG (CAAE – 0529.0.203.0001-11) (Anexo A).

Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo e foram incluídos após assinarem um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), concordando com a sua participação.

Todos os indivíduos com necessidade de tratamento odontológico foram encaminhados para as respectivas unidades de referência, conforme a sua origem, sendo: Centros de Especialidades Odontológicas do serviço público, para indivíduos analisados nas UBS, ou clínicas de especialidades da FOUFG, para os indivíduos analisados na FOUFG.

3.6 Coleta dos dados médicos, odontológicos e sociodemográficos

Todos os participantes foram submetidos a uma entrevista onde foram coletados dados de identificação, sociodemográficos, comportamentais e médicos que foram inseridos em prontuários individuais (Apêndices B e C).

3.7 Exame clínico periodontal

As mensurações dos parâmetros clínicos periodontais incluíram: Profundidade de Sondagem (PS), Nível de Inserção Clínica (NIC) e Sangramento à Sondagem (SS), foram realizadas por um único investigador experiente previamente treinado e foram incluídas em um formulário próprio (Apêndice D).

Para a mensuração dos parâmetros foi utilizada sonda milimetrada Carolina do Norte (*PC-PUNC 15; Hu-Friedy®, Chicago, USA*) em 4 sítios (distal, vestibular, mesial e lingual) de todos os dentes presentes, com exceção dos terceiros molares.

Para avaliação da concordância intra-examinador, os exames periodontais foram repetidos em 10 indivíduos com um intervalo de aproximadamente 1 semana. O teste de concordância intra examinador foi superior a 90% e o coeficiente de correlação intraclass superior a 89% para os parâmetros de PS e NIC.

3.8 Exame radiográfico

Radiografias periapicais e interproximais foram realizadas nos indivíduos portadores de periodontite crônica para a avaliação do nível ósseo.

3.9 Coleta de amostras de fluido crevicular gengival (FCG)

Amostras de FCG foram coletadas em todos os participantes com tiras de papel Periopaper (*PerioCol Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA*), estas foram inseridas no sulco gengival por 30 segundos e o volume total obtido foi mensurado com aparelho calibrado Periotron 6000 (*IDE Interstate, Amityville, NY, USA*).

Em cada indivíduo, sítios representativos de cada categoria foram selecionados. Nos indivíduos sem periodontite (saudáveis), amostras de sítios saudáveis foram coletadas, nos indivíduos com periodontite, amostras de sítios saudáveis, com gengivite e com periodontite foram coletadas. Cabe ressaltar que as coletas foram realizadas preferencialmente em dentes não adjacentes, um sítio representativo em cada quadrante. Nos sítios com PC, foram selecionados para coleta aqueles com a maior PS do quadrante.

Tiras de papel contaminadas com sangue foram descartadas e as amostras representativas do indivíduo foram colocadas em um tubo Eppendorf seco e congeladas a -80 °C até o dia da análise laboratorial.

3.10 Quantificação das beta-defensinas humanas

A quantificação das hBDs no FCG foi realizada pela técnica *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* (ELISA), método de sanduíche (*Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA*), de acordo com as orientações do fabricante, no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, campus Araraquara.

Para a análise, 96 poços foram revestidos com 100 µL (0,25 µg/mL) de anticorpo específico (anti-hBD 2 e anti-hBD 3) 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 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.

3.11 Análise estatística

As análises estatísticas preliminares foram realizadas com teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Análises descritivas foram realizadas para os parâmetros periodontais, dados médicos, sociodemográficos, níveis de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 no FCG.

Para a proposta de investigação 1, com o intuito de comparar os níveis de hBDs entre sítios saudáveis, com gengivite e com periodontite aninhados em indivíduos com e sem periodontite, através de modelagem multinível, foi realizada a criação de dois bancos de dados, para sítios e indivíduos, por meio do software *Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Statistics for Macintosh version 20, IBM Corp., Armonk, NY, USA)*.

Os bancos de dados foram utilizados no *Hierarchical Linear and Nonlinear Modeling (HLM 6.06 Statistical Package)* para executar as análises multiníveis. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Para cada defensina, os dados foram estruturados hierarquicamente em 2 níveis: sítios periodontais (Nível 1: sítios saudáveis, sítios com gengivite, sítios com periodontite) inseridos dentro de indivíduos (Nível 2: indivíduos com ou sem periodontite). A estrutura multinível das análises incluiu 80 valores de sítios (Nível 1) em 40 indivíduos (Nível 2). Foi utilizada a modelagem linear multinível para avaliar as diferenças nos níveis de hBD-2 e hBD-3. Durante o primeiro estágio da análise, um “modelo nulo” estimou a variabilidade dos dados entre os 2 níveis antes da inclusão de características individuais e locais serem levadas em consideração. Variáveis de nível 1 foram incorporadas ao modelo. Na sequência, variáveis de nível 2 foram

incorporadas, com o cálculo dos valores de p (Teste t de Student). Somente variáveis com $p < 0,05$ foram retidas no modelo final. O coeficiente de correlação intraclassa (ICC), ou seja, a proporção da variância total atribuída ao nível do grupo (características individuais), também foi calculado.

Para a proposta de investigação 2, com o intuito de comparar os níveis de hBDs entre indivíduos saudáveis, com DM2 compensados e DM2 descompensados, foi realizada a criação de um banco de dados para indivíduos, por meio do software *Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Statistics for Macintosh version 20, IBM Corp., Armonk, NY, USA)*, e as comparações dos níveis de hBD-1, -2 e -3 foram realizadas através do Teste de Kruskal-Wallis. Teste de Dunn *post-hoc* foi utilizado para comparações entre os pares. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados, bem como sua discussão, para cada proposta de investigação, foram apresentados em 2 artigos científicos específicos.

4.1 Artigo científico 1

Avaliação da expressão de beta-defensina 2 e 3 no fluido gengival de indivíduos com e sem periodontite crônica

Resumo

Objetivo: Beta-defensinas humanas (hBDs) parecem desempenhar um papel importante na susceptibilidade a doenças da cavidade bucal. Este estudo objetivou avaliar os níveis de hBD-2 e hBD-3 no fluido crevicular gengival (FCG) de indivíduos com e sem periodontite crônica.

Materiais e Métodos: 20 indivíduos saudáveis (S) e 20 indivíduos com periodontite crônica (P) foram recrutados. Amostras de FCG foram coletadas de sítios saudáveis (Ss) dos indivíduos periodontalmente saudáveis e de sítios saudáveis (Ps), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp) dos indivíduos com periodontite, totalizando 320 sítios. A quantificação de hBD-2 e hBD-3 (pg/mL) foi realizada por ELISA sanduíche. Comparações entre indivíduos (S e P) e sítios (Ss, Ps, Pg e Pp) foram realizadas através de modelagem hierárquica linear.

Resultados: Os níveis [média \pm d.p. (mediana)] de hBD-2 foram: Ss = 18,03 \pm 28,11 (4,80); Ps = 33,43 \pm 6,53 (33,29); Pg = 29,60 \pm 8,68 (27,56); e Pp = 35,10 \pm 20,04 (26,20); e de hBD-3 foram: Ss = 41,12 \pm 120,71 (0,00); Ps = 1121,74 \pm 565,87 (978,44); Pg = 1424,45 \pm 1309,38 (938,19); e Pp = 852,76 \pm 1121,98 (613,63). A periodontite foi associada a elevados níveis de expressão de hBD-2 ($p = 0,023$) e hBD-3 ($p < 0,001$) no nível indivíduo. Não houve efeito do nível sítio (saúde / gengivite / periodontite) sobre os níveis de hBD-2 ou hBD-3.

Conclusão: Indivíduos com periodontite apresentaram níveis creviculares mais elevados de hBD-2 e hBD-3 quando comparados a indivíduos sem periodontite. Estes

níveis parecem ser influenciados pela periodontite no nível do indivíduo, mas não no nível do sítio.

Palavras-chave: beta-defensinas, ELISA, fluido crevicular gengival, periodontite crônica.

Introdução

A periodontite crônica é uma doença infecciosa inflamatória crônica resultante da complexa interação entre o biofilme bacteriano e a resposta imunoinflamatória inata e adquirida do hospedeiro. Ela acomete os tecidos de suporte dental, levando a perda de ligamento e osso alveolar (HAJISHENGALLIS, 2014; MEYLE; CHAPPLE, 2015).

Componentes da resposta imune inata, como as beta-defensinas humanas (hBDs), podem ter um papel chave na susceptibilidade a periodontite (JOLY *et al.*, 2005). As hBDs são uma classe de peptídeos expressos nas membranas celulares de grande parte das células dos tecidos periodontais, podendo também serem encontradas na saliva e no fluido crevicular gengival (FCG) (ZHAO; WANG; LEHRER, 1996; MATHEWS *et al.*, 1999; DOMMISCH; JEPSEN, 2015). Elas possuem ação contra microrganismos patogênicos, sendo capazes de destruir bactérias gram positivas e negativas (MAISETTA *et al.*, 2005; OUHARA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2013), fungos (FENG *et al.*, 2005) e vírus (QUIÑONES-MATEU *et al.*, 2003). Em adição a sua atividade antimicrobiana direta, as hBDs demonstraram potencial imunomodulador, atuando na sinalização celular e na comunicação entre as respostas imunológicas inata e adquirida (DALE *et al.*, 2001; MCCORMICK; WEINBERG, 2010).

Estas interações são capazes de, dentre outros efeitos: (1) ocasionar a maturação e ativação de células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e monócitos (BIRAGYN *et al.*, 2002; FUNDERBURG *et al.*, 2007); (2) estimular a migração de mastócitos e atuar no recrutamento de macrófagos (SORURI *et al.*, 2007); (3) induzir a degranulação de mastócitos, a produção de prostaglandina D₂, a liberação de histamina e a mobilização intracelular de Ca⁺² (NIYONSABA *et al.*, 2001); (4) recrutar células T (YANG *et al.*, 1999); (5) inibir TNF- α e IL-6 (BIAN *et al.*,

2016; CUI *et al.*, 2017); e (6) suprimir as vias de sinalização de NF- κ B (CUI *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2017).

Na cavidade bucal, a hBD-1, hBD-2, hBD-3 e mais recentemente a hBD-4 foram encontradas em um nível de expressão basal, mesmo em tecidos clinicamente saudáveis (VANKEERBERGHEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2016). Entretanto, seus níveis podem ser alterados por diversas condições, tanto infecciosas como imunoinflamatórias (VANKEERBERGHEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2016). Estudos recentes demonstraram que, na periodontite crônica, os níveis destes peptídeos podem apresentar variações nos tecidos e no FCG (BISSELL *et al.*, 2004; BRANCATISANO *et al.*, 2011; YONG *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2018). Contudo, ainda não é claro se estes níveis estão aumentados ou diminuídos, tampouco qual a relevância do seu papel no processo saúde-doença periodontal (DOMMISCH; JEPSEN, 2015).

Em um estudo prévio (COSTA *et al.*, 2018), nosso grupo de pesquisa avaliou os níveis de hBD-1 no FCG em indivíduos com e sem periodontite, demonstrando um nível reduzido desta defensina em indivíduos com periodontite. No entanto, não houve diferença nos níveis de hBD-1 quando sítios saudáveis, com gengivite e com periodontite foram comparados nestes indivíduos. Embora alguns estudos tenham comparado a expressão de hBD-2 e -3 entre indivíduos saudáveis e com periodontite (MATHEWS *et al.*, 1999; DUNSCHE *et al.*, 2002; BISSELL *et al.*, 2004; DOMMISCH *et al.*, 2005; HOSOKAWA *et al.*, 2006; VARDAR-SENGUL *et al.*, 2007; BRANCATISANO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012, 2013; LIU *et al.*, 2014; YONG *et al.*, 2015; ZORINA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016), abordagens multiníveis considerando sítios e indivíduos são escassas na literatura (LU *et al.*, 2004).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar os níveis de hBD-2 e hBD-3 no fluido crevicular gengival de sítios saudáveis e doentes em indivíduos com e sem periodontite crônica, em uma abordagem multinível.

Materiais e métodos

Amostragem e desenho de estudo

A amostra do presente estudo transversal envolveu os participantes de um estudo prévio (COSTA *et al.*, 2018), compreendendo 40 indivíduos (23 homens e 17 mulheres), com faixa etária entre 18 e 79 anos, selecionados entre pacientes da Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. O cálculo amostral foi realizado por software estatístico (*GPower 3.1 Statistical Power Analysis for Windows, Düsseldorf, Germany*) considerando os valores médios de estudos prévios (DOMMISCH *et al.*, 2005; BRANCATISANO *et al.*, 2011; ERTUGRUL *et al.*, 2013) para um tamanho de efeito de 0,30, um nível de significância de 0,05 e um poder do estudo de 0,80. O cálculo amostral *a priori* resultou em um tamanho de amostra de ~20 indivíduos por grupo.

