

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o
texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir de
27/03/2026.



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



Lorena Silva Gutierrez

**Papel imunomodulador das beta-defensinas na resposta inflamatória nos
tecidos periodontais**

Araraquara

2024



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



Lorena Silva Gutierrez

**Papel imunomodulador das beta-defensinas na resposta inflamatória nos
tecidos periodontais**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Leal Zandim-
Barcelos

Araraquara

2024

G984p Gutierrez, Lorena Silva
Papel imunomodulador das beta-defensinas na
resposta inflamatória nos tecidos periodontais /
Lorena Silva Gutierrez. -- Araraquara, 2024
76 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Daniela Leal Zandim- Barcelos

1. Periodontite crônica. 2. Imunidade inata. 3.
Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 4. Raspagem
dentária. 5. Queratinócitos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de
Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Lorena Silva Gutierrez

**Papel imunomodulador das beta-defensinas na resposta inflamatória nos
tecidos periodontais**

Comissão julgadora

Defesa para obtenção do grau de doutorado em odontologia

Presidente e orientadora: Profa^a. Dr^a. Daniela Leal Zandim- Barcelos

2º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

3º Examinador: Profa^a. Dr^a. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto

4º Examinador: Profa^a. Dr^a. Marinella Holzhausen Caldeira

Araraquara, 27 de março de 2024

DADOS CURRICULARES

Lorena Silva Gutierrez

NASCIMENTO: 07.06.1993, Paulo de Faria/SP

FILIAÇÃO: Adão Aparecido Gutierrez
Luciene Aparecida da Silva Gutierrez

2020/Atual- **Pós-Graduação em Odontologia – Nível Doutorado**
Área de concentração em Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP
Araraquara/SP
Orientadora: Profa^a. Dr^a. Daniela Leal Zandim-Barcelos
Bolsista: CAPES

2021/2022- **Estágio de Doutorado Sanduíche**
Universitätsmedizin Mainz
Departamento de Periodontia e Odontologia Operatória
Mainz, Alemanha.
Bolsista CAPES PROBIAL- processo 88887.635786/2021-00.

2018/2019- **Pós-Graduação em Odontologia – Nível Mestrado**
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
Araraquara/SP
Orientadora: Profa^a. Dr^a. Daniela Leal Zandim-Barcelos
Bolsista CNPq

2016/2017- **Residência em Periodontia**
Universidade Estadual de Londrina (UEL)
Londrina/ Paraná

2011/2015- **Graduação em Odontologia**
Universidade Estadual de Londrina (UEL)
Londrina/ Paraná

Dedico esse trabalho, com muito amor, para as pessoas mais importantes da minha vida, meus Pais e meus Avós, que me apoiaram em todos os momentos e permitiram a concretização de mais uma etapa da minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a vida, saúde e a oportunidade de crescer profissionalmente e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Adão e Luciene, por terem proporcionado, com tanto amor, uma boa educação, formação pessoal, sempre se desdobrando para que eu tivesse as melhores condições, independente do que eu precisasse. Jamais serei capaz de retribuir com tamanha perfeição! Amo muito vocês e serei eternamente grata!

Aos meus Avós: Zilda, Sebastião; Leocadia e Ermínio (in memoriam) que acompanharam meu desenvolvimento e foram um grande suporte na construção da minha personalidade. Vocês são os melhores que eu poderia ter!

Em especial, à minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos, pela confiança em mim depositada, por ter sido meu apoio e minha guia nessa jornada tão desafiadora, mas muito gratificante! Obrigada pela amizade, pela convivência agradável e por ter sido exemplo de paciência, perseverança e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, pela generosidade em me conduzir no processo de Doutorado sanduíche, pelo suporte e confiança.

Ao Prof. Dr. James Deschner, Profa. Dra. Andressa Nogueira, Antonietta, Nicole e Irmel, pela acolhida na Alemanha, durante o Doutorado sanduíche e pelos ensinamentos oferecidos nesse período.

À minha família Alemã: Gladis, Stefan e Lara, pela acolhida tão amorosa nesse período, pelo suporte emocional e ajuda, das mais diversas formas.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Agradeço também pela concessão da Bolsa pelo edital nº 12/2017-PROBRAL, CAPES/DAAD, processo 88887.635786/2021-00.

Fazei tudo por Amor. - Assim não há coisas pequenas: tudo é grande. - A perseverança nas pequenas coisas, por Amor, é heroísmo. São Josemaria Escrivá*

* Escrivá J. Caminho. Alfragide: Caminho; 1975.

