

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/03/2020.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ana Carolina Monachini Marcantonio

Influência do tabagismo nos níveis de beta-defensina 3 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ana Carolina Monachini Marcantonio

Influência do tabagismo nos níveis de beta-defensina 3 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Periodontia

Orientador: Prof^a Dr^a Daniela Leal Zandim-Barcelos

Araraquara

2018

Marcantonio, Ana Carolina Monachini

Influência do tabagismo nos níveis de beta-defensina 3 no
fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica /
Ana Carolina Monachini Marcantonio. – Araraquara: [s.n.], 2018
49 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade
Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim Barcelos

1. Periodontite crônica 2. beta-Defensinas 3. Tabagismo
4. Citocinas I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C.C. Montagnoli, CRB-8/5646
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Ana Carolina Monachini Marcantonio

Influência do tabagismo nos níveis de beta-defensina 3 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Periodontia

Presidente e orientador Prof.^a Dr.^a Daniela Leal Zandim-Barcelos

2º Examinador Prof. Dr. Rafael Silveira Faeda

3º Examinador Prof.^a Dr.^a Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara, 16 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Ana Carolina Monachini Marcantonio

NASCIMENTO	2 de março de 1979 - Araraquara-SP
FILIAÇÃO	Elcio Marcantonio Junior Marilda Monachini Marcantonio
2012/2015	Graduação de Odontologia pela Universidade de Araraquara - Uniará
2015/2017	Especialização em Periodontia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp
2015/2017	Especialização em Implantodontia pela Faculdade Herrera
2016/2018	Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado na Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp

Dedico este trabalho ao homem que dedicou sua vida a ensinar, meu avô **Elcio Marcantonio**, amava ensinar e aprender com seus alunos. Obrigada por todo ensinamento não só profissional, mas principalmente de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar e colocar pessoas muito especiais na minha vida.

Ao meu marido, Duda, que divide a responsabilidade de cuidar da nossa casa e filho, sempre me apoiando e incentivando em cada etapa da minha carreira sem me deixar desistir.

Ao meu filho que é a pessoa que me faz querer ser sempre melhor, sem você com certeza eu não estaria aqui.

Aos meus pais, Elcio e Marilda, vocês são o meu porto seguro. Cada um na sua maneira, sempre me apoiando e incentivando. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês.

A Adriana que está sempre me ajudando e orientando, pode ter certeza que eu nunca vou esquecer que sem você eu não estaria aqui.

Aos meus avôs Elcio e Antonio que infelizmente não estão mais presentes, tenho certeza que sempre estarão olhando por mim. Sinto muito a falta de vocês, principalmente em um momento como esse. Minhas avós Marilene e Zilda, pessoas tão diferentes e que me ensinaram tanto nessa vida, obrigada por todo o cuidado que me dedicam.

As minhas irmãs, melhores amigas que a vida podia me dar, Luiza minha companheira da vida, minha confidente. Camila minha “foquinha, sempre pronta para defender as pessoas que estão do seu lado. Tati meu “catatau”, sempre vai ser a melhor companhia para baladas.

Aos meus tios Maristela, Claudio, Eloisa e Rodolfo vocês são pessoas que sempre me transmitem algum ensinamento, seja profissional ou na vida. Amo ter vocês na minha vida.

Ao meu cunhado Felipe que sempre está me ajudando.

Aos meus primos Bruno, Veronica, Ligia, Vinicius e Julia, pelo amor e amizade.

Aos meus sobrinhos, Jorge, João, Laura e Mateus por sempre poder olhar para vocês e sentir o amor puro.

À minha orientadora Daniela, obrigada por toda ajuda e dedicação. Sempre me passou muita segurança e com certeza se estou aqui hoje, devo a você.

A minha amiga Kahena, uma pessoa muito iluminada, obrigada por toda paciência que você tem para me explicar.

Aos professores do mestrado por dividirem seus ensinamentos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro para realização deste estudo (Processo 479052/2013-1).