A estratégia amostral foi descrita previamente (COSTA *et al.*, 2018). Basicamente, durante o período de coleta de dados, de agosto de 2012 a dezembro de 2014, aproximadamente 360 indivíduos procuraram atendimento odontológico na unidade do estudo e foram considerados elegíveis e convidados a participar do estudo. De acordo com a acessibilidade e disponibilidade dos mesmos na rotina de atendimento odontológico, os indivíduos que preenchiam os critérios de inclusão foram incluídos no estudo até o tamanho amostral em cada grupo ser alcançado.

Foram excluídos do estudo: gestantes, lactantes, fumantes e ex-fumantes, portadores de doenças sistêmicas, indivíduos com histórico de tratamento periodontal nos últimos 6 meses, indivíduos com uso de medicamentos que poderiam influenciar a saúde periodontal ou que tenham usado antibióticos e/ou anti-inflamatórios nos últimos 3 meses.

Os indivíduos selecionados para o estudo foram divididos em 2 grupos (n=20): saudáveis (S) e periodontite crônica (P).

Exame clínico periodontal

Todos os indivíduos foram submetidos a exame periodontal completo de boca toda, e os parâmetros clínicos periodontais analisados incluíram: profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS), em todos os dentes presentes, com exceção dos terceiros molares, em 4 sítios (distal, vestibular, mesial e lingual). Radiografias intra-buciais foram também realizadas para detecção de perda óssea (COSTA *et al.*, 2018).

Os exames clínicos foram realizados por 1 investigador previamente treinado, utilizando sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (*PC-PUNC 15 Hu-Friedy®*, Chicago, USA). O teste de concordância intra examinador foi superior a 90% e o coeficiente de correlação intraclasse superior a 89%.

Indivíduos considerados periodontalmente saudáveis (S) deveriam apresentar ≥ 20 dentes naturais, PS ≤ 3 mm e até 20% de sítios com SS. Nestes indivíduos foram coletadas amostras apenas de sítios sem sangramento. Indivíduos com periodontite crônica (P) deveriam apresentar ≥ 15 dentes e ≥ 4 dentes com ≥ 1 sítios com PS ≥ 4 mm e NIC ≥ 3 mm no mesmo sítio (LÓPEZ *et al.*, 2002).

Coleta de amostras de fluido crevicular gengival

A coleta de FCG foi realizada em todos os participantes, em sítios saudáveis em indivíduos sem periodontite, e em sítios saudáveis e doentes (gingivite e periodontite) em indivíduos com periodontite. Para cada indivíduo, 4 sítios representativos de cada condição periodontal encontrada foram selecionados. No grupo S, amostras de 4 sítios saudáveis (Ss) foram coletadas. No grupo P, amostras de 4 sítios saudáveis (Ps), 4 com gingivite (Pg) e 4 com periodontite (Pp) foram coletadas. Sítios saudáveis elegíveis para coleta apresentaram PS e NIC ≤ 3 mm sem SS e sem perda óssea alveolar. Em indivíduos com P, sítios com gingivite mostraram PS e NIC ≤ 3 mm e SS e sítios com periodontite foram selecionados de acordo com a maior PS com SS em dentes diferentes não adjacentes. Os sítios foram selecionados de preferência um por quadrante ou, quando não fosse possível a coleta em algum quadrante, entre dentes não adjacentes (COSTA *et al.*, 2018).

Antes da coleta, todos os sítios selecionados foram isolados com rolos algodão, foi realizada remoção da placa supragengival com auxílio de gaze estéril e o dente foi levemente seco com jato de ar. Uma tira de Periopaper® (*PerioCol Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA*) foi inserida no sulco/bolsa periodontal até resistência média e deixada em posição por 30 segundos. Tiras de papel contaminadas com sangue foram descartadas (GRIFFITHS, 2003; WASSALL; PRESHAW, 2016). O volume de FCG foi medido em cada tira por um aparelho calibrado Periotron 6000 (*IDE Interstate, Amityville, NY, USA*).

As tiras de papel foram armazenadas em tubos de Eppendorf secos (4 por tubo) separadas de acordo com o indivíduo e, dentro do mesmo indivíduo, de acordo com a condição periodontal local do sítio. O método utilizado foi de amostragem em *pool* para fornecer um valor médio por categoria/indivíduo. Foram coletados FCG de um total de 320 sítios (80 no grupo de indivíduos sem periodontite e 240 no grupo de indivíduos com periodontite). As amostras foram congeladas a -80°C até a análise laboratorial.

Quantificação de hBD-2 e hBD-3

Os níveis de hBD-2 e hBD-3 no FCG foram medidos pela técnica de ELISA método sanduíche (*Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA*) de acordo com as orientações do fabricante. Durante o preparo das amostras, o fluido absorvido pelas tiras de papel foi eluído adicionando-se 600 µL (150 µL por tira) de solução salina tamponada com fosfato (PBS; 10 mmol / L, pH 7,2) para cada tubo eppendorf, o conteúdo dos tubos foi misturado por um agitador de placas ELISA por 30 minutos e, posteriormente, centrifugado a 13000 g durante 10 minutos a 4°C.

Para a análise em placa, 96 poços foram revestidos com 100 µL (0,25 mg / mL) de anticorpo anti-hBD específico por 12 horas. Após 4 lavagens com PBS com 0,05% Tween 20 (PBST), os poços foram bloqueados por 1 hora em temperatura ambiente com 300 µL de solução bloqueadora (albumina de soro bovino a 1% PBST). As placas foram lavadas e 100 µL de amostra ou solução padrão foi adicionada aos poços em duplicata; depois disso, as placas foram incubadas durante 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 esse período, as placas foram lavadas e 100 µL de estreptavidina peroxidase (1: 2000 em PBST) foi adicionado aos poços. Placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Reações colorimétricas foram produzidas com o uso de o-fenilenodiamina na presença de 0,02% de H₂O₂. Após o bloqueio da reação com H₂SO₄ (2N), a absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de ELISA. A faixa de detecção de hBD-2 foi 16 – 2000 pg/mL e de hBD-3 foi de 63 – 4000 pg/mL. Os níveis de hBD-2 e -3 em cada amostra foram determinados usando os valores de concentração de padrões incluídos no conteúdo do kit. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Considerações Éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP/UFMG (CAAE #05290.0.203.0001-11).

Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da inclusão 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. Análises descritivas foram realizadas para os parâmetros periodontais e níveis de hBD-2 e hBD-3 no FCG. As análises descritivas e bivariadas, bem como a criação de 2 bancos de dados usando os valores de hBD-2 e hBD-3 para sítios e indivíduos foram criadas por meio do software *Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Statistics for Macintosh version 20, IBM Corp., Armonk, NY, USA)*. Os bancos de dados foram utilizados no *Hierarchical Linear and Nonlinear Modeling (HLM 6.06 Statistical Package)* para executar as análises multiníveis. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Para cada defensiva, os dados foram estruturados hierarquicamente em 2 níveis: sítios periodontais (Nível 1: sítios saudáveis, sítios com gengivite, sítios com periodontite) inseridos dentro de indivíduos (Nível 2: indivíduos com ou sem periodontite). A estrutura multinível das análises incluiu 80 valores de sítios (Nível 1) e 40 valores de indivíduo (Nível 2). Foi utilizada a modelagem linear multinível para avaliar as diferenças nos níveis de hDB-2 e hBD-3. Durante o primeiro estágio da análise, um “modelo nulo” estimou a variabilidade dos dados entre os 2 níveis antes da inclusão de características individuais e locais serem levadas em consideração. Variáveis de nível 1 foram incorporadas ao modelo. Na sequência, variáveis de nível 2 foram incorporadas, com o cálculo dos valores de p (Teste t de Student). Somente variáveis com $p < 0,05$ foram retidas no modelo final. O coeficiente de correlação intraclasse (ICC), ou seja, a proporção da variância total atribuída ao nível do grupo (características individuais), também foi calculado.

Resultados

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

Parâmetros periodontais dos grupos do estudo são mostrados na Tabela 1. Indivíduos com periodontite crônica apresentaram maiores médias de PS e NIC quando comparados a indivíduos periodontalmente saudáveis.

Os níveis de hBD-2 foram [média \pm DP; mediana (Q3 – Q1)]: Ss = $18,03 \pm 28,11$ (4,80; 0,00 – 30,69); Ps = $33,43 \pm 6,53$ (33,29; 28,04 – 38,25); Pg = $29,60 \pm 8,68$ (27,56; 23,14 – 35,50); e Pp = $35,10 \pm 20,04$ (26,20; 23,20 – 42,54) (Figura 1). Os níveis de hBD-3 foram [média \pm DP; mediana (Q3 – Q1)]: Ss = $41,12 \pm 120,71$ (0,00; 0,00 – 0,00); Ps = $1121,74 \pm 565,87$ (978,44; 760,48 – 1268,12); Pg = $1424,45 \pm 1309,38$ (938,19; 806,75 – 1266,38); e Pp = $852,76 \pm 1121,98$ (613,63; 325,50 – 854,68) (Figura 2).

Na modelagem hierárquica, a análise do modelo nulo indicou variância altamente significativa nos valores de hBD-2 ($p < 0,001$) e marginalmente significativa nos valores de hBD-3 ($p = 0,096$) pelo nível individual (agrupamentos de nível 2), indicando assim necessidade de realizar as análises por HLM (Tabela 2).

Os resultados mostraram que, no nível indivíduo, a periodontite foi associada a elevados níveis de expressão de hBD-2 (coeficiente 14,68; $p = 0,023$; e hBD-3, coeficiente 1091.86, $p < 0.001$). Não houve efeito da condição do sítio sobre os níveis de hBD-2 ($p = 0.266$ para gengivite e $p = 0.625$ para periodontite) (Tabela 3) e hBD-3 ($p = 0.302$ para gengivite e $p = 0.359$ para periodontite) (Tabela 4).

Discussão

Estudos que analisaram a influência da periodontite crônica sobre os níveis das hBDs-2 e hBD-3 existem na literatura (MATHEWS *et al.*, 1999; DUNSCHE *et al.*, 2002; BISSELL *et al.*, 2004; DOMMISCH *et al.*, 2005; HOSOKAWA *et al.*, 2006; VARDAR-SENGUL *et al.*, 2007; BRANCATISANO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012, 2013; LIU *et al.*, 2014; YONG *et al.*, 2015; ZORINA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016). Porém,

até onde sabemos, este foi o primeiro estudo a analisar, através de um modelo hierárquico, os níveis destas defensinas no FCG, comparando indivíduos com e sem periodontite bem como sítios saudáveis e doentes (gengivite e periodontite) do mesmo indivíduo.

No presente estudo, considerando o nível indivíduo, as hBDs -2 e -3 foram expressas em indivíduos saudáveis, porém apresentaram níveis mais elevados na presença de periodontite. Este comportamento observado assemelhou-se aos padrões de comportamento destas hBDs em outros tecidos, onde estas são expressas principalmente em presença de infecção (LIU *et al.*, 1998; O'NEIL *et al.*, 1999; LEHMANN *et al.*, 2002). Quando os dados de hBD-2 e -3 do presente estudo são considerados em conjunto com dados de hBD-1 de um estudo prévio com a mesma amostra (COSTA *et al.*, 2018), percebe-se que os níveis de cada uma destas defensinas no FCG parecem ocorrer de maneira individual e diferente. A plausibilidade biológica destes achados pode estar relacionada com diferentes mecanismos de indução e regulação das hBDs nos diferentes tecidos (MCCORMICK; WEINBERG, 2010).

Diversos patógenos demonstraram a capacidade de induzir a expressão de hBD-2, como: *A. actinomycetemcomitans* (NOGUCHI *et al.*, 2003), *Porphyromonas gingivalis* (TAGUCHI; IMAI, 2006), *Fusobacterium nucleatum* (HOSOKAWA *et al.*, 2006), *Eikenella corrodens* (HOSOKAWA *et al.*, 2006) e *Prevotella intermedia* (HOSOKAWA *et al.*, 2006). Além disso, Gursoy *et al.* (2012) verificaram que biofilme vivo composto de *F. nucleatum* foi capaz de estimular a expressão de hBD-2 e hBD-3 em um modelo organotípico dento-epitelial. Mathews *et al.* (1999) demonstraram que estímulos com interleucina-1 β e LPS de *Escherichia coli* foram capazes de induzir a expressão de hBD-2, mas os níveis de hBD-1 permaneceram inalterados após estes estímulos. De forma semelhante, Krisanaprakornkit *et al.* (1998) verificaram que a expressão de mRNA hBD-2 foi alterada por extrato de parede celular de *F. nucleatum*, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ou PMA (um ativador de células epiteliais), mas estes estímulos não foram capazes de induzir a expressão de hBD-1.

Diferentes padrões de expressão de hBDs frente a diferentes estímulos foram também observados por Vankeerberghen *et al.* (2005) que, após estímulos com TNF- α , *E. coli* ou *F. nucleatum*, verificaram que a expressão de hBD-2 e hBD-3 elevou-se significativamente, mas a hBD-1 não foi induzida. Resultados semelhantes

ocorreram após estímulo com PMA, onde a expressão de hBD-3 aumentou em mais de 10.000 vezes, a de hBD-2 em mais de 100 vezes e de hBD-1 em mais de 10 vezes. Contudo, após estímulo com *P. gingivalis*, todas as cepas utilizadas induziram hBD-1, porém a indução foi variável em hBD-3 e nenhuma indução foi observada para hBD-2. Já após estímulos com *A. actinomycetemcomitans*, a expressão de hBD-3 ocorreu, a de hBD-2 foi variável conforme a cepa testada, e a de hBD-1 foi pequena.