Gutierrez LS. Papel imunomodulador das beta-defensinas na resposta inflamatória nos tecidos periodontais [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica, induzida por bactérias, que causa a destruição dos tecidos de suporte dentário. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são importantes componentes da reposta imune inata e um dos principais mecanismos de defesa do sulco gengival, exibindo uma atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias Gram-negativas e positivas, fungos e vírus, além regular eventos inflamatórios iniciais e aumentarem a imunidade adaptativa. As defensinas, beta (HBD) e alfa-defensinas, são os PAMs predominantes em humanos. Estudos prévios mostraram que há uma diferença na regulação destes peptídeos em sítios com saúde e doença periodontal. Assim, os objetivos deste estudo foram: (1) avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico (TPNC) sobre os níveis de HBD-1, 2 e 3 no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite, (2) investigar o impacto do estímulo com HBD-2 em células epiteliais na expressão de IL-8, CCL20 e seus receptores CXCR1, CXCR2 e CCR6. Para o estudo clínico, 22 pacientes com boas condições de saúde geral, portadores de periodontite estágio III ou IV, grau B foram selecionados. Esses pacientes apresentavam pelo menos 4 sítios com profundidade de sondagem (PS) ≥ 4 mm, sangramento à sondagem (SS) e nível clínico de inserção (NCI) ≥ 4 mm em diferentes quadrantes. Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados: índice de placa visível (IPV), índice de sangramento gengival (ISG), PS, SS e NCI. Após uma semana do exame clínico, foi realizada coleta de FCG de dois sítios periodontalmente saudáveis, dois com perda de inserção moderada (PS = 4-5 mm, SS e NCI ≥ 4 mm) e dois com perda de inserção avançada (PS ≥ 6 mm, SS e NCI ≥ 6 mm). Em seguida, o tratamento periodontal não-cirúrgico foi realizado, por um único operador, por meio raspagem e alisamento radicular (RAR). Um mês após o término do TPNC, foram realizadas novas coletas do FCG dos sítios selecionados e reavaliação dos parâmetros clínicos. A quantificação dos níveis das HBDs no FCG foi realizada pela técnica ELISA sanduíche. Para o estudo in vitro, queratinócitos foram estimulados com duas diferentes doses de HBD-2 e, então, os níveis dos mediadores inflamatórios e seus receptores foram detectados quanto à expressão gênica pela técnica RT-qPCR em tempo real e a quantificação proteica foi determinada pelo ensaio de ELISA sanduíche. Os dados de ambos os estudos foram tabulados e análises estatísticas apropriadas foram realizadas. No estudo clínico, os níveis de HBD-1 foram significativamente maiores no FCG após tratamento periodontal em comparação com os valores de baseline. Para as HBD-2 e 3 não foram detectadas diferenças nos níveis pré e pós-tratamento. Nos experimentos in vitro, o estímulo com HBD-2 aumentou significativamente a expressão gênica de IL-8, CCL20 e seus receptores CXCR1, CXCR2 e CCR6 em queratinócitos. Estes resultados confirmam que as HBDs podem ter um efeito imunomodulador na etiopatogênese da periodontite.

Palavras-chave: Periodontite crônica. Imunidade inata. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. Raspagem dentária. Queratinócitos.

Gutierrez LS. Immunomodulatory role of beta-defensins in the inflammatory response in periodontal tissues [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory disease, caused by bacteria, which causes the destruction of tooth-supporting tissues. Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of the innate immune response and one of the main defense mechanisms of the gingival sulcus, exhibiting antimicrobial activity against a broad spectrum of Gram-negative and positive bacteria, fungi and viruses, in addition to regular early inflammatory events and increase adaptive immunity. The defensins, beta (HBD) and alpha-defensins, are the predominant AMPs in humans. Previous studies have shown that there is a difference in the regulation of these peptides in healthy and periodontal disease sites. Thus, the objectives of this study were: (1) to evaluate the effect of non-surgical periodontal treatment (NCPT) on the levels of HBD-1, 2 and 3 in the gingival crevicular fluid (GCF) of systemically healthy patients with periodontitis, (2) investigate the impact of stimulation with HBD-2 in epithelial cells on the expression of IL-8, CCL20 and their receptors CXCR1, CXCR2 and CCR6. For the clinical study, 22 patients with good general health were selected, with stage III or IV periodontitis, grade B. These patients presented at least 4 sites with probing depth (PD) ≥ 4 mm, bleeding on probing (BOP) and clinical attachment level (CAL) ≥ 4 mm in different quadrants. The following clinical parameters were evaluated: visible plaque index (PI), gingival bleeding index (BI), PD, BOP and CAL. One week after the clinical examination, GCF was collected from two periodontally healthy sites, two with moderate attachment loss (PD = 4-5 mm, PD and CAL ≥ 4 mm) and two with advanced attachment loss (PD ≥ 6 mm, BOP and CAL ≥ 6 mm). Next, non-surgical periodontal treatment was performed, by a single operator, using scaling and root planing (SRP). One month after the end of the NCPT, new GCF collections were carried out from selected sites and clinical parameters were reassessed. Quantification of HBD levels in the GCF was performed using the sandwich ELISA technique. For the in vitro study, keratinocytes were stimulated with two different doses of HBD-2 and then the levels of inflammatory mediators and their receptors were detected in terms of gene expression using the real-time RT-qPCR technique and protein quantification was determined by the sandwich ELISA assay. Data from both studies were tabulated and the analyzes obtained were performed. In the clinical study, HBD-1 levels were significantly higher in GCF after periodontal treatment compared to baseline values. For HBD-2 and 3, differences in pre- and post-treatment levels were not blocked. In in vitro experiments, stimulation with HBD-2 significantly increased the gene expression of IL-8, CCL20 and their receptors CXCR1, CXCR2 and CCR6 in keratinocytes. These results confirm that HBDs may have an immunomodulatory effect on the etiopathogenesis of periodontitis.