Marcantonio ACM. Influência do tabagismo nos níveis de beta-defensina 3 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

O propósito deste estudo foi determinar a influência do tabagismo nos níveis de beta-defensina 3 (hBD 3) no fluido crevicular gengival (FCG) de indivíduos com periodontite crônica e avaliar sua relação com saúde e doença periodontal. Além disso, foi investigada a correlação deste peptídeo antimicrobiano com metaloproteinase da matriz (MMP-8) e citocinas pró (IL-10) e anti-inflamatórias (IL-1 β , IFN- γ e TNF- α). Um total de 40 indivíduos com periodontite crônica, sendo 20 fumantes (PF) e 20 não fumantes (PNF), e 20 indivíduos sem doença periodontal (S) foram incluídos no estudo. Amostras de FCG de sítios saudáveis e doentes dos indivíduos com periodontite, e apenas de sítios saudáveis dos indivíduos periodontalmente saudáveis, foram coletadas com tiras de papel absorvente. A quantificação da hBD 3 foi feita pela técnica ELISA sanduíche e dos marcadores biológicos por ensaio Multiplex. Níveis significativamente menores de hBD 3 foram identificados nos sítios doentes de PF em comparação aos sítios doentes de PNF ($p=0,02$). Por outro lado, os níveis de hBD 3 nos sítios saudáveis de PF foram significativamente maiores que nos sítios saudáveis de PNF e S ($p=0,006$). Na comparação dos sítios dentro do grupo PF, foi verificado que os sítios doentes apresentavam níveis reduzidos de hBD 3 em comparação com sítios saudáveis ($p=0,04$). Já no grupo PNF, os níveis de hBD 3 foram mais elevados nos sítios doentes que nos sítios saudáveis ($p=0,02$). Uma correlação negativa foi observada entre os níveis de hBD 3 e MMP-8, IL-1 β e IFN- γ tanto nos sítios saudáveis como nos sítios doentes de PF e PNF, e uma correlação positiva foi verificada entre hBD 3 e IL-10. Baseado nestes resultados, concluímos que o fumo teve um impacto negativo na expressão da hBD3 no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite crônica. Esta redução nos níveis da hBD 3 poderia ser mais um mecanismo envolvido na associação entre tabagismo e doença periodontal.

Palavras-chave: Periodontite crônica. beta-Defensinas. Tabagismo. Citocinas.

Marcantonio ACM. Influence of smoking on gingival crevicular fluid levels of hBD 3 in patients with chronic periodontitis. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the influence of smoking on gingival crevicular fluid (GCF) levels of beta-defensin 3 (hBD 3) in individuals with chronic periodontitis and to evaluate its relationship with health and periodontal disease. In addition, the correlation of this antimicrobial peptide with matrix metalloproteinase (MMP-8) and pro (IL-10) and anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , IFN- γ and TNF- α) was investigated. A total of 40 individuals with chronic periodontitis, including 20 smokers (PS) and 20 non-smokers (PNS), and 20 subjects without periodontal disease (H) were included in the study. GCF samples from healthy and diseased sites of individuals with periodontitis, and only from healthy sites of periodontally healthy individuals, were collected with absorbent paper strips. Quantification of hBD 3 was performed by a sandwich ELISA assay and the biological markers levels were analyzed by a multiplex assay. Significantly lower levels of hBD 3 were identified in diseased sites of PS compared to diseased sites of PNS ($p = 0.02$). On the other hand, the levels of hBD 3 in healthy sites of PS were significantly higher than in healthy sites of PNS and H ($p = 0.006$). The comparison between the sites within the groups with periodontitis showed reduced levels of hBD 3 in diseased sites of PS compared to healthy sites ($p = 0.04$), while higher levels of this peptide was detected in diseased sites of PNS compared to healthy sites ($p = 0.02$). A negative correlation was observed between the levels of hBD 3 and MMP-8, IL-1 β and IFN- γ in healthy and diseased sites of PS and PNS, and a positive correlation was found between hBD 3 and IL-10. Based on these results, we concluded that smoking had a negative impact on hBD 3 expression in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. This reduction on hBD 3 levels may be an additional mechanism on smoking and periodontal disease association.