Esta característica de indução diferencial poderia explicar o motivo pelo qual os níveis de hBD-2 e hBD-3 apresentaram-se aumentados em indivíduos com periodontite quando comparados a indivíduos saudáveis no presente estudo, ao contrário dos níveis de hBD-1 que se apresentaram reduzidos em nosso estudo prévio (COSTA *et al.*, 2018). Os níveis elevados poderiam ser resultantes da reação do organismo frente aos antígenos bacterianos e aos mediadores inflamatórios presentes nos tecidos, em uma tentativa de controlar a infecção periodontal, tanto pela capacidade antimicrobiana quanto pelas capacidades imunomoduladoras e anti-inflamatórias dessas hBDs.

Dentre os estudos com modelos metodológicos semelhantes, nossos resultados são condizentes com os de Yong *et al.* (2015) que encontraram níveis elevados de hBD-2 no FCG de indivíduos com gengivite e periodontite em comparação a indivíduos saudáveis. Por outro lado, são divergentes dos resultados encontrados por Brancatisano *et al.* (2011) que verificaram um padrão de expressão extremamente reduzido de hBD-3 no FCG de indivíduos com periodontite. Fatores potencialmente responsáveis pela divergência entre estes resultados são variabilidade da amostra e processo metodológico diferente, visto que o estudo de Brancatisano *et al.* (2011) não realizou análise diferencial por sítio, portanto as comparações devem ser cuidadosamente consideradas.

Nos escassos estudos longitudinais da literatura, os resultados do presente estudo são convergentes (PEREIRA *et al.*, 2012; DOMMISCH *et al.*, 2015; ZORINA *et al.*, 2016). Pereira *et al.* (2012) encontraram níveis elevados de hBD-2 na saliva de indivíduos com periodontite crônica em comparação a indivíduos saudáveis, e que estes níveis se reduziram após tratamento periodontal básico. Dommisch *et al.* (2015) verificaram uma elevação dos níveis de hBD-2 no FCG em indivíduos com gengivite experimental. Zorina *et al.* (2016) verificaram que os níveis de RNAm hBD-3 em células epiteliais gengivais apresentavam-se elevados em indivíduos com

periodontite, e que estes níveis reduziram para valores semelhantes aos dos encontrados em indivíduos saudáveis após o tratamento.

Nos estudos com modelos metodológicos distintos, diferentes resultados foram encontrados. Pereira *et al.* (2013), em análise de amostras salivares, encontraram níveis elevados de hBD-2 em indivíduos com gengivite e periodontite crônica em comparação a indivíduos saudáveis, e Mathews *et al.* (1999) encontraram maiores níveis de mRNA de hBD-2 em tecidos gengivais inflamados em comparação a tecidos sem inflamação. Dommisch *et al.* (2005) e Li *et al.* (2016) não encontraram diferenças significativas na expressão de mRNA de hBD-1, -2 e -3 em amostras de tecidos gengivais com diferentes graus de inflamação. Dunsche *et al.* (2002) e Liu *et al.* (2014) constataram que a detecção de mRNA das hBD-1, -2 e -3 em tecidos inflamados é reduzida quando comparada com tecidos sem inflamação. Diferentemente dos demais, Bissel *et al.* (2004) encontram um nível significativamente menor de mRNA hBD-3, mas não de hBD-1 ou -2, em tecidos inflamados em relação a tecidos saudáveis. Vardar-Sengul *et al.* (2007) verificaram uma expressão de mRNA de hBD-2 significativamente maior em indivíduos com periodontite agressiva, porém reduzida em indivíduos com gengivite e variável em indivíduos com periodontite crônica.

Cabe ressaltar que a comparação entre estudos com diferentes métodos de análise das hBDs deve ser realizada com cautela, visto que foi demonstrado que diferentes métodos de avaliação podem promover diferentes resultados (HOSOKAWA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2016). Hosokawa *et al.* (2006) observaram que a expressão de mRNA para hBD-2 e hBD-3 foi detectada com menor frequência em tecidos gengivais inflamados em relação a tecidos saudáveis. No entanto, as concentrações de hBD-2, quando analisadas por ELISA, foram ligeiramente maiores nestes tecidos gengivais inflamados. Assim, parece haver um mecanismo complexo e até então desconhecido no processo de expressão de hBDs no tecido gengival que faz com que a expressão do gene não seja necessariamente proporcional à concentração do peptídeo nas amostras. Li *et al.* (2016) analisaram amostras de biópsias de tecido gengival por imunohistoquímica e RT-PCR e também obtiveram resultados diferentes, sugerindo, por fim, que o fato das cadeias de mRNA em eucariotas terem um curto tempo de vida seria o provável fator responsável pela diferença de expressão das hBDs quando avaliados por estes 2 métodos distintos. Estudos futuros que comparem os níveis de

hBDs em amostras de tecidos gengivais e FCG por diferentes métodos podem ajudar a entender melhor os padrões de expressão e a correlação entre diferentes amostras.

No presente estudo, considerando o nível sítio, não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de hBDs. Estes achados sugerem que, embora a periodontite pareça exercer influência na expressão de hBD-2 e -3 no nível individual, esta influência parece não depender da condição inflamatória e infecciosa local do sítio, mas sim da condição do indivíduo como um todo, visto que mesmo em sítios clinicamente saudáveis estes níveis apresentaram-se elevados.

No único estudo que analisou a expressão de hBDs no nível sítio, Lu *et al.* (2004) verificaram que a expressão de hBD-2 em indivíduos saudáveis foi superior à expressão de hBD-2 em tecidos saudáveis ou inflamados de indivíduos com periodontite. Estes autores verificaram ainda que a expressão de hBD-2 em tecidos inflamados de indivíduos com periodontite é aumentada quando comparada a tecidos não inflamados destes mesmos indivíduos. No entanto, é importante mencionar que os indivíduos com periodontite avaliados neste estudo haviam sido submetidos previamente a terapia periodontal básica e os sítios avaliados foram os sítios que não apresentaram melhora do quadro inflamatório após esta terapia. Cabe ressaltar, contudo, que foi previamente demonstrado que o tratamento periodontal apresenta a capacidade de reduzir os níveis das hBDs no tecido gengival (ZORINA *et al.*, 2016). Portanto, os resultados do estudo de Lu *et al.* (2004) podem não refletir os níveis pré-tratamento, comprometendo assim possíveis comparações com o presente estudo.

É importante ressaltar que características diferenciais de expressão, indução, localização e degradação das hBDs, somadas a outros fatores descritos na literatura, como a alta variação das hBDs entre indivíduos de um mesmo grupo (BISSELL *et al.*, 2004; DOMMISCH *et al.*, 2005; VARDAR-SENGUL *et al.*, 2007) e sua capacidade de se acumularem no citoplasma ou núcleo celular e não serem secretadas (YILMAZ *et al.*, 2015), explicitam a enorme complexidade envolvida em seus mecanismos de atuação.

De forma geral, apesar das diferenças entre os estudos, o consenso atual é que as hBDs são componentes importantes na relação saúde-doença e na manutenção da homeostase dos tecidos periodontais (MATHEWS *et al.*, 1999; DALE *et al.*, 2001; DUNSCHÉ *et al.*, 2002; BISSELL *et al.*, 2004; VARDAR-SENGUL *et al.*, 2007; MCCORMICK; WEINBERG, 2010; BRANCATISANO *et al.*, 2011; LIU *et al.*,

2014; COSTA *et al.*, 2018). Isto é corroborado pelos achados de Ikuta *et al.* (2015) que mostraram uma associação entre polimorfismo genético de hBD-1 (genótipo -44CC do gene BD-1) com a susceptibilidade à periodontite crônica e pelos achados de Jaradat *et al.* (2013) que verificaram uma associação entre números reduzidos de cópias genômicas de hBD-2 com a gravidade da periodontite.

Algumas limitações do estudo podem ser apontadas. A validação externa dos resultados deve ser feita com cautela e estudos futuros com amostras diferentes devem ser realizados para confirmação dos resultados. Entretanto, as análises multiníveis, considerando indivíduos e sítios saudáveis e doentes, trazem informações interessantes sobre a expressão das hBD-2 e -3. Estudos que investiguem perfis microbiológicos e genéticos podem ajudar a esclarecer melhor a regulação da expressão destas defensinas nos tecidos periodontais.

Conclusão

Os níveis creviculares de hBD-2 e -3 parecem ser influenciados pela periodontite no nível do indivíduo, mas não no nível do sítio. Uma maior expressão de hBD-2 e -3 no FCG de indivíduos com periodontite pode sugerir tanto uma resposta normal do organismo perante à infecção dos tecidos gengivais ou ser considerada um fator parcialmente responsável pela resposta imunoinflamatória exacerbada comumente encontrada em indivíduos portadores de periodontite.

Referências

- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. American academy of periodontology task force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. **J Periodontol**, v. 86, n. 7, p. 835–838, jul. 2015.
- BIAN, T. et al. Human β -defensin 3 suppresses porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells and aortas of apoe-deficient mice. **Peptides**, v. 82, p. 92–100, ago. 2016.
- BIRAGYN, A. et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 1025–1029, nov. 2002.
- BISSELL, J. et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. **J Oral Pathol Med**, v. 33, n. 5, p. 278–285, mai. 2004.
- BRANCATISANO, F. L. et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. **J Dent Res**, v. 90, n. 2, p. 241–245, fev. 2011.
- COSTA, L. C. M. et al. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin 1 in individuals with and without chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, 2018. No prelo.
- CUI, D. et al. Human β -defensin 3 inhibits periodontitis development by suppressing inflammatory responses in macrophages. **Mol Immunol**, v. 91, p. 65–74, nov. 2017.
- DALE, B. A. et al. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. **J Periodontal Res**, v. 36, n. 5, p. 285–294, out. 2001.
- DOMMISCH, H. et al. Differential gene expression of human beta-defensins (hbd-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, n. 3, p. 186–190, jun. 2005.
- DOMMISCH, H.; JEPSEN, S. Diverse functions of defensins and other antimicrobial peptides in periodontal tissues. **Periodontol 2000**, v. 69, n. 1, p. 96–110, out. 2015.
- DOMMISCH, H. et al. Expression of antimicrobial peptides and interleukin-8 during early stages of inflammation: an experimental gingivitis study. **J Periodontal Res**, v. 50, n. 6, p. 836–845, mar. 2015.
- DUNSCHE, A. et al. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. **Eur J Oral Sci**, v. 110, n. 2, p. 121–124, abr. 2002.
- ERTUGRUL, A. S. et al. 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 Periodontal Res**, v. 48, n. 4, p. 475–482, ago. 2013.
- FENG, Z. et al. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by candida albicans. **J Dent Res**, v. 84, n. 5, p. 445–450, mai. 2005.

FUNDERBURG, N. et al. Human β -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via toll-like receptors 1 and 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 47, p. 18631–18635, nov. 2007.

GRIFFITHS, G. S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. **Periodontology 2000**, v. 31, n. 11, p. 32–42, jan. 2003.

GURSOY, U. K. et al. A novel organotypic dento-epithelial culture model: effect of fusobacterium nucleatum biofilm on β -defensin-2, -3, and LL-37 expression. **J Periodontol**, v. 83, n. 2, p. 242–247, fev. 2012.

HAJISHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. **Trends Immunol**, v. 35, n. 1, p. 3–11, jan. 2014.

HOSOKAWA, I. et al. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from β -defensins in inflamed gingival tissue. **Clin Exp Immunol**, v. 146, n. 2, p. 218–225, nov. 2006.

IKUTA, T. et al. gene polymorphism of β -defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in japanese. **Odontology**, v. 103, n. 1, p. 66–74, jan. 2015.

JARADAT, S. W. et al. Beta-defensin-2 genomic copy number variation and chronic periodontitis. **J Dent Res**, v. 92, n. 11, p. 1035–1040, nov. 2013.

JOLY, S. et al. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. **Mol Immunol**, v. 42, n. 9, p. 1073–1084, mai. 2005.

KRISANAPRAKORNKIT, S. et al. Expression of the peptide antibiotic human β -defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. **Infect Immun**, v. 66, n. 9, p. 4222–4228, set. 1998.

LEE, J. et al. Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. **J Endod**, v. 39, n. 12, p. 1625–1629, dez. 2013.

LEHMANN, J. et al. Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. **BMC Infect Dis**, v. 2, n. 1, p. 20, set. 2002.

LI, X. et al. The expression of human β -defensins (hbd-1, hbd-2, hbd-3, hbd-4) in gingival epithelia. **Arch Oral Biol**, v. 66, p. 15–21, jun. 2016.

LIU, J. et al. The expression of hbds in the gingival tissue and keratinocytes from healthy subjects and periodontitis patients. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 2, p. 193–198, nov. 2014.