Keywords: Chronic periodontitis. Immunity, innate. Antimicrobial cationic peptides. Dental scaling. Keratinocytes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.a. - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CCL20- C-C motif chemokine ligand 20

CCR6- C-C motif chemokine receptor 6

CXCR1- C-X-C motif chemokine receptor 1

CXCR2- C-X-C motif chemokine receptor 2

F.a. - *Filifactor alocis*

FCG - fluido crevicular gengival

Gapdh- Gliceraldeído- A 3-fosfato desidrogenase

hBDs-1, 2 e 3 - expressão gênica das beta-defensinas 1, 2 e 3

HBD-1, 2 e 3 - beta defensina 1, 2 e 3

HNPs - alfa defensinas

IL-8 - interleucina-8

IPV - índice de placa visível

ISG - índice de sangramento gengival

NCI - nível clínico de inserção

PAMs - peptídeos antimicrobianos

PBS- Tampão fosfato-salino

P.g. - *Porphyromonas gingivalis*

PS - profundidade de sondagem

RAR - raspagem e alisamento radicular

SS - sangramento a sondagem

T.d. - *Treponema denticola*

SUMÁRIO

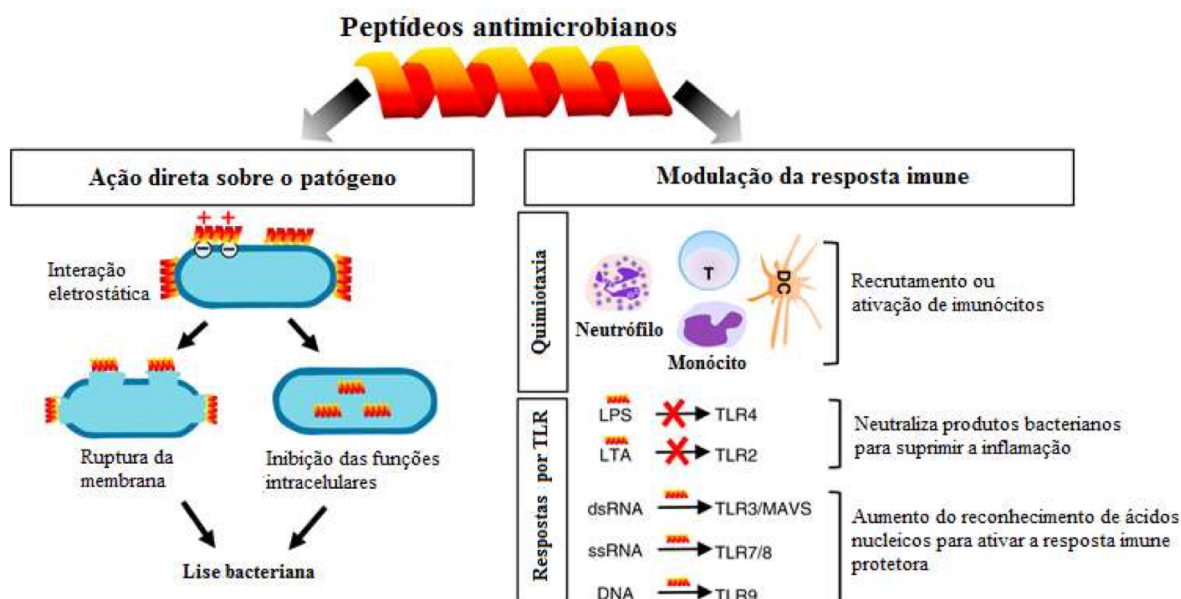
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO.....	19
2.1 Publicação 1	19
2.2 Publicação 2	19
3 PUBLICAÇÕES.....	20
3.1 Publicação 1	20
3.2 Publicação 2	39
4 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A.....	62
APÊNDICE B.....	72
ANEXO A.....	74