Keywords: Chronic Periodontitis. beta-Defensins. Tobacco Use Disorder. Cytokines.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	16
3 PUBLICAÇÃO	17
3.1 Publicação	17
4 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE A	36
APÊNDICE B	40
ANEXO A	46
ANEXO B	48

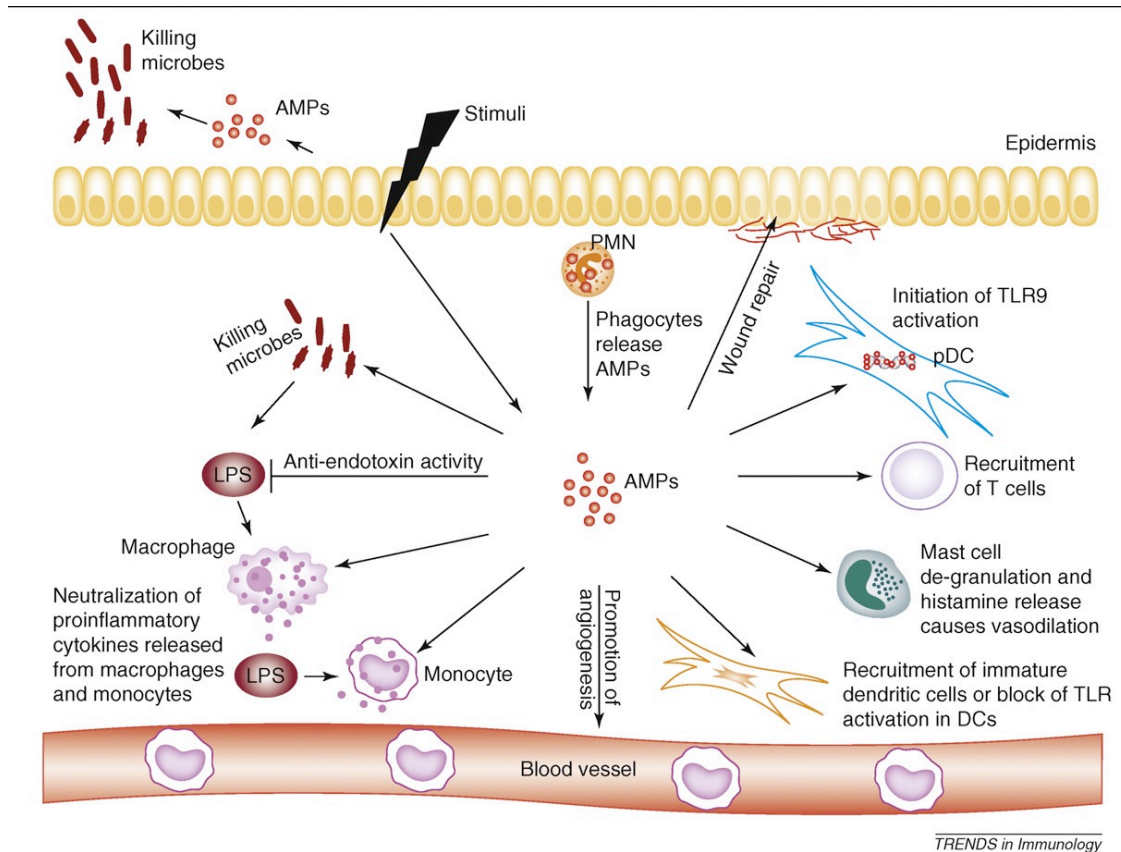
1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa de patogênese complexa que se caracteriza clinicamente pela destruição dos tecidos de suporte do dente. O principal fator etiológico da doença periodontal são as bactérias periodontopatogênicas¹. No entanto, sua instalação, progressão e severidade depende de uma combinação de fatores que envolve o hospedeiro, o agente microbiano, hábitos de higiene oral, fatores ambientais e genéticos. Entre esses fatores ambientais, pode-se citar o fumo como importante fator de risco para a doença periodontal².