LIU, L. et al. Structure and mapping of the human beta-defensin hbd-2 gene and its expression at sites of inflammation. **Gene**, v. 222, n. 2, p. 237–244, nov. 1998.

LÓPEZ, N. J.; SMITH, P. C.; GUTIERREZ, J. 62 **J Periodontal Res**, v. 39, n. 4, p. 221–227, ago. 2004.

LU, Q. et al. Expression of Human Beta-Defensin-3 in Gingival Epithelia. **J Periodontal Res**, v. 40, n. 6, p. 474–81, dez. 2005

LU, Q.; JIN, L.; DARVEAU, R. P.; SAMARANAYAKE, L. P. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 39, n. 4, p. 221–227, ago. 2004.

MAISETTA, G. et al. susceptibility of streptococcus mutans and actinobacillus actinomycetemcomitans to bactericidal activity of human beta-defensin 3 in biological fluids. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 3, p. 1245–1248, mar. 2005.

MATHEWS, M. et al. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. **Infect Immun**, v. 67, n. 6, p. 2740–2745, jun. 1999.

MCCORMICK, T. S.; WEINBERG, A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. **Periodontol 2000**, v. 54, n. 1, p. 195–206, out. 2010.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 69, n. 1, p. 7–17, out. 2015.

NIYONSABA, F. et al. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/2 and hBD-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 4, p. 1066–1075, abr. 2001.

NOGUCHI, T. et al. Syntheses of prostaglandin E2 and E-cadherin and gene expression of beta-defensin-2 by human gingival epithelial cells in response to Actinobacillus actinomycetemcomitans. **Inflammation**, v. 27, n. 6, p. 341–349, dez. 2003.

O'NEIL, D. A. et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hbd-1 and hbd-2 in intestinal epithelium. **J Immunol**, v. 163, p. 6718–6724, dez. 1999.

OUHARA, K. et al. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, beta-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 6, p. 888–896, 1 jun. 2005.

PARK, O. et al. A 15-amino acid c-terminal peptide of beta-defensin-3 inhibits bone resorption by inhibiting the osteoclast differentiation and disrupting podosome belt formation. **J Mol Med (Berl)**, v. 95, n. 12, p. 1315–1325, dez. 2017.

PEREIRA, A. L. et al. Influence of periodontal status and periodontopathogens on levels of oral human beta-defensin-2 in saliva. **J Periodontol**, v. 84, n. 10, p. 1445–1453, out. 2013.

PEREIRA, A. L. et al. Human beta-defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 12, p. 1609–1614, dez. 2012.

QUIÑONES-MATEU, M. E. et al. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. **AIDS**, v. 17, n. 16, p. F39-48, nov. 2003.

SORURI, A. et al. Beta-defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 9, p. 2474–2486, set. 2007.

TAGUCHI, Y.; IMAI, H. Expression of β -defensin-2 in human gingival epithelial cells in response to challenge with porphyromonas gingivalis in vitro. **J Periodontal Res**, v. 41, n. 4, p. 334–339, ago. 2006.

VANKEERBERGHEN, A. et al. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. **J Periodontol**, v. 76, n. 8, p. 1293–1303, ago. 2005.

VARDAR-SENGUL, S. et al. Human β defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. **J Periodontal Res**, v. 42, n. 5, p. 429–437, mar. 2007.

WASSALL, R. R.; PRESHAW, P. M. Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontology 2000*, v. 70, n. 1, p. 65–79, fev. 2016.

YANG, D. et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 525–528, 15, out. 1999.

YILMAZ, D. et al. Overexpressions of HBD-2, HBD-3, and HCAP18/LL-37 in gingiva of diabetics with periodontitis. **Immunobiology**, v. 220, n. 11, p. 1219–1226, nov. 2015.

YONG, X. et al. Periodontopathogens and human β -defensin-2 expression in gingival crevicular fluid from patients with periodontal disease in Guangxi, China. **J Periodontal Res**, v. 50, n. 3, p. 403–410, jul. 2015.

ZHAO, C.; WANG, I.; LEHRER, R. I. Widespread Expression of Beta-Defensin HBD-1 in Human Secretory Glands and Epithelial Cells. **FEBS letters**, v. 396, n. 2–3, p. 319–22, nov. 1996.

ZORINA, O. A. et al. The expression of TLR4 and hbd3 in epithelial cells of oral mucosa by surgical treatment of periodontitis. **Stomatologija (mosk)**, v. 95, n. 4, p. 13–15, jan. 2016.

Tabela 1. Condição periodontal da amostra.

Parâmetros clínicos periodontais	Grupos do estudo		p*
	Indivíduos saudáveis (S) (n = 20)	Indivíduos com periodontite (P) (n = 20)	
PS média (mm)	1,7 ± 0,2	4,2 ± 2,6	< 0,001
% de sítios com PS			
4 mm	NA	5,7 ± 4,6	NA
5-6 mm	NA	7,6 ± 8,1	NA
≥7 mm	NA	2,1 ± 3,4	NA
NIC médio (mm)	2,0 ± 0,5	3,1 ± 0,7	< 0,001
% de sítios com NIC			
4 mm	NA	8,2 ± 4,6	NA
5-6 mm	NA	12,4 ± 11,1	NA
≥7 mm	NA	4,4 ± 6,1	NA
% de sítios com SS	NA	30,8 ± 20,7	NA

* teste Mann-Whitney; NA = não se aplica.

Tabela 2. Estimação final dos componentes de variância na análise multinível (“modelo nulo”).

	Efeito randômico	SD	Componente de variância	df	Qui- quadrado	p	ICC^a
hBD-2	Intercepto, U0	18,837	354,832	39	207,424	< 0,001	74,9%
hBD-3	Intercepto, U0	427,408	182677,853	39	50,878	0,096	17,2%

^aICC = coeficiente de correlação intraclasse, fração da variância total devida aos indivíduos (nível 2).

Tabela 3. Modelos hierárquicos lineares para os níveis de hBD-2 no fluido crevicular gengival.

Efeitos fixos	Coefficiente	SE	T-ratio	df (aprox.)	p
Modelo nível sitio (nível 1)					
Sítios saudáveis (referência)	NA	NA	NA	NA	NA
Sítios com gengivite	-3,833	3.414	-1,123	77	0,266
Sítios com periodontite	1,675	3.414	0,491	77	0,625
Modelo nível indivíduo (nível 2)					
Periodontite	14,677	6,178	2,376	38	0,023

NA = não se aplica.

Tabela 4. Modelos hierárquicos lineares para os níveis de hBD-3 no fluido crevicular gengival.

Efeitos fixos	Coefficiente	SE	T-ratio	df (aprox.)	p
Modelo nível sitio (nível 1)					
Sítios saudáveis (referência)	NA	NA	NA	NA	NA
Sítios com gengivite	302,7132	128.051	1,039	77	0,302
Sítios com periodontite	-268,984	291.290	-0,923	77	0,359
Modelo nível indivíduo (nível 2)					
Periodontite	1091,861	242,869	4,496	38	< 0,001

NA = não se aplica.

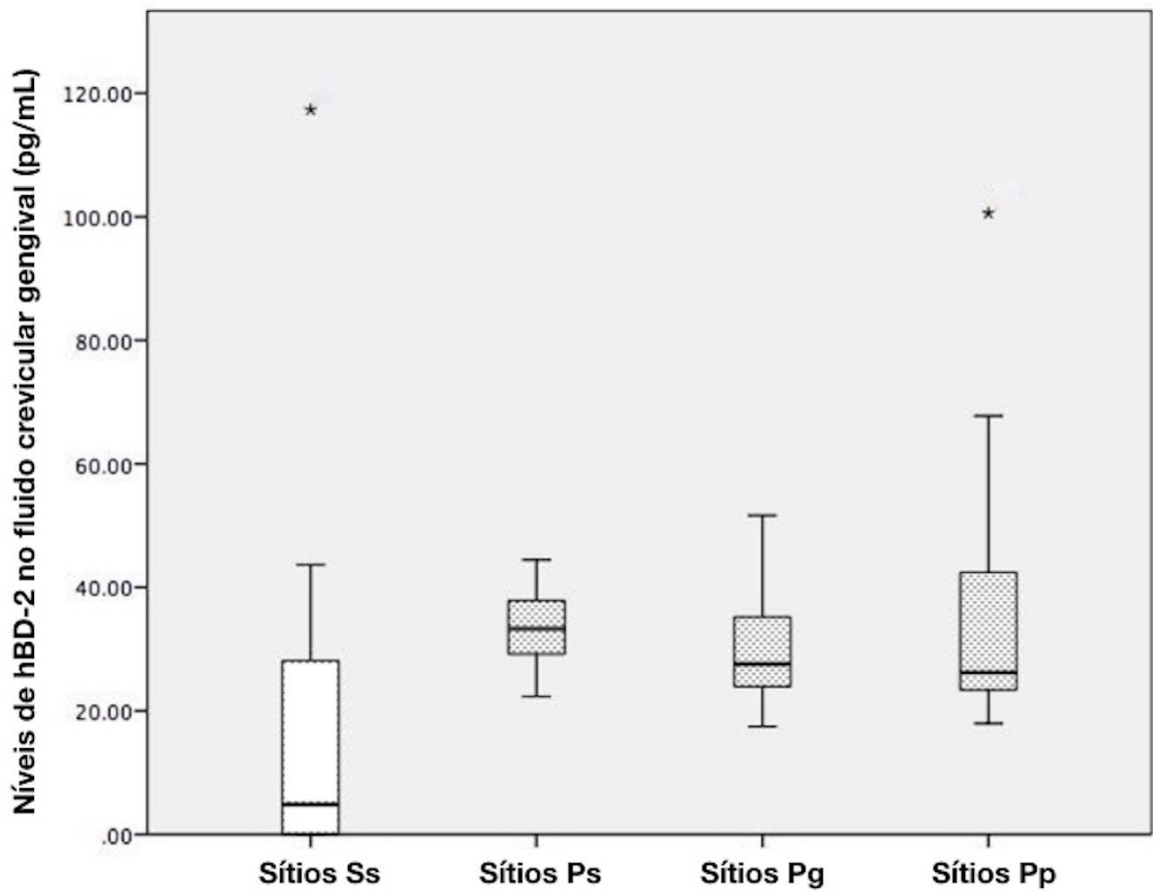


Figura 1. Níveis de hBD-2 no fluido crevicular gengival em sítios saudáveis (Ss) de indivíduos sem periodontite e sítios saudáveis (Ps), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp) de indivíduos com periodontite crônica. $Ss < Ps = Pg = Pp$ ($p = 0,023$).

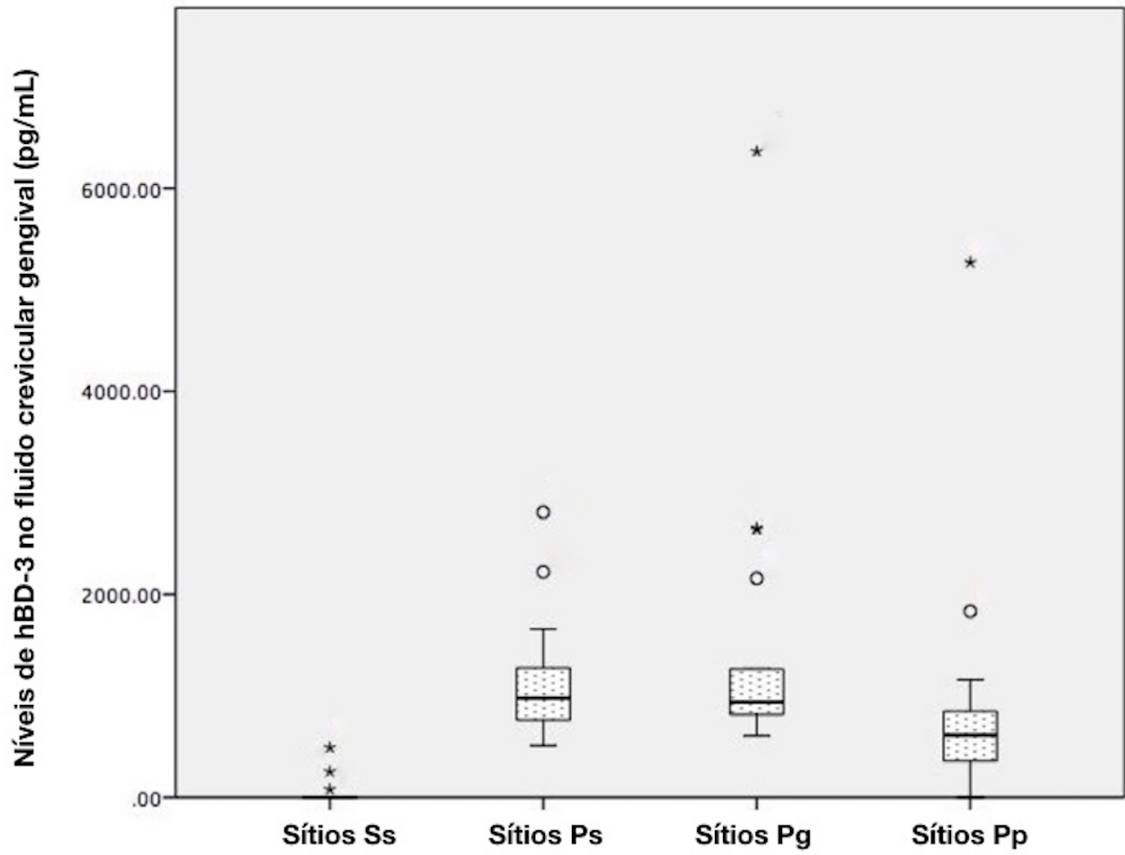


Figura 2. Níveis de hBD-3 no fluido crevicular gengival em sítios saudáveis (Ss) de indivíduos sem periodontite e sítios saudáveis (Ps), sítios com gengivite (Pg) e sítios com periodontite (Pp) de indivíduos com periodontite crônica. $Ss < Ps = Pg = Pp$ ($p < 0,001$).