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é caracterizada de forma clássica pela destruição progressiva dos tecidos moles e duros do complexo periodontal, mediada por uma interação entre comunidades microbianas disbióticas e respostas imunológicas nos tecidos periodontais. Para que haja o seu desenvolvimento, além da presença microbiana, é necessária uma sucessão de eventos do sistema imune inato e adquirido do indivíduo, sendo os peptídeos antimicrobianos (PAMs) um dos principais mecanismos de defesa no sulco gengival¹⁻⁵.

O epitélio oral, além de atuar como uma barreira física contra microrganismos patogênicos, contribui ao sistema imune inato com a produção dos PAMs. Como o epitélio oral representa uma via de contato direto com o meio externo, ele está constantemente colonizado por microrganismos (como o lúmen intestinal e a pele), desde a primeira infância. Porém, das centenas de espécies microbianas presentes, um número relativamente pequeno é implicado como causador das patologias mais comuns da cavidade bucal: cárie e doenças periodontais. Devido a esta constante colonização por microrganismos com suas toxinas e produtos do metabolismo, a imunidade inata na mucosa oral está sempre em estado de ativação e deve diferenciar as espécies 'nocivas' (associadas a patologias) de espécies comensais (não associadas a patologias) para evitar uma superativação da resposta imune que causaria danos ao próprio hospedeiro⁶. Além do efeito antimicrobiano direto, os PAMs apresentam um importante efeito imunomodulador. Eles são quimioatraentes para células fagocitárias, induzem mediadores inflamatórios e degranulação de mastócitos, auxiliam o reconhecimento de produtos bacterianos (LPS e ácido nucleico) pelos receptores do tipo Toll, regulam eventos inflamatórios iniciais e aumentam a imunidade adaptativa⁶. Dessa forma, os PAMs são importantes para a manutenção do balanço entre saúde e doença no complexo ambiente da cavidade bucal. A Figura 1 resume os principais efeitos biológicos dos PAMs que justificam sua potente atividade antibacteriana.

Figura 1- Principais mecanismos de ação antibacteriana dos PAMs



Fonte: De Lima et al.

As defensinas, beta (HBDs) e alfa-defensinas (HNPs), e a catelicidina LL-37 são os peptídeos predominantes em humanos^{10,11}. Dentre as HBDs existentes, a regulação das HBD-1, 2 e 3 tem sido bastante investigada na cavidade bucal, tanto a nível proteico como a expressão gênica.³ As hBDs foram identificadas nas membranas celulares de todas as células epiteliais^{7,8}. Nos tecidos periodontais, as hBDs 1, 2 e 3 estão expressas principalmente em queratinócitos⁹⁻¹¹, sendo estes peptídeos já identificados no fluido crevicular gengival (FCG) e na saliva⁹. Nenhuma hBD foi localizada no tecido conjuntivo ou no epitélio juncional^{9,12}. As hBD-1 e 2 apresentam uma expressão concentrada nas camadas superficiais espinhosa e granulosa do epitélio^{7,12}, enquanto níveis proteicos de HBD-3 foram localizados principalmente na camada basal do epitélio gengival¹³. A HBD-3 também foi detectada em células de Langerhans e de Merkel⁹.

Nos tecidos gengivais clinicamente saudáveis, as hBDs 2 e 3 estão presentes em um nível de expressão contínuo^{14,15}, diferentemente de outros tecidos epiteliais em que as mesmas são expressas somente na presença de infecção ou inflamação¹⁶⁻¹⁸. É possível que isso aconteça principalmente devido à interação constante do epitélio bucal com microrganismos comensais, bem como por condições imunoinflamatória¹⁹. Na presença de inflamação, o padrão de expressão destes peptídeos no tecido gengival é semelhante; porém, a expressão de hBD-2 se estende

sobre a camada basal e a de hBD-3, sobre as camadas superficiais^{12,13}. Além disso, ocorrem alterações nos níveis proteicos destes peptídeos. No entanto, os resultados encontrados na literatura são bastante divergentes^{14,15,20-23}. Os diversos mecanismos envolvidos na indução das HBDs podem ser uma explicação para essa variação em suas concentrações.