Os fumantes têm de 2,5 a 6 vezes mais risco de desenvolver doença periodontal do que os não fumantes e esse risco está diretamente relacionado com a quantidade de cigarros consumida^{3,4}. Uma maior severidade da doença periodontal é observada com o aumento da intensidade e duração do hábito de fumar^{5,6}. Clinicamente, pacientes fumantes apresentam uma redução no sangramento gengival, um aumento da profundidade de sondagem e da perda de inserção, e um aumento da perda dentária^{2,7}.

De maneira geral, o fumo parece inibir a defesa do hospedeiro contra infecções microbianas enquanto promove ou aumenta a reação inflamatória⁸. Porém, o impacto do fumo e de seus produtos, como a nicotina e cotinina, na resposta imune inata local, em particular na expressão de peptídeos antimicrobianos, ainda não está totalmente definido⁹. Os peptídeos antimicrobianos são componentes essenciais da imunidade inata e permitem que os seres humanos resistam à infecção por microrganismos. Estes peptídeos são encontrados principalmente em fagócitos e células epiteliais, mostrando uma atividade direta contra uma ampla gama de agentes microbianos. Embora a deficiência, desregulação, ou superprodução destes peptídeos antimicrobianos não seja a causa direta de uma doença, numerosos estudos já forneceram evidências convincentes do envolvimento dos mesmos na complexa rede de respostas imunes em doenças inflamatórias. Eles são capazes de influenciar diversos processos, dentre eles a liberação de citocinas e quimiocinas, quimiotaxia, apresentação de antígeno, angiogênese, degranulação de mastócitos, reparação de feridas e modulação da resposta de células dendríticas ou células T^{10,11}. Desta forma, os peptídeos antimicrobianos funcionam como uma ponte entre imunidade inata e adaptativa^{10,11}.

Figura 1 – Funções múltiplas dos peptídeos antimicrobianos na resposta do hospedeiro. Além do efeito antimicrobiano, os peptídeos induzem uma variedade de respostas imunomodulatórias



Legenda: AMP, peptídeos antimicrobianos; DC, células dendríticas; LPS, lipopolissacarídeo; pDC, células dendríticas plasmocitoides; PMN, leucócitos polimorfonucleares; TLR, receptor Toll-like.

Fonte: Lai e Gallo, 2009¹⁰, p.135.

As defensinas são os peptídeos antimicrobianos predominantes em humanos. Além da capacidade de inativar bactérias, fungos e alguns vírus encapsulados, as defensinas apresentam propriedades imunomodulatórias. As defensinas regulam a proliferação de células epiteliais, aumentam a fagocitose por macrófagos, são quimioatraentes para monócitos, macrófagos, linfócitos T e mastócitos, suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias para antígenos microbianos específicos, ativam e promovem a degranulação de mastócitos, regulam o sistema complemento, e aumentam a resposta imune adaptativa^{11, 12}.

As defensinas são pequenos peptídeos catiônicos divididos em duas principais subfamílias de acordo com a topologia de suas três ligações dissulfeto de cisteína

intramoleculares: alfa-defensinas ou beta-defensinas (hBDs). As alfa-defensinas podem ser subdivididas em defensinas presentes nos grânulos de neutrófilos (HNP 1-4) e defensinas presentes nas células de Paneth do intestino delgado (HD 5 e HD 6). HNP 1-3 também estão presentes em monócitos e células natural killer. As hBDs são produzidas pelas células epiteliais de uma variedade de tecidos e órgãos, incluindo pele, traqueia, sistema urogenital, fígado, pâncreas e outros^{12, 13}. Na cavidade bucal, as hBDs estão expressas na gengiva, língua, glândulas salivares e mucosa, podendo ser encontradas na saliva e fluido crevicular gengival. Apesar da identificação genômica de diferentes hBDs em humanos, aproximadamente 28 tipos, as hBDs 1-4 são as mais estudadas¹⁴.