4.2 Artigo científico 2

Avaliação da expressão de beta-defensinas 1, 2 e 3 no fluido gengival de indivíduos com e sem diabetes mellitus tipo 2.

Resumo

Objetivo: Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é um importante fator de risco para periodontite. Evidências sugerem uma associação entre condições de hiperglicemia e redução da expressão de beta-defensinas humanas (hBDs). Este estudo objetivou avaliar os níveis de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 no fluido crevicular gengival (FCG) de indivíduos com e sem DM2.

Materiais e Métodos: 20 indivíduos saudáveis (S), 20 com DM2 compensada (DM2c) e 20 com DM2 descompensada (DM2d) foram recrutados. Amostras de FCG foram coletadas de todos os indivíduos e a quantificação de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 (pg/mL) foi realizada por ELISA sanduíche. Comparações entre indivíduos foram realizadas através de teste Kruskal-Wallis e teste post-hoc de Dunn.

Resultados: Os níveis de hBD-1 foram (média \pm DP; mediana [Q3-Q1]): S = 229,52 \pm 138,96 (199,26; 301,40-121,12); DM2c = 9,74 \pm 11,21 (5,31; 20,40-0,00); DM2d = 4,97 \pm 15,34 (0,00; 2,80-0,00). Os níveis de hBD-2 foram (média \pm DP; mediana [Q3-Q1]): S = 18,03 \pm 28,11 (4,80; 30,69-0,00); DM2c = 7,45 \pm 14,77 (0,00; 10,04-0,00); DM2d = 4,35 \pm 12,39 (0,00; 0,00-0,00). Os níveis de hBD-3 foram (média \pm DP; mediana [Q3-Q1]): S = 41,12 \pm 120,71 (0,00; 0,00-0,00); DM2c = 12,12 \pm 33,50 (0,00; 0,00-0,00); DM2d = 8,42 \pm 32,90 (0,00; 0,00-0,00). O DM2, independente do controle glicêmico, foi associado a níveis reduzidos de hBD-1 ($p < 0,001$). O pobre controle glicêmico do DM2 foi associado a níveis reduzidos de hBD-2 ($p < 0,01$). Não houve efeito do DM2 sobre os níveis de hBD-3.

Conclusão: A expressão de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 parece ser influenciada de forma distinta pelo DM2.

Palavras-chave: beta defensinas, diabetes mellitus, ELISA, fluido crevicular gengival.

Introdução

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas crônicas que possui em comum a hiperglicemia, que é resultado da deficiência total ou parcial na secreção de insulina e/ou resistência do organismo a sua ação (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). Foi estimado, em 2014, que cerca de 422 milhões no mundo eram portadores de diabetes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016) e o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é tido como responsável por cerca de 90% a 95% dos casos (ADA, 2018).

A condição hiperglicêmica crônica, frequentemente encontrada nos portadores de DM2, foi relacionada com o aumento da prevalência da Periodontite Crônica (PC) (KHADER *et al.*, 2006; MEALEY; OATES; AAP, 2006). No entanto, os mecanismos envolvidos na interação entre as duas doenças são complexos e ainda não foram completamente elucidados (MEALEY; OATES; AAP, 2006). Dentro deste panorama, hipóteses relacionadas com alterações da resposta imunoinflamatória do hospedeiro ocasionadas pelo DM2, e que estão potencialmente envolvidas na etiopatogênese da PC, têm ganhado força (KING, 2008).

Estudos *in vitro* verificaram uma associação entre níveis elevados de glicose e produtos finais de glicosilação avançada com a redução na expressão das Beta-Defensinas humanas (hBDs) em culturas de queratinócitos (LAN *et al.*, 2011, 2012). De forma semelhante, valores reduzidos de expressão das hBDs foram associados com a presença de PC (BRANCATISANO *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2018) sugerindo que as variações dos níveis das hBDs, verificadas em indivíduos portadores de DM2, poderiam estar relacionados com a susceptibilidade aumentada à PC destes indivíduos.

As hBDs são uma classe de peptídeos antimicrobianos componentes da resposta imune inata que são expressos nas membranas celulares em todas as células epiteliais (DALE *et al.*, 2001). Nos tecidos periodontais, as hBDs 1, 2, 3 e mais recentemente a hBD-4 são encontradas em um nível de expressão basal em queratinócitos (LU *et al.*, 2005; VANKEERBERGHEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2016) e também em células de Langherans e Merkel (hBD-3) (LU *et al.*, 2005). Elas possuem ação antimicrobiana comprovada contra patógenos periodontais envolvidos na patogênese da PC (OUHARA *et al.*, 2005) e ainda demonstram potencial anti-

periodontite (CUI *et al.*, 2017) pelas atividades imunomodulatórias e anti-inflamatórias, atuando na sinalização celular e na comunicação entre as respostas imunológicas inata e adquirida (BIRAGYN *et al.*, 2002; MCCORMICK; WEINBERG, 2010; DOMMISCH; JEPSEN, 2015; CUI *et al.*, 2017).

Foram demonstradas variações na expressão das hBDs em indivíduos portadores de PC (DALE *et al.*, 2001; BISSELL *et al.*, 2004; BRANCATISANO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2018) e de DM2 com PC (ERTUGRUL *et al.*, 2013; YILMAZ *et al.*, 2015). Entretanto, existe uma escassez de estudos envolvendo a influência isolada do DM2 nos níveis das hBDs em indivíduos sem PC (YILMAZ *et al.*, 2018).

Tendo em vista que a PC é uma complicação frequente nos indivíduos com DM2, e que foi demonstrado que a PC por si só é capaz de promover variações nos níveis destes peptídeos (BISSEL *et al.*, 2004; BRANCATISANO *et al.*, 2011; DOMMISCH *et al.*, 2005; DUNSCHE *et al.*, 2002; HOSOKAWA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2014; MATHEWS *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2012; VARDAR-SENGUL *et al.*, 2007; YONG *et al.*, 2015; ZORINA *et al.*, 2016), um estudo que analisasse os níveis de expressão das hBDs no Fluido Crevicular Gengival (FCG) de indivíduos com DM2 sem PC, bem como o efeito do controle glicêmico nestes níveis, foi proposto. A compreensão da regulação destas defensinas em indivíduos portadores de diabetes mellitus pode auxiliar na compreensão dos fatores de susceptibilidade à PC presentes nestes indivíduos.

Assim, o objetivo deste estudo transversal foi avaliar os níveis de expressão das hBDs -1, -2 e -3 no FCG de indivíduos saudáveis e portadores de DM2, bem como avaliar o efeito do controle glicêmico nestes níveis.

Materiais e métodos

Amostragem e desenho de estudo

A amostra deste estudo transversal compreendeu 60 indivíduos (24 homens e 36 mulheres), com faixa etária entre 18 e 79 anos, selecionados entre usuários do sistema público de saúde da região metropolitana do município de Belo

Horizonte (Unidades de Atenção Básica - postos de saúde - e especializada – FOUFMG), entre agosto de 2017 e janeiro de 2018.

O cálculo amostral foi realizado por software estatístico (*GPower 3.1 Statistical Power Analysis for Windows, Düsseldorf, Germany*) considerando os valores médios de um estudo prévio para um efeito de 0.30, o nível de significância de 0,05 e o poder do estudo de 0.80. O cálculo amostral presumido resultou em um tamanho da amostra de 20 indivíduos por grupo.

Indivíduos portadores de DM2 foram definidos por históricos de diagnósticos prévios avaliados em prontuários médicos fornecidos pelas unidades básicas de saúde em que os indivíduos estavam cadastrados. O controle glicêmico foi avaliado pelo nível de hemoglobina glicada (HbA1c). Este nível reflete os valores médios da glicose sanguínea nos últimos 120 dias e é considerado um seguro indicador do controle do glicêmico (ADA, 2018). O ponto de corte para definição do controle glicêmico foi de >7% para indivíduos descompensados e foi baseado no último consenso da Associação Americana do Diabetes (ADA, 2018).

Foram excluídos do estudo grávidas, lactantes, fumantes e ex-fumantes, portadores de doenças sistêmicas com exceção de DM2, indivíduos com uso de medicamentos que poderiam influenciar a saúde periodontal ou que tenham usado antibióticos e/ou anti-inflamatórios nos últimos 3 meses.

Exame clínico periodontal

Parâmetros clínicos periodontais foram analisados em todos os indivíduos, incluindo: profundidade de sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS) e nível de inserção clínica (NIC), em todos os dentes presentes, com exceção dos terceiros molares, em 4 sítios (distal, vestibular, mesial e lingual).

Os exames clínicos foram realizados por 1 investigador previamente treinado, utilizando sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (*PC-PUNC 15 Hu-Friedy®*, Chicago, USA). Indivíduos elegíveis para o estudo deveriam apresentar ≥ 20 dentes naturais e condição de saúde periodontal definida por ausência de PS >3mm e % de sítios com SS <20%.

Os indivíduos selecionados foram divididos em 3 grupos (n = 20), sendo: saudáveis (S), DM2 compensados (DM2c), DM2 descompensados (DM2d).

Coleta do fluido crevicular gengival

A coleta de FCG foi realizada em todos os participantes em 4 sítios, de preferência um por quadrante e em dentes não adjacentes. Antes da coleta todos os sítios selecionados foram isolados com rolos algodão, foi realizada remoção da placa supragengival com auxílio de gaze estéril e o dente foi levemente seco com jato de ar. Uma tira de Periopaper (*PerioCol Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA*) foi inserida no sulco periodontal até resistência média e deixada em posição por 30 segundos. Tiras de papel contaminadas com sangue foram descartadas (GRIFFITHS, 2003; WASSALL; PRESHAW, 2016). O volume de FCG foi medido em cada tira por um aparelho calibrado Periotron 6000 (*IDE Interstate, Amityville, NY, USA*).

As tiras de papel foram armazenadas em tubos de Eppendorf secos (4 por tubo) separadas de acordo com o indivíduo. O método utilizado foi de amostragem em *pool* para fornecer um valor médio por categoria/indivíduo. As amostras foram congeladas a -80°C até a data da análise laboratorial.

Quantificação das hBDs -1, -2 e -3

Os níveis de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 no FCG foram medidos pela técnica de ELISA sanduíche (*Peptotech, Rocky Hill, NJ, EUA*) de acordo com as orientações do fabricante. Durante o preparo das amostras, o fluido absorvido pelas tiras de papel foi eluído adicionando-se 600 µL (150 µL por tira) de solução salina tamponada com fosfato (PBS; 10 mmol / L, pH 7,2) para cada tubo Eppendorf, o conteúdo dos tubos foi misturado por um agitador de placas ELISA por 30 minutos e, posteriormente, centrifugado a 13000 g durante 10 minutos a 4°C.

Para a análise em placa, 96 poços foram revestidos com 100 µL (0,25 mg / mL) de anticorpo anti-hBD específico por 12 horas. Após 4 lavagens com PBS com 0,05% Tween 20 (PBST), os poços foram bloqueados por 1 hora em temperatura ambiente com 300 µL de solução bloqueadora (albumina de soro bovino a 1% PBST). As placas foram lavadas e 100 µL de amostra ou solução padrão foi adicionada aos poços em duplicata; depois disso, as placas foram incubadas durante 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 esse período, as placas foram

lavadas e 100 µL de estreptavidina peroxidase (1: 2000 em PBST) foi adicionado aos poços. Placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Reações colorimétricas foram produzidas com o uso de o-fenilenodiamina na presença de 0,02% de H₂O₂. Após o bloqueio da reação com H₂SO₄ (2N), a absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de ELISA. A faixa de detecção de hBD-1 foi de 4-1000 pg/mL, a hBD-2 foi 16 – 2000 pg/mL e de hBD-3 foi de 63 – 4000 pg/mL. Os níveis de hBD-1, -2 e -3 em cada amostra foram determinados usando os valores de concentração de padrões incluídos no conteúdo do kit. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Considerações Éticas

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP/UFMG (CAAE no. 05290.0.203.0001-11).

Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da inclusão no estudo. Todos os direitos dos participantes foram preservados em todos os momentos.

Análise Estatística

Os pressupostos de normalidade da distribuição da amostra foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Análises descritivas foram realizadas para os níveis de hBD-1, hBD-2 e hBD-3.