Foi demonstrado que mediadores inflamatórios apresentam a capacidade de induzir a expressão das hBDs¹⁶. Outro fator indutivo demonstrado é a interação entre as HBDs e patógenos ou produtos de patógenos¹⁹. Estudos *in vitro* mostraram que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* foram capazes de estimular a expressão das hBDs^{19,24}. Além disso, foi observado que o nível de indução se relaciona com o tipo do microrganismo e com o tipo da HBD, e que esta indução é variável conforme as cepas utilizadas¹⁰. 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 tecidual²⁵. Desse modo, esses mecanismos de atuação podem ser divididos em dois principais: atividade antimicrobiana direta e atividade imunomodulatória.

Durante a atividade antimicrobiana direta ocorre formação de poros através da ligação à membrana bacteriana resultando no 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 (-)²⁶. Existem três modelos principais para a formação de poros transmembranares mediados pela defensina: modelos ripas de barril (barril-stave), poro toroidal e tapete. O modelo barril-stave, que serve como protótipo para a formação de poros transmembrana mediados pela defensina, foi o primeiro mecanismo proposto para permeabilização. Nesse modelo, as defensinas servem como aduelas que se inserem verticalmente na bicamada fosfolipídica, produzindo estruturas semelhantes a barris. O segundo modelo, de poro toroidal representa a inserção de defensinas na membrana, causando uma curvatura consistente da monocamada fosfolipídica da porção superior para a porção inferior. No modelo de tapete, a ruptura da membrana induzida por peptídeos é semelhante à ação do tipo detergente²⁷. Os modelos de destruição da membrana, apesar de consolidados, não explicam o mecanismo completo utilizado pelas defensinas para a morte bacteriana,

o que torna provável a existência de outros mecanismos envolvidos. Recentemente, foi descoberto que, em um ambiente ácido, como ocorre em uma inflamação, as ligações dissulfeto características das defensinas sofrem rompimento, tornando-as suscetíveis à degradação por proteases. Este processo libera novos fragmentos peptídicos antimicrobianos que melhoram o repertório antimicrobiano e podem, portanto, ser uma característica evolutiva que permite ao hospedeiro montar uma resposta eficaz de amplo espectro contra patógenos invasores com recursos mínimos²⁷.

A atividade direta das defensinas na regulação da resposta imune antibacteriana não é o único papel essencial das mesmas na regulação da homeostase imunológica do hospedeiro^{28,29}. Especificamente, elas também modulam a resposta imune inata e adaptativa²⁵. Dentre as atividades imunomodulatórias, as HBDs apresentam atividade anti-inflamatória, sendo a HBD-3 a defensina que mais se destaca por apresentar potentes propriedades na resposta imune da doença periodontal como: (1) redução de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, e MMP-9) em um modelo de periodontite em camundongos³⁰; (2) redução da diferenciação de osteoclastos e da perda óssea em modelo de periodontite induzida em ratos³⁰; (3) promoção da adesão e proliferação de fibroblastos em superfícies radiculares acometidas pela periodontite³¹; e (4) promoção da proliferação e migração de queratinócitos pela ativação de IL-8, IL-18 e IL-20³¹. Porém, assim como o potencial antimicrobiano das HBDs é variável de acordo com sua conformação estrutural³², a atividade imunomodulatória das defensinas também é variável, exibindo propriedades como: (1) ativação e quimiotaxia para células de defesa (HBD-1, 2 e 3)^{33,34}; (2) indução da osteoclastogênese via RANKL (HBD-1)³⁵; (3) ativação e degranulação de mastócitos (HBD-2)³⁶; e (4) inibição da autofagia em macrófagos (HBD-2 e 3)^{37,38}. Entretanto, o envolvimento das defensinas na regulação imunológica é complexo e o seu papel vai muito além de simplesmente atuar como imunomoduladores através de um receptor singular ou sinalização linear dentro do sistema imunológico. Sugere-se que as defensinas exerçam seus efeitos principalmente interagindo ou ativando vários receptores extracelulares e intracelulares²⁷. Foi demonstrado que a HBD-2 é quimioatraente para células T e células dendríticas, através do receptor CCR6^{33,39}. As HBDs também regularam positivamente a expressão gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias essenciais para a imunidade adaptativa em queratinócitos⁴⁰. Além disso, foi observado

em outro estudo, que HBD-2 é um quimioatraente específico para neutrófilos humanos tratados com fator de necrose tumoral (TNF); A via da proteína G-PLC está envolvida nessa migração de neutrófilos⁴¹. Também foi verificado um aumento da secreção de IL-18 por queratinócitos estimulados com HBDs e LL-37⁴². Estes achados indicam que as defensinas podem regular a resposta imune adquirida e a expressão de marcadores inflamatórios⁴².