As hBDs estão localizadas em diferentes sítios do tecido gengival. As hBDs 1 e 2 estão localizadas no epitélio estratificado suprabasal e nas camadas mais externas do epitélio, adjacentes à região de formação da placa na superfície dental e no epitélio sulcular inflamado, o que é consistente com a formação da barreira epitelial¹³. Por outro lado, as hBDs 1 e 2 não são detectadas no epitélio juncional. Enquanto a hBD 2 está localizada nos estratos mais diferenciados do epitélio oral (granuloso e espinhoso), a hBD 3 está localizada no estrato basal menos diferenciado, nos queratinócitos, células de Langerhans e células de Merkel, sugerindo que a hBD 3 pode facilitar a comunicação entre os tecidos gengival e conjuntivo, servindo como elo de ligação entre as respostas imune inata e adaptativa^{14,15}.

Uma notável diferença na expressão de hBDs 2 e 3 foi verificada entre o epitélio oral e a maioria dos outros epitélios. Estas defensinas estão expressas apenas na presença de infecção ou inflamação na maioria dos tecidos, incluindo epitélio da pele, intestino e traqueia^{16,17}. Porém, tanto a hBD 2 como a hBD 3 estão presentes no tecido gengival normal sem inflamação¹³.

Uma expressão significativamente maior de hBD 2 foi encontrada no epitélio gengival de indivíduos periodontalmente saudáveis em comparação com tecidos clinicamente saudáveis de pacientes com periodontite crônica. Além disso, foi verificado que as hBDs 1 e 2 estavam expressas em um nível mais elevado no epitélio da bolsa periodontal do que no epitélio gengival saudável adjacente¹⁵.

Em um estudo envolvendo amostras de tecido gengival de pacientes com gengivite, periodontite agressiva e periodontite crônica, foram observadas expressões distintas dos genes hBD 1 e hBD 2¹⁸. A expressão das hBDs 1 e 2 foram menores nos tecidos gengivais de pacientes com gengivite do que nos tecidos de controles

saudáveis. Por outro lado, a expressão de hBD 1 foi reduzida e a de hBD 2 foi aumentada em pacientes com periodontite agressiva em comparação com controles saudáveis. Pacientes com periodontite crônica, por sua vez, apresentaram níveis mais elevados de hBD 1 em comparação com controles saudáveis, sugerindo que embora esses níveis mais elevados de hBD 1 possam ter oferecido um efeito protetor, eles não foram suficientes para evitar a infecção e destruição periodontal. O aumento da expressão de hBD 2 em pacientes com periodontite agressiva pode ser causada pela estimulação deste peptídeo antimicrobiano por *A. actinomycetemcomitans*. Este microorganismo foi capaz de estimular a expressão hBD-mRNA em queratinócitos orais humanos in vitro¹⁹.

Alguns estudos têm demonstrado que o cigarro pode comprometer a resposta imune inata mediada por células epiteliais contra patógenos. Fumantes e ex-fumantes apresentaram uma redução significativa nos níveis de hBD 2 no fluido da faringe e no escarro de pacientes com pneumonia aguda comparado com não fumantes. Além disso, foi verificado que exposição ao cigarro reduziu in vitro a expressão de hBD 2 pelas células do epitélio das vias aéreas em resposta ao estímulo bacteriano²⁰.

O extrato de fumaça de cigarro e a nicotina (0.1 a 1 mM) suprimiram a expressão de hBD 2 e aumentaram a produção de IL-8 pelas células epiteliais do tecido gengival humano²¹. Este mecanismo imune-modulador do cigarro foi então considerado como um possível mecanismo associado à ocorrência e severidade da doença periodontal em pacientes fumantes. O desequilíbrio da homeostasia oral provocado pela supressão de hBD 2 e aumento da liberação de IL-8 favorece a invasão de patógenos periodontais e aumenta o processo de inflamação crônica que é característico da periodontite²¹.