Os níveis de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 foram comparados entre os grupos através do Teste de Kruskal-Wallis. O teste *post-hoc* de Dunn foi utilizado para as comparações dos pares. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Statistics for Macintosh version 20, IBM Corp., Armonk, NY, USA)*.

Resultados

O grupo de indivíduos saudáveis (S) foi composto de 7 mulheres e 13 homens, com idade média de 39.6 ± 16.7 anos (18 – 79). O grupo de indivíduos

portadores de DM2 compensados (DM2c) foi composto por 13 mulheres e 7 homens, com idade média de 57.8 ± 13.6 anos (38 – 79). O grupo de indivíduos portadores de DM2 descompensados (DM2d) foi composto por 16 mulheres e 4 homens, com idade média de 59.7 ± 10.3 anos (42 – 79).

Os níveis de hBD-1 foram (média \pm DP; mediana [Q3-Q1]): S = $229,52 \pm 138,96$ (199,26; 301,40-121,12); DM2c = $9,74 \pm 11,21$ (5,31; 20,40-0,00); DM2d = $4,97 \pm 15,34$ (0,00; 2,80-0,00). Os níveis de hBD-2 foram (média \pm DP; mediana [Q3-Q1]): S = $18,03 \pm 28,11$ (4,80; 30,69-0,00); DM2c = $7,45 \pm 14,77$ (0,00; 10,04-0,00); DM2d = $4,35 \pm 12,39$ (0,00; 0,00-0,00). Os níveis de hBD-3 foram (média \pm DP; mediana [Q3-Q1]): S = $41,12 \pm 120,71$ (0,00; 0,00-0,00); DM2c = $12,12 \pm 33,50$ (0,00; 0,00-0,00); DM2d = $8,42 \pm 32,90$ (0,00; 0,00-0,00).

Os resultados mostraram que todos os indivíduos com DM2, compensados ou descompensados, apresentaram menores níveis de hBD-1 no FCG ($p < 0.001$) em relação a saudáveis. Com relação à hBD-2, indivíduos com DM2 descompensados (DMd) apresentaram menores níveis de hBD-2 no FCG ($p < 0.01$) em relação a indivíduos saudáveis, mas não em relação a indivíduos DM2 compensados ($p > 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos níveis de hBD-2 entre indivíduos compensados e saudáveis. Quanto aos níveis de hBD-3, os resultados mostraram que a DM2 não resulta em alteração destes. Contudo, é importante ressaltar a baixa expressão desta defensina no FCG, visto que amostras com valores abaixo da faixa de detecção de hBD-3 ocorreram em todos os grupos, sendo: 85% em indivíduos saudáveis, 85% em DM2 compensados e 90% em DM2 descompensados.

Discussão

Estudos que analisaram a influência do DM2 na expressão das hBDs na cavidade bucal existem na literatura, no entanto são extremamente escassos (ERTUGRUL *et al.*, 2013; YILMAZ *et al.*, 2015, 2018). Até onde sabemos este é o primeiro estudo a avaliar a influência do DM2 e do controle glicêmico nos níveis das hBDs -1, -2 e -3 no FCG em indivíduos periodontalmente saudáveis.

Os resultados demonstraram uma associação entre o DM2 e níveis reduzidos de hBD-1 no FCG. Porém, nenhuma diferença significativa foi observada quanto ao efeito do controle glicêmico nestes níveis. Estes achados sugerem que o

DM2 exerce influência na expressão da hBD-1. No entanto, o processo pelo qual esta influência ocorre parece não estar relacionado exclusivamente com variações no controle glicêmico individual, mas possivelmente com outras alterações genéticas, imunológicas e/ou metabólicas presentes nos indivíduos portadores de DM2.

Németh *et al.* (2014) verificaram que a distribuição de polimorfismos genéticos entre indivíduos com diabetes mellitus (tipo 1 e 2) e saudáveis ocorre de forma diferente. Nos indivíduos diabéticos analisados no estudo em questão, a frequência do genótipo C-44G (DEFB1 rs1800972) foi maior, sendo este genótipo associado a uma expressão reduzida de hBD-1 no FCG (NÉMETH *et al.*, 2014) e à susceptibilidade aumentada de PC (IKUTA *et al.*, 2015).

Fatores relacionados com a redução de hBD-1 também foram demonstrados em estudos *in vivo* e *in vitro*. Froy *et al.* (2007), em estudo em modelo animal, verificaram que níveis elevados de glicose ou reduzidos de insulina podem influenciar a expressão de hBD-1 e de receptores Toll-like. Estes receptores atuam no reconhecimento de antígenos e sua sinalização está associada à expressão das hBDs (FROY *et al.*, 2007). Barnea, Madar e Froy (2008) verificaram que a sinalização por insulina é um fator importante na expressão ideal deste peptídeo por promover a elevação dos níveis de glicose intracelular e também mediar a expressão gênica.

Quando comparado com o único estudo que analisou os níveis de hBD-1 no FCG de indivíduos diabéticos sem PC, o presente estudo apresenta resultados semelhantes. Yilmaz *et al.* (2018) encontraram níveis reduzidos desta defensina em indivíduos com DM2 quando comparados a indivíduos saudáveis, ressaltando ainda que esta redução parece estar parcialmente relacionada a deficiências da resposta imune nesses indivíduos. Em estudo onde a expressão de hBD-1 foi analisada em indivíduos portadores de DM2 com PC, os resultados do presente estudo apresentam divergências. Ertugrul *et al.* (2013) encontraram níveis elevados desta defensina no FCG de indivíduos com DM2 e PC em relação a indivíduos com PC somente. Contudo, deve-se levar em consideração que todos os indivíduos estudados eram portadores de PC e, como a PC foi associada a variações nos níveis desta defensina (COSTA *et al.*, 2018), possíveis comparações entre os estudos devem ser realizadas com cautela.

Quanto aos níveis de hBD-2, estes apresentaram variação somente nos indivíduos com DM2 descompensado, onde apresentaram-se reduzidos em

comparação aos indivíduos saudáveis. Estes achados indicam que a condição hiperglicêmica pode ser capaz de influenciar a expressão da hBD-2. Esta hipótese é suportada por estudos *in vitro* que analisaram a influência de condições análogas as condições de hiperglicemia encontradas nos indivíduos com DM2. Lan *et al.* (2012) demonstraram que produtos finais da glicosilação avançada e glicose elevada foram capazes de causar redução dos níveis do Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 fosforilado (P-STAT1). A sinalização por P-STAT1 está criticamente relacionada com a expressão tecidual de hBD-2, e sua redução resultou na diminuição da expressão de hBD2 em cultura de queratinócitos humanos (LAN *et al.*, 2012).

Ademais, Kiselar *et al.* (2015) verificaram que níveis elevados de glicose e determinadas alterações metabólicas relacionadas à hiperglicemia crônica, como o aumento da concentração de espécies moleculares de dicarbonila altamente reativos, foram capazes de resultar na redução da expressão e da quimiotaxia de hBD-2 *in vitro*.

Em estudos onde a relação entre o DM2 e a hBD-2 foi avaliada, nossos resultados são compatíveis com os de Gonzalez-Curiel *et al.* (2011) que encontraram níveis reduzidos de expressão gênica de mRNA de hBD-2 em amostras de sangue venoso periférico de indivíduos com DM2 (HbA1c $\geq 7\%$) em comparação a saudáveis (GONZALEZ-CURIEL *et al.*, 2011). Por outro lado, são divergentes dos de Yilmaz *et al.* (2015), que encontraram níveis aumentados desta defensina, em análise imunohistoquímica auxiliada por software de análise de imagens, em tecidos gengivais de indivíduos com DM2 e PC em relação a indivíduos com PC somente ou a saudáveis. Cabe ressaltar que Yilmaz *et al.* (2015) analisaram somente indivíduos portadores de DM2 e PC e incluíram fumantes na amostra, de forma que os resultados deste estudo podem apresentar-se alterados tanto pela forma como a PC quanto o tabaco influenciam nos níveis desta defensina (ERTUGRUL *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015).

Em relação aos resultados da hBD-3, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada. No entanto, no presente estudo, amostras com valores abaixo da faixa de detecção de hBD-3 ocorreram em grande percentual em todos os grupos, podendo ter comprometido os resultados. Uma possível explicação para essa baixa detecção pode ser baseada na localização diferencial das hBDs conforme seu tipo. Em condição de saúde periodontal, as hBDs-1 e -2 são expressas principalmente nas camadas mais superficiais do epitélio (DALE *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2004),

enquanto a expressão de hBD-3 localiza-se na camada basal (LU *et al.*, 2005). Este padrão diferencial de expressão na camada mais profunda do epitélio poderia ser parcialmente responsável pela baixa frequência encontrada neste estudo.

Gonzalez-Curiel *et al.* (2011) encontraram níveis reduzidos de expressão gênica de mRNA de hBD-3 em amostras de sangue periférico de indivíduos com DM2 (HbA1c $\geq 7\%$) em comparação a saudáveis. Por outro lado, Ertugrul *et al.* (2013) e Yilmaz *et al.* (2015) encontraram valores elevados de hBD-3 em amostras de FCG e de tecido gengival, respectivamente, em indivíduos com DM2 e PC em relação a indivíduos com PC somente ou a saudáveis (ERTUGRUL *et al.*, 2013; YILMAZ *et al.*, 2015). Contudo, nestes dois últimos estudos citados nenhum indivíduo periodontalmente saudável e com DM2 foi avaliado e, como foi descrito anteriormente, a PC pode ter atuado como um fator de confusão na relação entre a hBD-3 e o DM2 (BISSELL *et al.*, 2004).

Estudos direcionados para a avaliação da influência isolada da PC e da DM2, bem como de suas possíveis interações, na expressão de tipos específicos de hBDs, são importantes para um maior entendimento do complexo mecanismo envolvido na expressão destes peptídeos. Além disso, estudos adicionais com amostras maiores, com análises de perfis genéticos, imunológicos e microbiológicos são necessários.

Conclusão

Os resultados do presente estudo sugerem que a expressão de hBDs é influenciada de forma distinta pelo DM2. A hBD-1 foi influenciada negativamente pela DM2, e esta redução parece ser independente do controle glicêmico. A hBD-2 foi influenciada negativamente por condições relacionadas a hiperglicemia crônica presente em indivíduos portadores de DM2 descompensada. Embora nenhuma influência do DM2 tenha sido observada em relação a hBD-3, a baixa frequência detectada no FCG pode ter influenciado estes resultados.

Referências

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 6. Glycemic targets: standards of medical care in diabetes-2018. **Diabetes care**, v. 41, n. 1, p. S55–S64, jan. 2018.
- BARNEA, M.; MADAR, Z.; FROY, O. Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 367, n. 2, p. 452–456, mar. 2008.
- BIRAGYN, A. et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 1025–1029, nov. 2002.
- BISSELL, J. et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. **J Oral Pathol Med**, v. 33, n. 5, p. 278–285, mai. 2004.
- BRANCATISANO, F. L. et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. **J Dent Res**, v. 90, n. 2, p. 241–245, fev. 2011.
- COSTA, L. C. M. et al. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin 1 in individuals with and without chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, 2018. No prelo.
- CUI, D. et al. Human β -defensin 3 inhibits periodontitis development by suppressing inflammatory responses in macrophages. **Mol Immunol**, v. 91, p. 65–74, nov. 2017.
- DALE, B. A. et al. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. **J Periodontal Res**, v. 36, n. 5, p. 285–294, out. 2001.
- DOMMISCH, H. et al. Differential gene expression of human beta-defensins (hbd-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, n. 3, p. 186–190, jun. 2005.
- DOMMISCH, H.; JEPSEN, S. Diverse functions of defensins and other antimicrobial peptides in periodontal tissues. **Periodontol 2000**, v. 69, n. 1, p. 96–110, out. 2015.
- DUNSCHE, A. et al. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. **Eur J Oral Sci**, v. 110, n. 2, p. 121–124, abr. 2002.
- ERTUGRUL, A. S. et al. 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 Periodontal Res**, v. 48, n. 4, p. 475–482, ago. 2013.
- FROY, O. et al. Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta-defensins and toll-like receptors in diabetic rats. **Mol Immunol**, v. 44, n. 5, p. 796–802, fev. 2007.
- GONZALEZ-CURIEL, I. et al. Differential expression of antimicrobial peptides in active and latent tuberculosis and its relationship with diabetes mellitus. **Hum Immunol**, v. 72, n. 8, p. 656–662, ago. 2011.

GRIFFITHS, G. S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. **Periodontol** **2000**, v. 31, n. 11, p. 32–42, jan. 2003.

HOSOKAWA, I. et al. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. **Clin Exp Immunol**, v. 146, n. 2, p. 218–225, nov. 2006.

IKUTA, T. et al. gene polymorphism of β -defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in japanese. **Odontology**, v. 103, n. 1, p. 66–74, jan. 2015.

JARADAT, S. W. et al. Beta-defensin-2 genomic copy number variation and chronic periodontitis. **J Dent Res**, v. 92, n. 11, p. 1035–1040, nov. 2013.