Como já dito anteriormente, a regulação das HBDs pode sofrer alterações em resposta às condições de saúde ou doença nos tecidos periodontais. Estudos clínicos prévios indicam uma possível associação entre a expressão destes peptídeos antimicrobianos e condições clínicas do periodonto. Na avaliação de biópsias gengivais, foi verificada uma menor expressão de mRNAs de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 no tecido gengival de pacientes com periodontite do que nas biópsias de tecido gengival de pacientes periodontalmente saudáveis^{12,14}. Lu Q. et al.¹² compararam os níveis de expressão de hBD-1 e hBD-2 em tecido epitelial de bolsas periodontais e tecidos gengivais clinicamente saudáveis adjacentes do mesmo indivíduo. Foi observado que ambas as defensinas estavam expressas em um nível mais elevado no epitélio da bolsa do que no epitélio gengival saudável adjacente. Por outro lado, Vardar-Sengul et al.²¹ observaram diferenças na expressão de hBD-1 e 2 no tecido gengival de pacientes com diferentes tipos de doença periodontal: gengivite, periodontite agressiva e periodontite crônica. A expressão de hBD-1 e 2 foi menor nos tecidos gengivais de pacientes com gengivite do que nos tecidos de pacientes periodontalmente saudáveis. Em pacientes com periodontite agressiva, uma menor expressão de hBD-1 e uma maior expressão hBD-2 foi detectada em comparação com os controles saudáveis. No entanto, pacientes com periodontite crônica apresentaram níveis mais elevados de hBD-1 em comparação com pacientes saudáveis²¹. Brancatisano et al.²⁰, por sua vez, identificaram uma expressão significativamente maior de hBD-2 no tecido gengival de indivíduos periodontalmente saudáveis em comparação com tecidos clinicamente saudáveis de pacientes com periodontite crônica²⁰.

Estudos prévios também avaliaram os níveis proteicos das HBDs no FCG. Costa et al.⁴³ observaram níveis mais elevados de HBD-1 no FCG de indivíduos periodontalmente saudáveis quando comparados a indivíduos com periodontite crônica, sugerindo um potencial papel protetor do HBD-1 na suscetibilidade à periodontite crônica. Foi demonstrado que a HBD-3 está presente em níveis

facilmente detectáveis na maioria dos indivíduos saudáveis, mas é drasticamente reduzida no FCG de indivíduos com periodontite, além de estar inversamente correlacionada com a severidade da doença e o grau de colonização de espécies bacterianas com elevado potencial periodontopatogênico²⁰. Em relação à HBD-2, níveis significativamente mais elevados deste peptídeo foram encontrados no FCG de indivíduos com periodontite em comparação com indivíduos sem doença periodontal. Porém, os níveis séricos de HBD-2 foram menores nos pacientes com periodontite⁴⁴. Por outro lado, Pereira et al.⁴⁵ verificaram maiores níveis de HBD-2 e HBD-3 no FCG de pacientes com periodontite do que nos pacientes periodontalmente saudáveis.

A terapia periodontal não-cirúrgica por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR) é o tratamento padrão ouro para a maioria dos pacientes com periodontite e tem como objetivo principal controlar a infecção microbiana periodontal, removendo biofilme bacteriano, cálculos e toxinas das superfícies radiculares periodontalmente envolvidas⁴⁶. Alguns estudos avaliaram uma possível alteração nos níveis dos PAMs após tratamento periodontal não-cirúrgico. Türkoglu et al.² avaliaram os níveis de LL-37 no GCF de pacientes com periodontite crônica fumantes e não fumantes antes e após tratamento periodontal não-cirúrgico. Diminuições significativas na quantidade total de LL-37 foram observadas na primeira semana, um e três meses após o tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes não fumantes com periodontite crônica. Contudo, em pacientes fumantes, o tratamento periodontal não-cirúrgico não foi eficaz na redução dos níveis de LL-37. Madruga et al.⁴⁷ observaram uma redução nos níveis de LL-37 e IL-6, embora de forma não significativa, 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal não-cirúrgico, tanto no grupo de pacientes com periodontite estágio I-II como no grupo de pacientes com estágio III-IV. Entretanto, para IL-4 e IL-10, os níveis permaneceram inalterados após a RAR. Dolińska et al.⁴⁸ verificaram os níveis de HNP 1-3 no FCG de pacientes com periodontite crônica antes e após tratamento periodontal. Neste estudo, os pacientes foram submetidos ao procedimento de RAR associado ao uso de antibioticoterapia sistêmica (Amoxicilina + metronidazol). Um aumento significativo nos níveis de HNP 1-3 foi observado 3 e 6 meses após o término do tratamento periodontal.

Há uma hipótese de que uma combinação específica de PAMs pode ser essencial para manter a saúde bucal e que qualquer alteração nessa combinação pode resultar em um desequilíbrio na resposta imune inata⁴⁹. Esse desequilíbrio pode desempenhar um papel crucial nos mecanismos, ainda não totalmente

compreendidos que estão envolvidos no início e no desenvolvimento das doenças periodontais⁵⁰⁻⁵³.

Uma compreensão mais aprofundada da regulação dos PAMs nos tecidos periodontais é, portanto, de grande importância e pode abrir caminho para o desenvolvimento de novas abordagens preventivas, diagnósticas e terapêuticas para as doenças periodontais. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico nos níveis de HBD-1, 2 e 3 no FCG de pacientes com periodontite, além de avaliar o possível mecanismo imunoregulador da HBD-2 sobre marcadores importantes no processo inflamatório na doença periodontal.

4 CONCLUSÃO

Baseado nos limites do presente estudo, pode-se concluir que o tratamento periodontal não-cirúrgico teve impacto positivo sobre a regulação de HBD-1 no FCG de pacientes com periodontite, aumentando significativamente os seus níveis tanto nos sítios sem doença periodontal como nos sítios com sinais clínicos da doença. Além disso, a HBD-2 aumentou a expressão de marcadores importantes no processo inflamatório, incluindo IL-8, CCL20 e seus receptores CXCR1, CXCR2 e CCR6, pelas células epiteliais. Estes resultados sugerem que as defensinas podem ter um papel imunomodulador na resposta inflamatória nos tecidos periodontais.

REFERÊNCIAS*

1. Türkoğlu O, Emingil G, Kütükçüler N, Atilla G. Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009; 80(6): 969-76.
2. Türkoğlu O, Eren G, Emingil G, Azarsız E, Kutukculer N, Atilla G. Does smoking affect gingival crevicular fluid LL-37 levels following non-surgical periodontal treatment in chronic periodontitis? *Arch Oral Biol*. 2016; 61: 98-105.
3. Ertugrul AS, Dikilitas A, Sahin H, Alpaslan N, Bozoglan A, Tekin Y. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensins 1 and 3 in subjects with periodontitis and/or type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *J Periodontal Res*. 2013; 48(4): 475- 82.
4. Ertugrul AS, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan NZ, Bozoğlan A, Tekin Y. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin-2 and cathelicidin in smoker and non-smoker patients: a cross-sectional study. *J Periodontal Res*. 2014; 49(3): 282-9.
5. 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 systematicreview. *J Periodontal Res*. 2018; 53(2): 145-55.
6. Komatsuzawa H, Ouhara K, Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, Shiba H et al. Susceptibility of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to defensins and potential therapeutic use of defensins in oral diseases. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(30): 3084-95.
7. 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.
8. Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol*. 2005; 42(9): 1073-84.
9. Lu Q, Samaranayake LP, Darveau RP, Jin L. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. *J Periodontal Res*. 2005; 40(6): 474-81.
10. Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quirynen M, Cassiman JJ, Cuppens H. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. *J Periodontol*. 2005; 76(8): 1293-303.

* 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>

11. Li X, Duan D, Yang J, Wang P, Han B, Zhao L et al. The expression of human β -defensins (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4) in gingival epithelia. *Arch Oral Biol.* 2016; 66: 15-21.
12. 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.
13. Yılmaz D, Güncü GN, Könönen E, Barış E, Çağlayan F, Gursoy UK. Overexpressions of hBD-2, hBD-3, and hCAP18/LL-37 in Gingiva of Diabetics with Periodontitis. *Immunobiology.* 2015; 220(11): 1219-26.
14. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(5): 278–85.
15. Dommisch H, Açıl Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(3): 186-90.
16. 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.
17. Lehmann J, Retz M, Harder J, Krams M, Kellner U, Hartmann J et al. Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infect Dis.* 2002; 2: 20.
18. Liu J, Chen J, Du X, Hu L, Chen L. The expression of hBDs in the gingival tissue and keratinocytes from healthy subjects and periodontitis patients. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(2): 193-8.
19. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun.* 1998; 66(9): 4222-8.
20. Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M, et al. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res.* 2011; 90(2): 241–5.
21. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodont Res.* 2007; 42: 429-437.
22. Pereira AL, Franco GC, Cortelli SC, Aquino DR, Costa FO, Raslan SA et al. Influence of periodontal status and periodontopathogens on levels of oral human β -defensin-2 in saliva. *J Periodontol.* 2013; 84(10): 1445-53.
23. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GC, Cortelli SC, Cortelli JR. Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(12): 1609-14.

24. 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.
25. 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.
26. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 181-215.
27. Fu J, Zong X, Jin M, Min J, Wang F, Wang Y. Mechanisms and regulation of defensins in host defense. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8(1): 300.
28. Ehmann D, Wendler J, Koeninger L, Larsen IS, Klag T, Berger J et al. Paneth cell α -defensins HD-5 and HD-6 display differential degradation into active antimicrobial fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019; 116(9): 3746-3751.
29. Park OJ, Kim J, Ahn KB, Lee JY, Park YJ, Kum KY 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).* 2017; 95(12): 1315-1325.
30. Cui D, Lyu J, Li H, Lei L, Bian T, Li L et al. Human β -defensin 3 inhibits periodontitis development by suppressing inflammatory responses in macrophages. *Mol Immunol.* 2017; 91: 65-74.
31. Wang H, Watanabe H, Ogita M, Ichinose S, Izumi Y. Effect of human beta-defensin-3 on the proliferation of fibroblasts on periodontally involved root surfaces. *Peptides.* 2011; 32(5): 888-94.
32. Schroeder, B. O. et al. Antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature.* 2011; 469 (7330): 419–423, .
33. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 1999; 286(5439): 525-8.
34. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadhowsky J, Harding CV 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.* 2007; 104(47): 18631-5.
35. Makeudom A, Supanchart C, Montreekachon P, Khongkhunthian S, Sastraruji T, Krisanaprakornkit et al. The antimicrobial peptide, human β -defensin-1, potentiates in vitro osteoclastogenesis via activation of the p44/42 mitogen-activated protein kinases. *Peptides.* 2017; 95:33-39.

36. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. 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*. 2001; 31(4): 1066-75.
37. Wu Y, Li D, Wang Y, Liu X, Zhang Y, Qu W 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*. 2018; 9: 211.
38. Pereira A. G. Níveis de beta-defensinas no fluido crevicular em indivíduos com periodontite crônica e diabetes tipo 2. 2018. Dissertação de mestrado. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *CytokineGrowth Factor Rev*. 2003; 14(5): 409-26.
39. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *CytokineGrowth Factor Rev*. 2003; 14(5): 409-26.
40. Niyonsaba, F, Ushio, H, Nagaoka, I, Okumura, K, Ogawa, H. The human b-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol* 175, 1776–1784.
41. Niyonsaba, F., Ogawa, H. & Nagaoka, I. (2004). Human b-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor- α -treated human neutrophils. *Immunology* 111, 273–281.
42. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014; 10(5): 593-619.
43. Costa LCM, Soldati KR, Fonseca DC, Costa JE, Abreu MHNG, Costa FO et al. Gingival crevicular fluid levels of human beta- defensin 1 in individuals with and without chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2018; 53(5): 736-742.
44. Öztürk A, Kurt-Bayrakdar S, Avci B. Comparison of gingival crevicular fluid and serum human beta-defensin-2 levels between periodontal health and disease. *Oral Dis*. 2021; 27(4): 993-1000.
45. Pereira AG, Costa LCM, Soldati KR, et al. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin 2 and 3 in healthy and diseased sites of individuals with and without periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 2020; 22(3): 90-99.
46. Aimetti M. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Esthet Dent*. 2014; 9(2): 251-67.
47. Madruga D, Garcia MM, Martino L, Hassan H, Elayat G, Ghali L et al. Positive correlational shift between crevicular antimicrobial peptide LL-37, pain and periodontal status following non-surgical periodontal therapy. A pilot study. *BMC Oral Health*. 2023; 28;23(1): 335.

48. Dolińska E, Skurska A, Pietruska M, Dymicka-Piekarska V, Milewski R, Pietruski J, et al. The Effect of Nonsurgical Periodontal Therapy on HNP1-3 Level in Gingival Crevicular Fluid of Chronic Periodontitis Patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017; 65(4): 355-361.
49. Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet*. 2002; 360(9340):1116–7.
50. Putsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet*. 2002; 360(9340): 1144–9.
51. Eick S, Puklo M, Adamowicz K, Kantyka T, Hiemstra P, Stennicke H et al. Lack of cathelicidin processing in Papillon-Lefèvre syndrome patients reveals essential role of LL-37 in periodontal homeostasis. *Orphanet J Rare Dis*. 2014; 9:148.
52. Karlsson J, Carlsson G, Ramme KG, Hagglund H, Fadeel B, Nordenskjöld M et al. Low plasma levels of the protein pro-LL-37 as an early indication of severe disease in patients with chronic neutropenia. *British journal of haematology*. 2007; 137(2): 166–9.
53. Moreno-Navarrete JM, Fernandez-Real JM. Antimicrobial-Sensing Proteins in Obesity and Type 2 Diabetes: The buffering efficiency hypothesis. *Diabetes Care*. 2011; 34(Supplement_2): S335–41.