Uma redução da expressão de hBD 2 também foi observada em queratinócitos (HaCaT) previamente estimulados com nicotina (10 µg/mL) ou estimulados simultaneamente com nicotina e TNF- α ²². Neste estudo, não foi detectada alteração na expressão de hBD 1 utilizando as mesmas condições experimentais.

Uma correlação negativa foi encontrada entre os níveis salivares de LL-37, um peptídeo antimicrobiano produzido por neutrófilos, e cotinina sugerindo que o tabagismo ou a longa exposição ao tabaco pode resultar em redução dos níveis de LL-37 na cavidade oral e aumentar o risco de periodontite²³.

Levando em consideração o papel fundamental das defensas na resposta imune do hospedeiro e a ausência de estudos clínicos avaliando a influência do

tabagismo nos níveis de hBD 3 em pacientes com periodontite crônica, conforme verificado em uma recente revisão de literatura⁹, propomos o presente estudo com a seguinte hipótese principal: produtos tóxicos do cigarro promovem uma redução nos níveis de hBD 3 no fluido crevicular gengival afetando a interação microbiota-hospedeiro.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, podemos concluir que o tabagismo teve um impacto negativo na expressão de hBD 3 no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite crônica. Esta redução nos níveis de hBD 3 poderia ser mais um mecanismo supressor do tabagismo na resposta imune dos tecidos periodontais. Além disso, verificamos que a hBD 3 pode ter uma influência na produção e/ou liberação de citocinas e enzimas no fluido crevicular gengival.

REFERÊNCIAS*

1. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994; 5: 78-111.
2. Gomes SC, Nonnenmacher C, Susin C, Oppermann RV, Mutters R, Marcantonio RA. The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2008; 79(12): 297-304.
3. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*. 1994; 65(3): 260-7.
4. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol*. 1995; 66(1): 23-9.
5. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*. 1996; 1(1): 1-36.
6. Bergstrom J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *J Clin Periodontol*. 2000; 27(1): 61-8.
7. Erdemir EO, Duran I, Haliloglu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(2): 99-104.
8. Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 267-77.
9. Li S, Schmalz G, Schmidt J, Krause F, Haak R, Ziebolz D. Antimicrobial peptides as a possible interlink between periodontal diseases and its risk factors: a systematic review. *J Periodontal Res*. 2017. (Epub ahead of print).
10. Lai Y, Gaallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*. 2009; 30(3): 131-41.
11. McCormick TS, Weinberg A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontol 2000*. 2010; 54(1): 195-206.
12. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol*. 2010; 5(1): 99-113.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R et al. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res.* 2001; 36(5): 285-94.
14. Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H, Goncalves RB, Karimbux N, Napimoga MH et al. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. *Clin Exp Immunol.* 2006; 146(2): 218-25.
15. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol.* 1999; 163(12): 6718-24.
16. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2002; 347(15): 1151-60.
17. Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2004; 39(4): 221-7.
18. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodontol.* 2007; 78(1): 127-34.
19. Chung W, Dommisch H, Yin L, Dale B. Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. *Current Pharmaceutical Design,* 2007; 13(30): 3073-83.
20. Herr C, Beisswenger C, Hess C, Kandler K, Suttorp N, Welte T et al. Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax.* 2009; 64(2): 144-9.
21. Mahanonda R, Sa-Ard-lam N, Eksomtramate M, Rerkyen P, Phairat B, Schaecher KE et al. Cigarette smoke extract modulates human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. *J Periodontal.* 2009; 44(4): 557-64.
22. Wolgin M, Liidakis S, Pries AR, Zakrzewicz A, Kielbassa AM. HBD-1 and hBD-2 expression in HaCaT keratinocytes stimulated with nicotine. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(6): 814-9.
23. Takeuchi Y, Nagasawa T, Katagiri S, Kitagawara S, Kobayashi H, Koyanagi T et al. Salivary levels of antibacterial peptide (LL-37/hCAP-18) and cotinine in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2012; 83(6): 766-72.