KHADER, Y. S. et al. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. **J Diabetes Complications**, v. 20, n. 1, p. 59–68, jan. 2006.

KING, G. L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. **J Periodontol**, v. 79, n. 8, p. 1527–1534, ago. 2008.

KISELAR, J. G. et al. Modification of β -defensin-2 by dicarbonyls methylglyoxal and glyoxal inhibits antibacterial and chemotactic function in vitro. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0130533, ago. 2015. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/26244639/>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

LAN, C. E. et al. High-glucose environment reduces human β -defensin-2 expression in human keratinocytes: implications for poor diabetic wound healing. **Br J Dermatol**, v. 166, n. 6, p. 1221–1229, jun. 2012.

LAN, C. E. et al. High-glucose environment inhibits p38mapk signaling and reduces human β -defensin-3 expression [Corrected] in keratinocytes. **Mol Med**, v. 17, n. 7–8, p. 771–779, mar. 2011.

LI, X. et al. The expression of human β -defensins (hbd-1, hbd-2, hbd-3, hbd-4) in gingival epithelia. **Arch Oral Biol**, v. 66, p. 15–21, jun. 2016.

LIU, J. et al. The expression of hbds in the gingival tissue and keratinocytes from healthy subjects and periodontitis patients. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 2, p. 193–198, nov. 2014.

LU, Q. et al. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 39, n. 4, p. 221–227, ago. 2004.

LU, Q. et al. Expression of Human Beta-Defensin-3 in Gingival Epithelia. **J Periodontal Res**, v. 40, n. 6, p. 474–481, dez. 2005.

MATHEWS, M. et al. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. **Infect Immun**, v. 67, n. 6, p. 2740–2745, jun. 1999.

MCCORMICK, T. S.; WEINBERG, A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides

are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity.

Periodontol 2000, v. 54, n. 1, p. 195–206, out. 2010.

MEALEY, B. L.; OATES, T. W.; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Diabetes mellitus and periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 77, n. 8, p. 1289–1303, ago. 2006.

MEHLOTRA, R. K. et al. Associations of toll-like receptor and β -defensin polymorphisms with measures of periodontal disease (pd) in HIV+ north american adults: an exploratory study. **PloS one**, v. 11, n. 10, 2016. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27727278>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

NÉMETH, B. C. et al. Relevance of α -defensins (hnp1-3) and defensin β -1 in diabetes. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 27, p. 9128–9137, jul. 2014.

OUHARA, K. et al. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β -defensins and LL37, produced by human epithelial cells. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 6, p. 888–896, 1 jun. 2005.

PEREIRA, A. L. et al. Influence of periodontal status and periodontopathogens on levels of oral human β -defensin-2 in saliva. **J Periodontol**, v. 84, n. 10, p. 1445–1453, out. 2013.

PEREIRA, A. L. et al. Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 12, p. 1609–1614, dez. 2012.

VANKEERBERGHEN, A. et al. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. **J Periodontol**, v. 76, n. 8, p. 1293–1303, ago. 2005.

VARDAR-SENGUL, S. et al. Human β defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. **J Periodontal Res**, v. 42, n. 5, p. 429–437, mar. 2007.

WANG, H. et al. Effect of human beta-defensin-3 on the proliferation of fibroblasts on periodontally involved root surfaces. **Peptides**, v. 32, n. 5, p. 888–894, mai. 2011.

WANG, W. et al. Effects of whole cigarette smoke on human beta defensins expression and secretion by oral mucosal epithelial cells. **Tob Induc Dis**, v. 13, n. 1, Jan. 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12971-015-0029-8>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

WASSALL, R. R.; PRESHAW, P. M. Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. **Periodontol** 2000, v. 70, n. 1, p. 65–79, fev. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes 2016. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**. [s.l.: s.n.].

YILMAZ, D. et al. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin-1 in type 2 diabetes mellitus and periodontitis. **Clin Oral Investig**, v. 22, n. 5, p. 2135–2140, fun. 2018.

YILMAZ, D. et al. Overexpressions of HBD-2, HBD-3, and HCAP18/LL-37 in gingiva of diabetics with periodontitis. **Immunobiology**, v. 220, n. 11, p. 1219–1226, nov. 2015.

YONG, X.; CHEN, Y.; TAO, R.; ZENG, Q.; LIU, Z.; JIANG, L.; YE, L.; LIN, X. Periodontopathogens and human β -defensin-2 expression in gingival crevicular fluid from patients with periodontal disease in Guangxi, China. **J Periodontal Res**, v. 50, n. 3, p. 403–410, jul. 2015.

ZORINA, O. A. et al. The expression of TLR4 and hbd3 in epithelial cells of oral mucosa by surgical treatment of periodontitis. **Stomatologija (mosk)**, v. 95, n. 4, p. 13–15, jan. 2016.

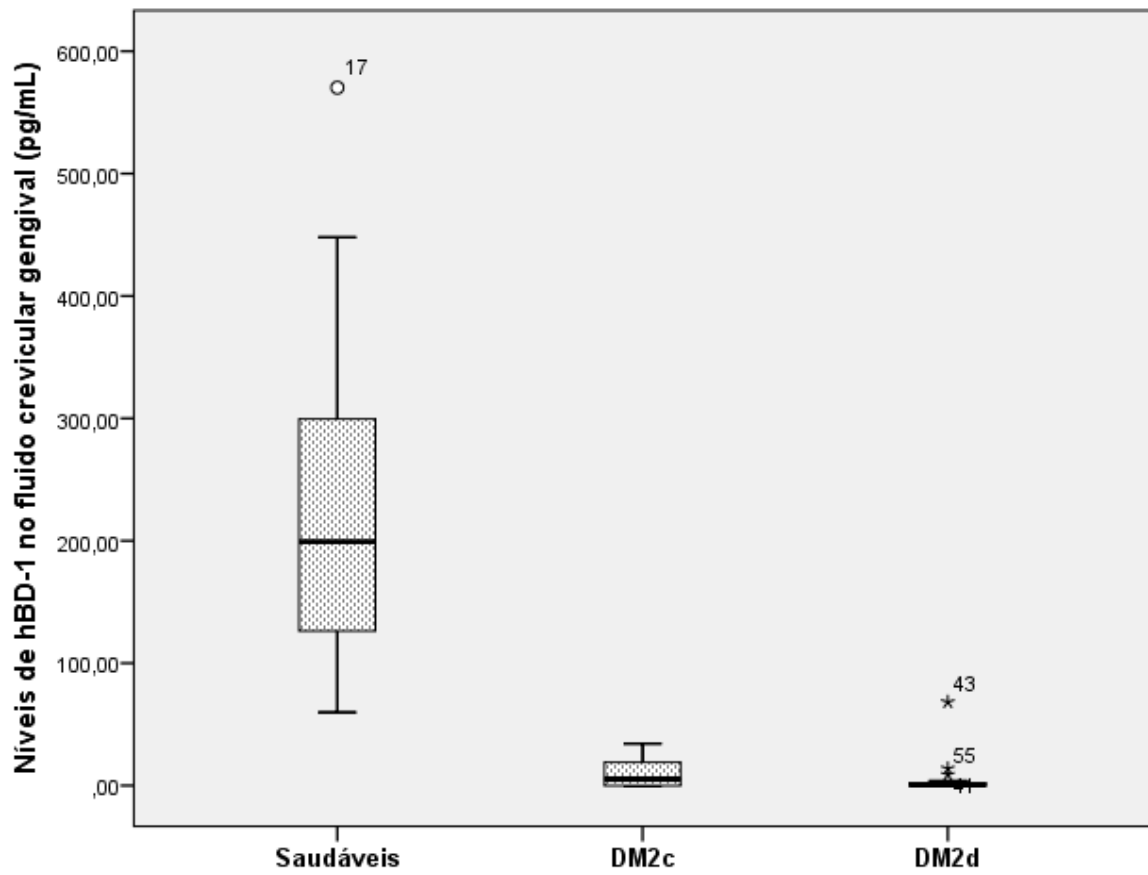


Figura 1. Níveis de hBD-1 no fluido crevicular gengival em indivíduos saudáveis (S), com DM2 compensado (DM2c) e DM2 descompensada (DM2d). S > DM2c ($p < 0,001$); S > DM2d ($p < 0,001$); DM2c = DM2d ($p > 0,05$).

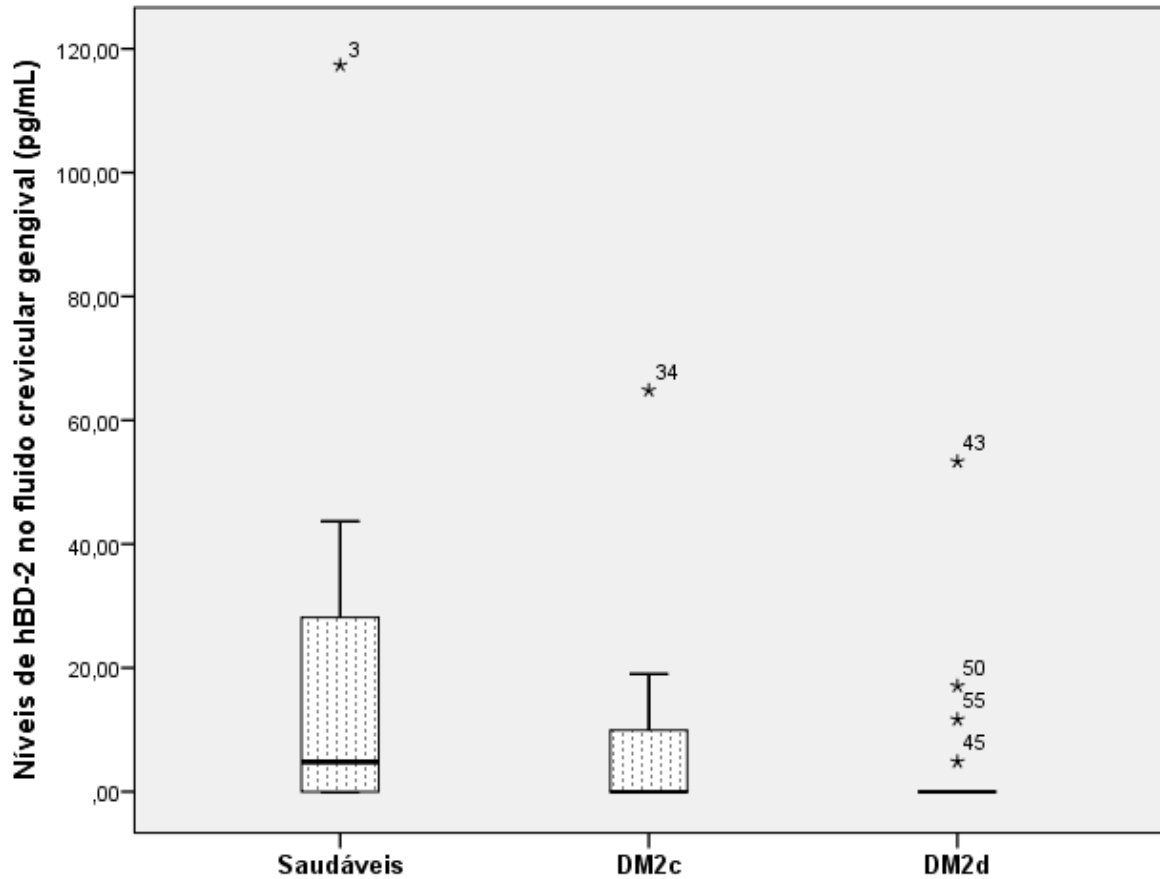


Figura 2. Níveis de hBD-2 no fluido crevicular gengival em indivíduos saudáveis (S), com DM2 compensado (DM2c) e DM2 descompensado (DM2d). S = DM2c ($p > 0,05$); S > DM2d ($p < 0,01$); DM2c = DM2d ($p > 0,05$).

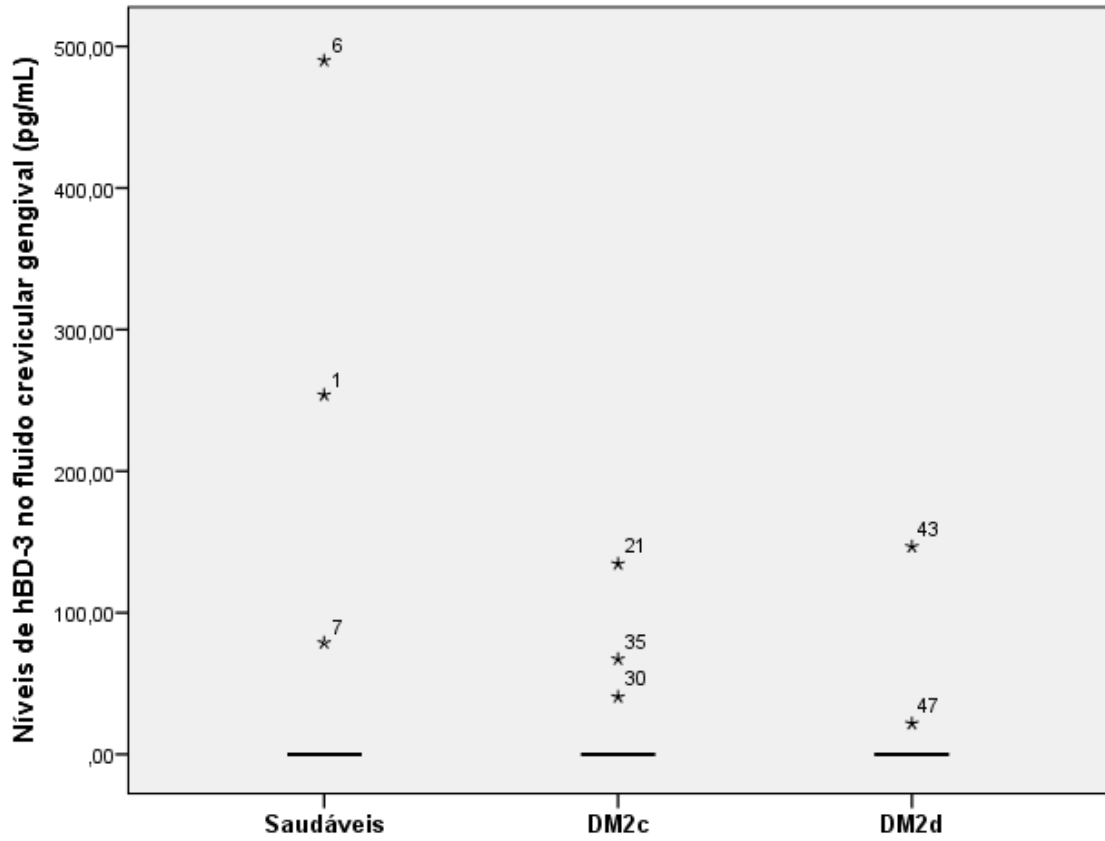


Figura 3. Níveis de hBD-3 no fluido crevicular gengival em indivíduos saudáveis (S), com DM2 compensado (DM2c) e DM2 descompensado (DM2d). S = DM2c ($p > 0,05$); S = DM2d ($p > 0,05$); DM2c = DM2d ($p > 0,05$).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro das limitações do presente estudo, pode-se concluir que tanto a periodontite quanto o DM2 parecem influenciar os níveis das beta-defensinas 1, 2 e 3 no FCG dos indivíduos.

Nos indivíduos portadores de periodontite houve uma expressão elevada de hBD-2 e -3. Esta expressão elevada pode sugerir tanto uma resposta normal do organismo perante à infecção dos tecidos gengivais ou ser considerado um fator parcialmente responsável pela resposta imunoinflamatória exacerbada comumente encontrada em indivíduos portadores de periodontite.

Por outro lado, foram observados níveis reduzidos das hBDs nos indivíduos diabéticos. Uma menor expressão destas defensinas no FCG de indivíduos com DM2c (hBD-1) e DM2d (hBD-1 e -2) pode ser parcialmente responsável pela maior suscetibilidade destes indivíduos à PC.

Estudos futuros envolvendo amostras maiores são necessários para a confirmação destes achados. Além disso, estudos com análises microbiológicas e genéticas, bem como estudos comparativos entre os níveis de hBDs no FCG e nos tecidos gengivais podem trazer maiores esclarecimentos sobre o comportamento destes peptídeos na saúde e na doença periodontal.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Glycemic targets: standards of medical care in diabetes-2018. **Diabetes care**, v. 41, n. 1, p. S55–S64, jan. 2018.
- BISSELL, J.; et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. **J Oral Pathol Med**, v. 33, n. 5, p. 278–285, mai. 2004.
- BRANCATISANO, F. L. et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. **J Dent Res**, v. 90, n. 2, p. 241–245, fev. 2011.
- COSTA, L. C. M. et al. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin 1 in individuals with and without chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, 2018. No prelo.
- CUI, D. et al. Human β -defensin 3 inhibits periodontitis development by suppressing inflammatory responses in macrophages. **Mol Immunol**, v. 91, p. 65–74, nov. 2017.
- DALE, B. A. et al. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. **J Periodontal Res**, v. 36, n. 5, p. 285–294, out. 2001.
- DOMMISCH, H. et al. Differential gene expression of human beta-defensins (hbd-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, n. 3, p. 186–190, jun. 2005.
- DUNSCHE, A. et al. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. **Eur J Oral Sci**, v. 110, n. 2, p. 121–124, abr. 2002.
- ERTUGRUL, A. S. et al. 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 Periodontal Res**, v. 48, n. 4, p. 475–482, ago. 2013.
- FUNDERBURG, N. et al. Human β -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via toll-like receptors 1 and 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 47, p. 18631–18635, nov. 2007.
- GARCIA, J. R. C. et al. Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific saltsensitive spectrum of antimicrobial activity. **FASEB J**, v. 15, n. 10, p. 1819–1821, ago. 2001.
- GURSOY, U. K. et al. A Novel Organotypic Dento-Epithelial Culture Model: Effect of fusobacterium nucleatum biofilm on b-defensin-2, -3, and LL-37 expression. **J Periodontol**, v. 83, n. 2, p. 242–247, fev. 2012.
- HOSOKAWA, I. et al. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. **Clin Exp Immunol**, v. 146, n. 2, p. 218–225, nov. 2006.
- JOLY, S. et al. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. **Mol Immunol**, v. 42, n. 9, p. 1073–1084, mai. 2005.

KHADER, Y. S. et al. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. **J Diabetes Complications**, v. 20, n. 1, p. 59–68, jan. 2006.

KRISANAPRAKORNKIT, S.; et al. Inducible expression of human β -defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2907–2915, mai. 2000.

KRISANAPRAKORNKIT, S. et al. Expression of the peptide antibiotic human β -defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. **Infect Immun**, v. 66, n. 9, p. 4222–4228, set. 1998.

LEE, J. et al. Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. **J Endod**, v. 39, n. 12, p. 1625–1629, dez. 2013.

LI, X. et al. The expression of human β -defensins (hbd-1, hbd-2, hbd-3, hbd-4) in gingival epithelia. **Arch Oral Biol**, v. 66, p. 15–21, jun. 2016.

LIU, J. et al. The expression of hbds in the gingival tissue and keratinocytes from healthy subjects and periodontitis patients. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 2, p. 193–198, nov. 2014.

LÓPEZ, N. J.; SMITH, P. C.; GUTIERREZ, J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. **J Periodontol**, v. 73, n. 8, p. 911–924, ago. 2002.

LU, Q. et al. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. **J Periodontol Res**, v. 39, n. 4, p. 221–227, ago. 2004.

LU, Q. et al. Expression of Human Beta-Defensin-3 in Gingival Epithelia. **J Periodontol Res**, v. 40, n. 6, p. 474–81, dez. 2005.

MAKEUDOM, A. et al. The antimicrobial peptide, human β -defensin-1, potentiates in vitro osteoclastogenesis via activation of the P44/42 mitogen-activated protein kinases. **Peptides**, v. 95, p. 33–39, jul. 2017.

MATHEWS, M. et al. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. **Infect Immun**, v. 67, n. 6, p. 2740–2745, jun. 1999.

MCCORMICK, T. S.; WEINBERG, A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. **Periodontol 2000**, v. 54, n. 1, p. 195–206, out. 2010.

MEALEY, B. L.; OATES, T. W.; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Diabetes mellitus and periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 77, n. 8, p. 1289–1303, ago. 2006.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 69, n. 1, p. 7–17, out. 2015.

- NIYONSABA, F. et al. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 4, p. 1066–1075, abr. 2001.
- NOGUCHI, T. et al. Syntheses of prostaglandin E2 and E-cadherin and gene expression of beta-defensin-2 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Inflammation**, v. 27, n. 6, p. 341–349, dez. 2003.
- O'NEIL, D. A. et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hbd-1 and hbd-2 in intestinal epithelium. **J Immunol**, v. 163, p. 6718–6724, dez. 1999.
- OUHARA, K. et al. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, beta-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 6, p. 888–896, 1 jun. 2005.
- PARK, O. et al. A 15-amino acid c-terminal peptide of beta-defensin-3 inhibits bone resorption by inhibiting the osteoclast differentiation and disrupting podosome belt formation. **J Mol Med (Berl)**, v. 95, n. 12, p. 1315–1325, dez. 2017.
- PEREIRA, A. L. et al. Influence of periodontal status and periodontopathogens on levels of oral human beta-defensin-2 in saliva. **J Periodontol**, v. 84, n. 10, p. 1445–1453, out. 2013.
- PEREIRA, A. L. et al. Human beta-defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 12, p. 1609–1614, dez. 2012.
- RASCHIG, J. et al. Ubiquitously expressed human beta defensin 1 (hbd1) forms bacteria-entrapping nets in a redox dependent mode of action. *PLoS Pathog*, v. 3, n. 3, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006261>>. Acesso em: 13 jun. 2018.
- SCHROEDER, B. O. et al. Antimicrobial activity of human beta-defensin 1. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 419–423, jan. 2011.
- TAGUCHI, Y.; IMAI, H. Expression of beta-defensin-2 in human gingival epithelial cells in response to challenge with *Porphyromonas gingivalis* in vitro. **J Periodontol Res**, v. 41, n. 4, p. 334–339, ago. 2006.
- TAYLOR, G. W. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. **Ann Periodontol**, v.6, n.1, p. 99-112, dez. 2001.
- VANKEERBERGHEN, A. et al. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. **J Periodontol**, v. 76, n. 8, p. 1293–1303, ago. 2005.
- VARDAR-SENGUL, S. et al. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of

patients with specific periodontal diseases. **J Periodontal Res**, v. 42, n. 5, p. 429–437, mar. 2007.

WANG, H. et al. Effect of human beta-defensin-3 on the proliferation of fibroblasts on periodontally involved root surfaces. **Peptides**, v. 32, n. 5, p. 888–894, mai. 2011.

WU, Y. et al. Beta-defensin 2 and 3 promote bacterial clearance of pseudomonas aeruginosa by inhibiting macrophage autophagy through downregulation of early growth response gene-1 and c-FOS. **Front Immunol**, v. 9, Fev. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00211>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

YANG, D. et al. Multiple Roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. **Annu Rev Immunol**, v. 22, n. 1, p. 181–215, abr. 2004.

YANG, D. et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 525–528, 15, out. 1999.

YILMAZ, D. et al. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin-1 in type 2 diabetes mellitus and periodontitis. **Clin Oral Investig**, v. 22, n. 5, p. 2135–2140, jun. 2018.

YILMAZ, D. et al. Overexpressions of HBD-2, HBD-3, and HCAP18/LL-37 in gingiva of diabetics with periodontitis. **Immunobiology**, v. 220, n. 11, p. 1219–1226, nov. 2015.

YONG, X. et al. Periodontopathogens and human β -defensin-2 expression in gingival crevicular fluid from patients with periodontal disease in Guangxi, China. **J Periodontal Res**, v. 50, n. 3, p. 403–410, jul. 2015.

ZORINA, O. A. et al. The expression of TLR4 and hbd3 in epithelial cells of oral mucosa by surgical treatment of periodontitis. **Stomatologija (mosk)**, v. 95, n. 4, p. 13–15, jan. 2016.

APÊNDICE A — Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BETA DEFENSINAS NO FLUIDO GENGIVAL DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 CONTROLADOS E NÃO CONTROLADOS”. Essa pesquisa será realizada por mim Alexandre Godinho Pereira, e orientada pelo professor Luis Otávio de Miranda Cota.

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 indivíduos saudáveis são diferentes dos encontrados em indivíduos 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 – indivíduos saudáveis, sem doença sistêmica; 2) grupo de indivíduos com diabetes controlada; 3) grupo de indivíduos com diabetes não controlada. Será necessário realizar uma coleta, com a utilização de papel absorvente, do fluido presente no sulco gengival. Esta coleta não lhe representará qualquer risco, incômodo ou prejuízo. 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. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor possíveis fatores associados à maior ocorrência e gravidade da doença periodontal em indivíduos com diabetes.

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 me acarrete qualquer tipo de prejuízo. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Belo Horizonte, _____ de _____ 20____.

Assinatura

Pesquisadores responsáveis:

Alexandre Godinho Pereira Contato:

Luis Otavio de Miranda Cota Contato:

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

APÊNDICE B — Ficha de seleção de pacientes

FICHA DE SELEÇÃO DE PACIENTES

Identificação:
Nome:
Data de Nascimento:
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 anti-inflamatório nos últimos 3 meses: () não ()sim

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

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

Uso de prótese parcial removível 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

APÊNDICE C — Ficha socioeconômica

Nome:		
Número		
Idade	Gênero	
Renda familiar: () ≤ 5 salários mínimos () maior 5 salários mínimos		
Escolaridade: () < 8 anos () 8-12 anos () ≥ 12 anos		
Condição de vida: () com acompanhante () sem acompanhante		
Peso	Altura	IMC
Última 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 ≥ 6 vezes por semana () CAGE ()		
AUDIT		

ANEXO A — Aprovação do COEP

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.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG