



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 resposta 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 regularem 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) \geq 4 mm, sangramento à sondagem (SS) e nível clínico de inserção (NCI) \geq 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 \geq 4 mm) e dois com perda de inserção avançada (PS \geq 6 mm, SS e NCI \geq 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- Gliceraldeido- 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

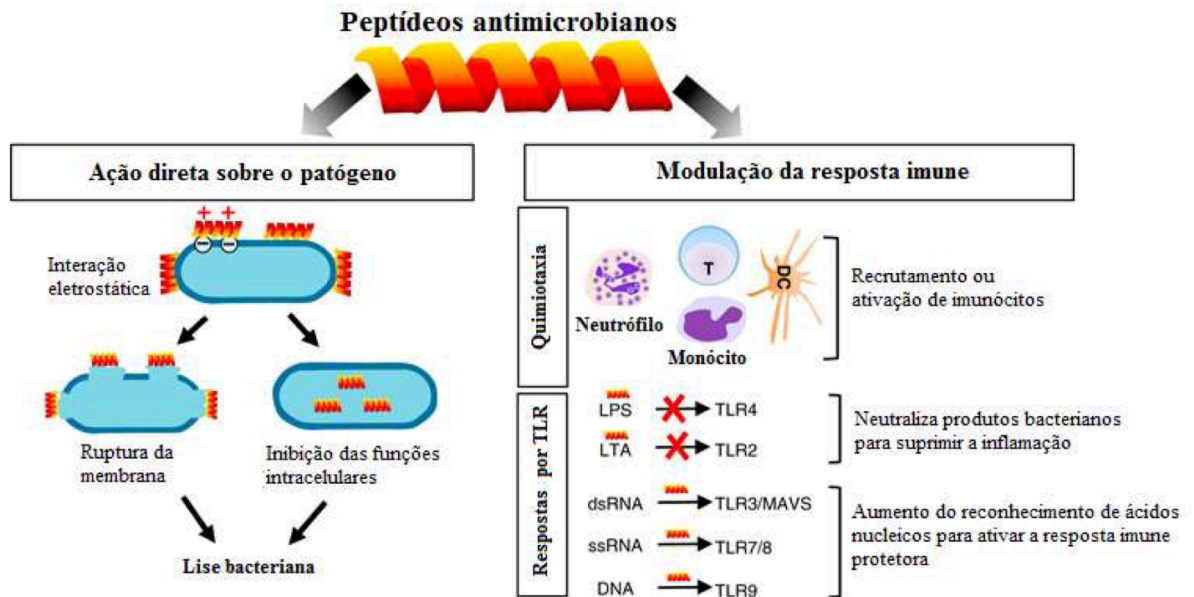
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO.....	19
2.1 Publicação 1	19
2.2 Publicação 2.....	19
3 PUBLICAÇÕES.....	20
3.1 Publicação 1	20
3.2 Publicação 2.....	39
4 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A.....	62
APÊNDICE B.....	72
ANEXO A.....	74

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.

2 PROPOSIÇÃO

Este projeto foi dividido em duas publicações.

2.1 Publicação 1

Avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre os níveis das HBD-1, 2 e 3 no FCG de pacientes sistemicamente saudáveis portadores de periodontite. A hipótese nula do estudo é que os níveis das HBDs no FCG seriam semelhantes antes e após tratamento periodontal.

2.2 Publicação 2

Avaliar o efeito modulador do HBD-2 na indução da resposta inflamatória em queratinócitos, incluindo a expressão de IL-8 e CCL20 e seus receptores CXCR1, CXCR2 e CCR6. A hipótese nula do estudo é que a HBD-2 não teria efeito regulador sobre a expressão de IL-8 e CCL20 e seus respectivos receptores por queratinócitos.

3 PUBLICAÇÕES

Os resultados deste estudo foram apresentados na forma de dois artigos científicos, informados a seguir.

3.1 Publicação 1*

Non-surgical periodontal treatment affects the gingival crevicular fluid levels of HBD-1 but not of HBD2 and 3 in periodontitis patients

Lorena S. Gutierrez¹, Fernando Afonso de Oliveira¹, Daniela Leal Zandim-Barcelos¹

1-Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, UNESP, Araraquara, 14.801-385, Brazil.

*Correspondence: daniela.zandim-barcelos@unesp.br

Abstract

Objectives: This prospective study aimed to evaluate the effect of non-surgical periodontal treatment on HBD-1, 2, and 3 levels in the gingival crevicular fluid (GCF) of patients with periodontitis. **Materials and Methods:** Twenty-two patients systemically health and periodontitis stage III or IV, grade B were included in this study. These patients had a minimum of 15 teeth and at least 4 sites with probing depth (PD) ≥ 4 mm, bleeding on probing (BOP), and clinical attachment level (CAL) ≥ 4 mm in different quadrants. Initially, the following clinical parameters were evaluated: visible plaque index (PI), gingival bleeding index (GI), PD, BOP and CAL. One day after the clinical examination, GCF was collected from the two healthy sites (no gingival inflammation, PD ≤ 3 mm, no BOP) and four sites with clinical signs of periodontitis, two sites with moderate insertion loss (PD= 4-5 and CAL ≥ 4 mm mm and BOP) and two sites with moderate insertion loss (PD and CAL ≥ 6 mm and BOP). One month after completion of non-surgical periodontal treatment (NSPT), GCF collection and periodontal parameters were assessed. HBDs levels were analyzed by ELISA. **Results:** Higher levels of HBD-1 were observed in healthy sites than in diseased sites at baseline and a significant Increase in HBD-1 levels was observed in both sites after periodontal

* Este artigo segue as normas de publicação do periódico Clinical Oral Investigations, para o qual pretende-se submetê-lo.

treatment. Conclusions: The non- surgical periodontal treatment had a significant impact on the HBD-1 levels in the GCF of patients with periodontitis. Clinical Relevance:

Keywords: Cationic antimicrobial peptides. beta-Defensins. Periodontitis. Dental Scaling.

Introduction

Periodontitis is a multifactorial inflammatory disease characterized by the progressive destruction of tooth supporting tissues [1-3]. It is primarily caused by dental plaque biofilm; however, a succession of events from the individual's innate and acquired immune systems are necessary for its development. The antimicrobial peptides (AMPs) are important components of the innate immune system and represent one of the main defense mechanisms in the gingival sulcus [4-8].

AMPs have an antimicrobial activity against a broad spectrum Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungus and viruses. In addition to the direct antimicrobial effect, these peptides have an important immunomodulatory effect. They enhance the adaptive immune system by chemotaxis of monocytes, T-lymphocytes, dendritic cells and mast cells to the infection site, induce inflammatory mediators and mast cell degranulation, help the recognition of bacterial products (LPS and nucleic acid) by Toll-like receptors, regulate initial inflammatory events [9]. Therefore, AMPs are important for maintaining the balance between health and disease in the complex environment of the oral cavity [10].

Beta-defensins are small cationic AMPs mainly produced by epithelial cells. The local dysregulation of these peptides may be involved in the initiation and progression of periodontal diseases [11-14].

Previous studies have evaluated the protein levels of HBDs in GCF. Costa et al. [15] observed higher levels of HBD-1 in the GCF of periodontally healthy individuals when compared to individuals with chronic periodontitis, suggesting a potential protective role of HBD-1 in susceptibility to chronic periodontitis. It has been demonstrated that HBD-3 is present at easily detectable levels in most healthy individuals, but is drastically reduced in the GCF of individuals with periodontitis, in addition to being inversely correlated with the severity of the disease and the degree of colonization of bacterial species with high periodontopathogenic potential [16]. Regarding HBD-2, significantly higher levels of this peptide were found in the GCF of

individuals with periodontitis compared to periodontally healthy individuals. However, serum HBD-2 levels were lower in patients with periodontitis [17]. On the other hand, Pereira et al. [18] found higher levels of HBD-2 and HBD-3 in the GCF of patients with periodontitis than in periodontally healthy patients.

Many authors have also observed variation in gene expression of HBDs. In an evaluation of gingival biopsies, it was found that there was a lower expression of hBD-1, hBD-2 and hBD-3 mRNAs in the gingival tissue of patients with periodontitis than in the gingival tissue biopsies of periodontally healthy patients [19-20]. Lu Q. et al. [20] compared the expression levels of hBD-1 and hBD-2 in bursa tissues and adjacent clinically healthy tissues from the same individual. They observed that both defensins were expressed at a higher level in the pocket epithelium than in the adjacent healthy gingival epithelium. On the other hand, Vardar-Sengul et al.²¹ observed differences in the expression of hBD-1 and 2 in the gingival tissue of patients with different types of periodontal disease: gingivitis, aggressive periodontitis and chronic periodontitis. The expression of hBD-1 and 2 was lower in the gingival tissues of patients with gingivitis than in the tissues of periodontally healthy patients. In patients with aggressive periodontitis, lower hBD-1 expression and higher hBD-2 expression were detected compared to healthy controls. However, patients with chronic periodontitis had higher levels of hBD-1 compared to healthy patients [21]. Brancatisano et al. [16] in turn, identified a significantly higher expression of hBD-2 in the gingival tissue of periodontally healthy individuals compared to clinically healthy tissues of patients with chronic periodontitis.

Since bacterial infection is the essential etiological factor for periodontal disease, its elimination through periodontal treatment can affect the regulation of AMPs. Some previous studies evaluated the effect of non-surgical periodontal treatment on LL-37 and HNP 1-3 levels in the GCF of patients with periodontitis [22-24]. Contradictory results were observed. Lower levels of LL-37 [22, 25] and higher levels of HNP 1-3 [26] were verified in the GCF after periodontal treatment. For HBDs, a significant reduction in salivary HBD-2 levels was observed after periodontal treatment [25]. The study of Ebrahim [27] showed that, in the group of patients with periodontitis, the frequencies of hBD-1 and hBD-3 mRNA expression increased from 30% to 80% and from 35% to 85%, respectively, after periodontal treatment. For hBD-2, there was a decrease from 85% to 45%. In healthy control subjects, who did not

receive treatment, expression frequencies were 95%, 40% and 95% for hBD-1, 2 and 3, demonstrating a difference compared to periodontitis patients at baseline.

Taking into consideration the controversies in the literature regarding the role of AMPs on the pathogenesis of periodontal disease and the scarce number of studies evaluating the effect of periodontal treatment on AMPs levels, we proposed the present study. Prevention and treatment of periodontal disease may depend on the antibacterial, immunomodulatory and anti-inflammatory properties of AMPs. Considering the multifunctional immune-regulatory activities of HBDs, the aim of the present study was to investigate the effect of non-surgical periodontal treatment on HBDs levels in the GCF of patients with periodontitis. In addition, we evaluated the differential levels of HBD-1, 2 and 3 in health and diseased sites of these patients.

Materials and Methods

Study design

The protocol of this prospective study was approved by the Ethics Committee on Human Research of the School of Dentistry at Araraquara – UNESP (protocol number 96972718.2.0000.5416) and was conducted in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki, revised in 2013.

A total of twenty-two patients of both genders with periodontitis stage III or IV were enrolled in this study. The participants were recruited from September 2018 to June 2021 at the Periodontology Clinic, School of Dentistry at Araraquara – UNESP. Written informed consent was obtained from all subjects.

The diagnosis of periodontitis was performed according to the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions [28]. The inclusion criteria for patients with periodontitis were presence of at least 15 natural teeth and a minimum of four teeth in different quadrants with probing depth (PD) \geq 4 mm, bleeding on probing (BOP) and clinical attachment level (CAL) \geq 4 mm, with the exception of third molars. Individuals with a history of systemic diseases or immunological disorders, currently using hormone replacement therapy, as well as pregnant and lactating women were excluded. Individuals that received periodontal treatment within the last 6 months or with a history of systemic antibiotics and anti-inflammatory drugs within the last 3 months were also excluded.

Sample calculation

Considering that in two previous works found in the literature [5,26], that evaluated the levels of antimicrobial peptides before and after periodontal treatment, the mean and standard deviation values of the data (only median and percentiles), it was not possible to perform the sample calculation “a priori” considering the level of antimicrobial peptide in the FCG as the primary variable of the study. Therefore, the sample size calculation was performed using clinical parameters. Therefore, to perform the sample calculation, a difference of 1.0 mm in the clinical level of insertion and an estimated standard deviation of 1.0 mm were considered clinically relevant. Using a power of 80% to detect this difference, with a significance level of 5%, 16 subjects will be needed for the research. Considering the possibility of withdrawals, or the need to exclude a patient, 20 patients will be selected to carry out this study.

Clinical examination

Full-mouth clinical periodontal parameters, including visible plaque index (PI) [29], gingival bleeding index (GI) [30], PD, BOP and CAL were assessed by a single trained and calibrated examiner. The PI and GI were registered as absence or presence of plaque and gingival bleeding at four sites per tooth (mesial, distal, buccal and lingual) [31], while the PD and CAL were assessed in six sites per tooth (mesio-buccal, mid-buccal, disto-buccal, mesio-lingual, mid-lingual, and disto-lingual), excluding third molars. Measurements were performed with a manual UNC periodontal probe (Hu-Friedy, Chicago, IL). To calibrate the examiner, two full-mouth examinations were carried out on 5 volunteer patients, with an interval of 48 hours between exams. The calibration was accepted after the percentage of agreement between measurements for the PS and NCI parameters was greater than 90%.

All clinical parameters and periodontal treatment were performed by a single operator (LSG). Initially, a full-mouth scaling with dental ultrasound was performed on all teeth with supragingival calculus. Non-surgical periodontal therapy was performed, in sessions divided between hemiarches, depending on the complexity, always starting with the deepest sites. The patient was first anesthetized locally and then scaling and root planing was performed on the sites with periodontal disease. At the end of the scaling and root planing procedure, the teeth were polished with a rubber dam and

prophylactic paste. Patients received oral hygiene instructions, which were reinforced at each session of periodontal treatment. After finishing treatment, patients returned monthly for monitoring and bacterial plaque control for 3 months.

Gingival Crevicular Fluid (GCF) Sampling

GCF samples were collected from six sites of each patient, including two healthy sites (no gingival inflammation, $PD \leq 3$ mm, no BOP or clinical attachment loss) and four diseased sites: two sites with moderate clinical attachment loss ($PD = 4-5$ mm, BOP, $CAL \geq 4$ mm) and two with severe clinical attachment loss ($PD \geq 6$ mm, BOP and $CAL \geq 6$ mm). Sampling sites were selected preferably from non-adjacent teeth. Diseased sites were selected according to the greatest probing depth in each quadrant. A single examiner performed the GCF sampling one week after the periodontal examination.

Before sampling, teeth were isolated with cotton rolls, supragingival plaque was removed with a sterile curette, and the surfaces were gently air-dried. GCF was sampled by inserting strips of absorbent paper (Periopaper[®], Oraflow Inc., New York, USA) into the gingival sulcus or periodontal pocket for 30 seconds. Paper strips contaminated with blood and saliva were rejected. The volume of GCF absorbed in each strip was determined by an electronic device (Periotron 8000 - Periopaper, ProFlow, Inc., Amityville, NY, USA), which was calibrated based on a previously described protocol³² (Periotron 8000 calibration by polynomial regression). At the end of collection, the samples were inserted separately into a dry sterile polypropylene microcentrifuge tube and stored at -80°C until analysis. Periotron 8000 readings were converted to real volume (μL) by reference to a standard curve.

Quantification of HBDs

First, the absorbed GCF was eluted from the paper strip of each tube by adding 150 μL of 1x Phosphate-Buffered Saline (PBS) to each tube. The tubes were left on ice in a horizontal shaker for 30 minutes and then centrifuged at 4°C , 13,000 g for 10 minutes. The GCF levels of HBD-1, 2 and 3 were measured (pg/mL) using sandwich ELISAs kits according to the manufacturer's guidelines (Peprotech, Rocky Hill, NJ,

EUA). The absorbance was measured at 450 nm using a plate reader (VersaMax, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The detection range of HBD-1 was from 7.8 to 500 pg/mL, HBD-2 from 15.62 to 1,000 pg/mL and HBD-3 was from 63 to 4,000 pg/mL. Results are expressed as total amount of peptide/time of sampling in pg/30 seconds.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, USA) and differences were considered significant with a P value <0.05. The normality of data distribution was analyzed using the D'Agostino and Pearson test. For clinical parameters, the paired t test was used to compare parameters with normal distribution and the Wilcoxon test was used to compare parameters with non-normal distribution. As AMPs levels were not normally distributed, the Wilcoxon test was used to detect differences in the levels of each peptide before and after treatment.

Results

Demographics and periodontal parameters

A total of 22 patients with periodontitis stage III or IV, 11 male (50%) and 11 (50%) female were evaluated. The mean age of patients was 50.73 ± 10.10 years. The full-mouth clinical parameters evaluated in the present study are described in table 1 and the clinical parameters of the sampling sites in table 2.

Table 1. Full-mouth clinical periodontal parameters at baseline and post non-surgical periodontal treatment. Data with normal distribution are expressed as mean \pm SD; data with non-normal distribution are expressed as median and 95% CI

Clinical parameters	Initial	Post-treatment
PI (%)	43,95 \pm 15,62 [#]	9,77 \pm 5,06 [#]
GI (%)	32,72 \pm 20,50 [#]	6,74 \pm 5,68 [#]
BOP (%)	54,25 (38,48-54,00)*	10,48 (7,28-13,32)*
PD (mm)	3,43 (3,20-3,58)*	2,80 (2,77-3,09)*
PD \leq 3 mm (%)	67,5 (52,75-78,05)*	84,50 (62,75-85,03)*
PD 4-5 mm (%)	17,50 (14,19-24,50)*	13,50 (9,78-14,70)*
PD \geq 6 mm (%)	7,00 (6,1-11,81)*	3,00 (2,17-7,46)*
CAL (mm)	3,75 (3,60-4,54)	3,42 (3,24-4,13)
CAL \leq 3 mm (%)	20,50 (14,77-27,83)	29,50 (20,66-34,92)
CAL 4-5 mm (%)	42,00 (31,50-45,48)	45,50 (32,71-48,56)
CAL \geq 6 mm (%)	28,00 (22,23-40,38)	18,50 (13,50-31,75)

*Significant difference between groups, unpaired t-test

[#]Significant difference between groups, Wilcoxon test

PI – Plaque index; GI – Gingival index; BOP – Bleeding on probing; PD – Probing depth; CAL – Clinical attachment level.

Table 2. Clinical periodontal parameters of sampling sites. Data are expressed as median and 95% CI

Clinical parameters		Health		Moderate clinical attachment loss		Severe clinical attachment loss	
		Baseline	1 month	Baseline	1 month	Baseline	1 month
HBD-1	PD (mm)	3 (2,5-2,9)	3 (2,3-2,8)	5 (4,5-5,0) [§]	4 (3,2-4,1) [§]	7 (6,7-7,4) [§]	4,5 (3,9-5,5) [§]
	CAL (mm)	3 (2,5-2,9)	3 (2,4-2,9)	5 (4,9-6,2) [#]	4,5 (3,7-5,1) [#]	8 (7,1-8,7) [#]	5,5 (5-7,0) [#]
HBD-2	PD (mm)	3 (2,5-2,9)	3 (2,3-2,8)	5 (4,5-4,9) [§]	3 (2,8-3,6) [§]	7 (6,7-7,8) [§]	5 (4,1-5,9) [§]
	CAL (mm)	3 (2,9-2,5)	3 (2,3-2,8)	5 (4,7-5,8) [#]	3 (3,2-4,4) [#]	7,5 (7,2-9,5) [#]	5,5 (5,0-7,5) [#]
HBD-3	PD (mm)	3 (2,5-2,9)	3 (3,6-2,8)	5 (4,5-4,9) [§]	3 (2,8-3,6) [§]	7 (6,7-7,8) [§]	5 (4,1-5,9) [§]
	CAL (mm)	3 (2,5,2-9)	3 (2,3-2,8)	5 (4,7-5,8) [#]	3 (3,2-4,4) [#]	7,5 (7,2-9,5) [#]	5,5 (5,0-7,5) [#]

Paired t test;

[§] Statistically significant in PD, between the same sites, at different periods

[#] Statistically significant in CAL, between the same sites, at different periods

PD – Probing depth; CAL – Clinical attachment level; PT: Post-treatment.

HBDs quantification

Figure 1 shows the levels of each HBD in the GCF of health and diseased sites (moderate and severe clinical attachment loss) at different time points. Higher levels of HBD-1 were observed in healthy sites than in diseased sites at baseline, but the difference was statistically significant in comparison with the advanced periodontitis group. A significant increase in HBD-1 levels was also observed in health and diseased sites after periodontal treatment (Figure 1A).

The GCF levels of HBD-2 were significantly higher in healthy sites than in diseased sites at baseline. In addition, the diseased sites showed higher levels of HBD-2 after treatment, equaling to the control group, although still without significant difference with their respective initial values. (Figure 1B).

HBD-3 levels were similar in all groups before and after treatment, demonstrating no significant difference between groups, although the group with advanced insertion

loss presented lower mean values than the other groups, suggesting a tendency towards reduction of this peptide. (Figure 1C).

Figures

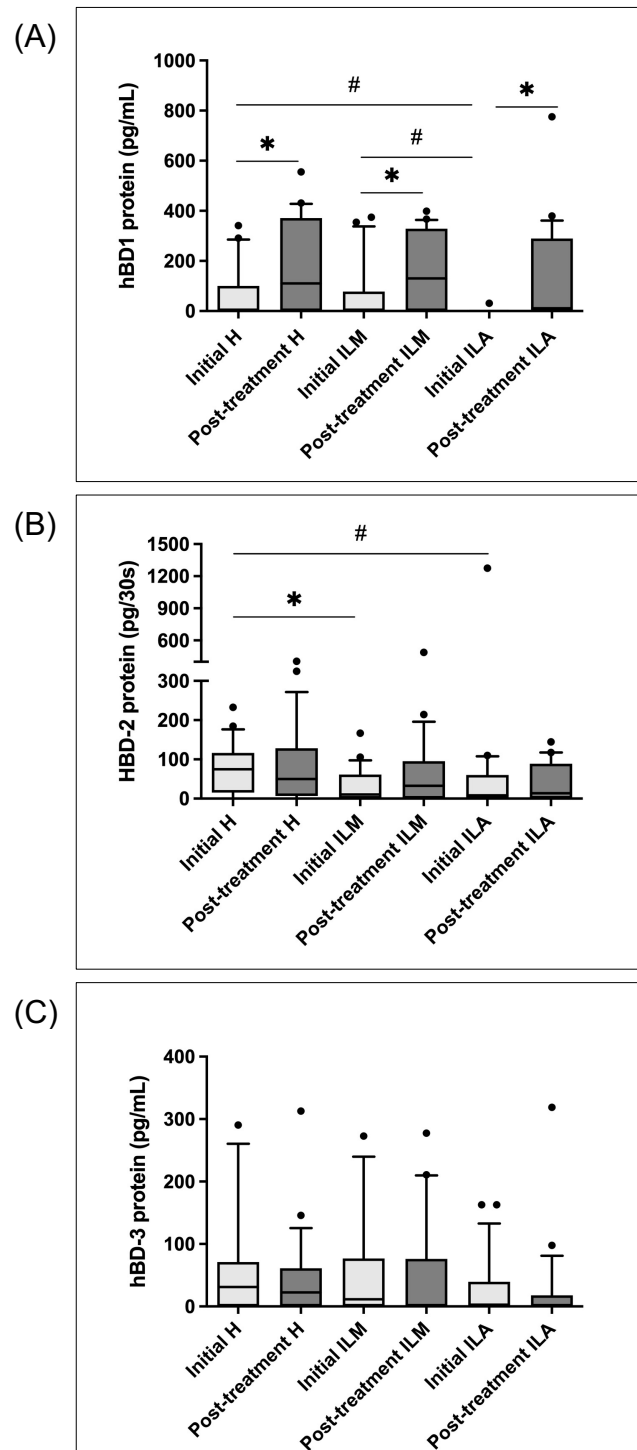


Figure 1- Distribution of HBDs at sites selected for GCF sampling.

H: healthy sites; ILM: sites with moderate insertion loss; ILA: sites with advanced insertion loss

$p < 0.05$: Statistically significant difference between different groups- Kruskal Wallis test.

$p < 0.05$: Statistically significant difference between baseline and post-treatment levels - Wilcoxon test;

Discussion

Our results demonstrated a significant increase in GCF HBD-1 levels after non-surgical periodontal treatment, both for healthy and diseased sites of patients with periodontitis. This up-regulation was also observed, for HBD-2, without statistically significance. On the other hand, a tendency towards reduction in GCF HBD3 levels was verified. Therefore, the null hypothesis of the present study was partially rejected.

Greer et al. [33] proposed that, through its antimicrobial action, the peptide within periodontal tissue may control the accumulation of commensal bacteria and biofilm formation at some level, thereby contributing to periodontal homeostasis. Recent studies have demonstrated that HBD-2 can directly neutralize lipopolysaccharide (LPS) and inhibit the release of inflammatory cytokines such as TNF- α , inducing an anti-inflammatory effect [34]. Lower expression of hBD-2 may impair the host's LPS neutralization capacity and therefore lead to exaggerated host response and periodontal rupture. Furthermore, *in vitro* studies have shown that periodontal pathogens such as *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, and *P. intermedia* [33], or their components, such as gingipain, upregulate hBD-2 expression. Increased hBD-2 expression in gingival tissues may help the host to eliminate periodontal pathogens. The role of HBD-2 is not limited to its antimicrobial action. It also contributes to neutrophil recruitment and links innate and adaptive immune responses by activating local dendritic cells [35].

Non-surgical periodontal therapy is the gold standard treatment for most patients with periodontitis and its main objective is to control periodontal microbial infection by removing bacterial biofilm, calculus and lesions from the periodontally involved root surfaces, through scaling and root planning (SRP) [36]. Our study is the first to evaluate the effect of non-surgical periodontal treatment on HBDs 1, 2 and 3 levels and we were able to observe a significant difference in HBD-1 GCF levels pre- and post-treatment, both in healthy sites and in sites with moderate and advanced insertion loss. However, some studies have evaluated a possible change in other PAMs levels after non-surgical periodontal treatment. Türkoglu et al. [5] evaluated LL-37 levels in the GCF of patients with chronic periodontitis and non-smokers before and after non-surgical periodontal treatment. Significant decreases in the total amount of LL-37 were observed in the first week, one and three months after non-surgical periodontal treatment in non-smoking patients with chronic periodontitis. However, in smoking

patients, non-surgical periodontal treatment was not effective in reducing LL-37 levels. Madruga et al. [37] observed a reduction in LL-37 and IL-6 levels, although not significantly, 4 to 6 weeks after non-surgical periodontal treatment, both in the group of patients with stage I-II periodontitis and as in the group of patients with stage III-IV. However, for IL-4 and IL-10, the levels found are unchanged after RAR. Dolińska et al. [38] verified the levels of HNP 1-3 in the GCF of patients with chronic periodontitis before and after periodontal treatment. In this study, patients underwent the RAR procedure associated with the use of systemic antibiotic therapy (Amoxicillin + metronidazole). A significant increase in HNP 1-3 levels was obtained 3 and 6 months after the end of periodontal treatment.

Costa LCM et al. [15] observed higher levels of HBD-1 in the GCF of periodontally healthy individuals when compared to individuals with chronic periodontitis, suggesting a potential protective role of HBD-1 in susceptibility to chronic periodontitis. They also showed that non-surgical periodontal therapy increases HBD-1 expression in individuals with periodontitis, in healthy and diseased sites, reaching levels similar to healthy sites in healthy patients. Similarly, our study also demonstrated a significant difference in HBD-1 levels in GCF between healthy sites and sites with advanced periodontitis, in the same individual. Furthermore, there was also an increase in these levels in healthy sites and with moderate and advanced insertion loss after non-surgical periodontal treatment.

Previous studies evaluated the HBD-2 levels and expression in relation to periodontal status [20,21,25,39-41]. In the study by Pereira et al. [22], HBD-2 levels in saliva and GCF of individuals periodontally healthy and individuals with periodontitis, in the Brazilian population, were examined. Their data showed that HBD-2 levels in saliva and GCF were higher in periodontitis patients compared to healthy individuals and decreased after periodontal treatment. Similarly, Yong et al. [41] found that in the Chinese population, HBD-2 levels in GCF were higher in patients with periodontitis and gingivitis compared with those in healthy controls. Similar to the higher levels of HBD-2 in periodontitis, higher levels of HBD-2 have been reported in patients with aggressive periodontitis compared to healthy controls [21,41]. On the contrary, our results showed lower HBD-2 levels in diseased sites compared to healthy sites.

Higher levels of HBD-3 were identified in the GCF of patients with periodontitis when compared to periodontally healthy patients [18]. On the other hand, it has been demonstrated that HBD-3 is present at easily detectable levels in most healthy

individuals but is drastically reduced in the GCF of individuals with periodontitis, in addition to being inversely correlated with the severity of the disease and the degree of colonization of bacterial species with high periodontopathogenic potentia [16].

Thus, our finding of decreased levels of both HBD-2 and HBD-3 for the diseased samples and higher HBD-2 and HBD-3 levels in the healthy samples was unexpected. However, while pro-inflammatory mediators are known to induce the expression of defensins, and are most often associated with diseased tissues, are also present in healthy tissues growth factors which have also been shown to induce expression [42]. Additional factors that may impact the expression of beta-defensins in healthy gingival tissue samples (and could also explain the variable basal expression seen among subjects) include the possibility of variable gene copy numbers as recently reported for specific defensins [43]. Another possible explanation would be the degradation of the defensins in disease is possible. For example, HBD-2 and HBD-3 were recently shown to be degraded and inactivated by the cysteine proteases cathepsins B, L, and S [44]. This study suggested that during infection, enhanced expression of cathepsins may increase degradation of HBD-2 and HBD-3, with resulting bacterial colonization and infection [45]. This would support the finding of decreased expression in periodontal diseased tissues. Alternatively, the expression profiles in healthy and diseased tissues may actually reflect down-regulation of the defenses during disease. The contradictory results between studies can also be due to the relatively small number of participants in most studies (about ten samples per group) [25,46], differences in the populations studied and underlying genetic differences, differences in microbial profiles, or different techniques used [47,48]. These findings may reflect variation in the regulation of HBDs levels from patient to patient, however, factors such as medication use or smoking were excluded from the study, so this cannot be a justification for the different levels of AMPs measured and should be examined in future studies.

There was no evidence that any systemic factor influenced the results. Furthermore, there was no evidence of any relationship between HBDs levels and other demographic characteristics, including age and sex. Future studies should include a larger number of subjects, so that such factors can be better evaluated. The results of increased (or decreased) measurement levels of AMPs in the present study do not necessarily correlate with the functional activity of the peptide.

In view of the improvement in clinical parameters and change in pre and post-treatment HBD-1 levels, it can be concluded that non-surgical periodontal treatment

had a positive impact on the regulation of HBD-1 in the GCF of patients with periodontitis, increasing significantly its levels both in sites health or previously diseased.

Acknowledgment

This work was supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) Foundations. We thank the patients for the collaboration.

Conflicts of interest

There is no conflicts of interest.

References

1. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004;34:9-21. doi: 10.1046/j.0906-6713.2002.003421.x.
2. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.
3. Deng ZL, Szafranski SP, Jarek M, Bhujji S, Wagner-Döbler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep*. 2017 Jun 16;7(1):3703. doi: 10.1038/s41598-017-03804-8.
4. 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 Jun;80(6):969-76. doi: 10.1902/jop.2009.080532.
5. 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 Jan;61:98-105. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.10.018.
6. 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. doi: 10.1111/jre.12029.
7. 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. doi: 10.1111/jre.12105.

8. 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.* 2018; 53(2): 145-55. doi: 10.1111/jre.12482. Epub 2017 Oct 8.
9. 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. doi: 10.2174/138161207782110426.
10. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol.* 2005 Jul;7(2):119-33. doi: 10.1093/jac/dki103.
11. 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 May;27(4):993-1000. doi: 10.1111/odi.13597.
12. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med.* 2004 May;33(5):278-85. doi: 10.1111/j.0904-2512.2004.00143.x.
13. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res.* 2001 Oct;36(5):285-94. doi: 10.1034/j.1600-0765.2001.360503.x.
14. Sidharthan S, Dharmarajan G, Kulloli A. Gingival crevicular fluid levels of Interleukin-22 (IL-22) and human β Defensin-2 (hBD-2) in periodontal health and disease: A correlative study. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020 Oct-Dec;10(4):498-503. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.07.021.
15. Costa LCM, Soldati KR, Fonseca DC, Costa JE, Abreu MHNG, Costa FO, Zandim-Barcelos DL, Cota LOM. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin 1 in individuals with and without chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2018 Oct;53(5):736-742. doi: 10.1111/jre.12558.
16. 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. doi: 10.1177/0022034510385686.
17. 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. doi: 10.1111/odi.13597.
18. 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.

19. 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 Aug;39(4):221-7. doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00727.x.
20. 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. doi: 10.1111/j.0904-2512.2004.00143.
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. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00964.
22. Pereira AL, Franco GC, Cortelli SC, Aquino DR, Costa FO, Raslan SA, Cortelli JR. Influence of periodontal status and periodontopathogens on levels of oral human β -defensin-2 in saliva. *J Periodontol.* 2013 Oct;84(10):1445-53. doi: 10.1902/jop.2012.120321.
23. McCormick TS, Weinberg A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontol 2000.* 2010 Oct;54(1):195-206. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00373.
24. 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 Aug 14;8(1):300. doi: 10.1038/s41392-023-01553-x.
25. 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 Dec;57(12):1609-14. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.04.018.
26. Dolińska E, Skurska A, Pietruska M, Dymicka-Piekarska V, Milewski R, Pietruski J, Sculean A. The Effect of Nonsurgical Periodontal Therapy on HNP1-3 Level in Gingival Crevicular Fluid of Chronic Periodontitis Patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2017 Aug;65(4):355-361. doi: 10.1007/s00005-016-0451-5.
27. Ebrahim MA. Expression of human beta defensins (HBDs) 1, 2 and 3 in gingival crevicular fluid of patients affected by localized aggressive periodontitis. *Saudi Dent J.* 2013 Apr;25(2):75-82. doi: 10.1016/j.sdentj.2013.02.004.
28. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(Suppl 20): S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935.
29. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. ii. correlation between oral hygiene and periodontal condition. *acta odontol scand.* 1964 feb;22:121-35. doi: 10.3109/00016356408993968.
30. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25(4): 229-35.

31. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000* 2013; 62: 203–217. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00450.x.
32. Ciantar M, Caruana DJ. Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *Journal of periodontal research*. 1998 Jul;33(5):259–64. doi: 10.1111/j.1600-0765.1998.tb02198.x.
33. Greer A, Zenobia C, Darveau RP. Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium. *Periodontol 2000*. 2013 Oct;63(1):67-79. doi: 10.1111/prd.12028.
34. Lee SH, Jun HK, Lee HR, Chung CP, Choi BK. Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Feb;35(2):138-45. doi: 10.1016/j.ijantimicag.
35. Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, et al. Production of b- defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 1999; 67: 2740–5.
36. Aimetti M. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Esthet Dent*. 2014 Summer;9(2):251-67.
37. Madruga D, Garcia MM, Martino L, Hassan H, Elayat G, Ghali L, Ceballos L. 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; 23(1): 335. doi: 10.1186/s12903-023-03023-w.
38. Dolińska E, Skurska A, Pietruska M, Dymicka-Piekarska V, Milewski R, Pietruski J, Sculean A. The Effect of Nonsurgical Periodontal Therapy on HNP1-3 Level in Gingival Crevicular Fluid of Chronic Periodontitis Patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017 Aug;65(4):355-361. doi: 10.1007/s00005-016-0451-5.
39. Dommisch H, Jepsen S. Diverse functions of defensins and other antimicrobial peptides in periodontal tissues. *Periodontol 2000*. 2015;69(1):96-110. doi: 10.1111/prd.12093. PMID: 26252404.
40. Jaradat SW, Hoder-Przyrembel C, Cubillos S, Krieg N, Lehmann K, Piehler S, Sigusch BW, Norgauer J. Beta-defensin-2 genomic copy number variation and chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2013 Nov; 92(11):1035-40. doi: 10.1177/0022034513504217.
41. 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*. 2015 Jun;50(3):403-10. doi: 10.1111/jre.12220.
42. Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet*. 2002;360(9340):1116–7. doi: 10.1016/S0140-6736(02)11239-6.

43. 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. doi: 10.1016/S0140-6736(02)11201-3.
44. 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. doi: 10.2337/dc11-s238.
45. 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. doi: 10.1186/s13023-014-0148-y.
46. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Oct;14(5):409-26. doi: 10.1016/s1359-6101(03)00049-2.
47. Hamanaka Y, Nakashima M, Wada A, Ito M, Kurazono H, Hojo H, Nakahara Y, Kohno S, Hirayama T, Sekine I. Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori* induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against *Helicobacter pylori*. *Gut*. 2001 Oct;49(4):481-7. doi: 10.1136/gut.49.4.481.
48. Gursoy UK, Könönen E. Understanding the roles of gingival beta-defensins. *J Oral Microbiol*. 2012;4. doi: 10.3402/jom.v4i0.15127.

3.2 Publicação 2*

Immune modulatory role of beta-defensin 2 in human oral epithelial cells

Lorena S. Gutierrez¹, Daniela L. Zandim-Barcelos¹, Joni A. Cirelli¹, Andressa V. B. Nogueira², James Deschner².

1 Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University-UNESP, Araraquara 14801-930, SP, Brazil

2 Department of Periodontology and Operative Dentistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, 55131 Mainz, Germany

*Correspondence: a.nogueira@uni-mainz.de; Tel.: +49-0-6131-17-7091

Abstract

Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused by bacteria that affects dental supporting tissues. Its development is based on a succession of events from the individual's innate and acquired immune system, with antimicrobial peptides being one of the main defense mechanisms in the gingival sulcus. Previous studies have demonstrated that periodontopathogenic bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis*, positively regulate the expression of human beta-defensin-2 (hBD-2) mRNA through specific receptors on gingival epithelial cells. The objective of this study was to investigate the modulatory effect of HBD-2 on the gene expression of the pro-inflammatory molecules hBD-2, IL-8 and CCL20, as well as their receptors CXCR1, CXCR2 and CCR6, respectively. Epithelial cells were incubated with HBD-2 at two concentrations (2.5 and 5.0 µg/ml) for 24 hours and gene expression of the pro-inflammatory molecules and their receptors was evaluated using real-time PCR, and protein profiles were measured by ELISA and immunofluorescence technique. HBD-2 stimulation upregulated inflammatory markers in epithelial cells. The increased expression was significant and dose-dependent for IL-8, CXCR1, CXCR2, CCR6 and CCL20. Significant expression of hBD-2 occurred at the highest stimulus dose (5.0 µg/ml). These results were confirmed in protein levels for IL-8 and CCL20 and by immunofluorescence for CCR6 and CXCR1. The immunomodulatory action of HBD-2 on these inflammatory markers in oral epithelial cells can be concluded.

Keywords: Periodontitis, Epithelial Cells, beta-Defensins, immune response, inflammation.

1. Introduction

Periodontitis, a complex and persistent inflammatory condition that affects the structural support of teeth, is linked to an imbalance in the oral microbiota [1,2]. Gingival inflammation is initiated by the formation of bacterial biofilm; however,

* Este artigo segue as normas de publicação do periódico International Journal of Molecular Sciences, para o qual pretende-se submetê-lo.

dysbiotic ecological changes in the microbiome are necessary for the initiation and progression of periodontitis. The pathophysiology of the disease has been characterized in its main molecular pathways and, ultimately, leads to the activation of host-derived proteinases that allow the loss of fibers from the marginal periodontal ligament, resulting in apical migration of the junctional epithelium and allowing the apical dissemination of the bacterial biofilm along the root surface [3].

The gingival epithelium is the first barrier encountered by the subgingival bacterial biofilm. This barrier function is attributed to the distinctive architectural integrity and antimicrobial peptides production, such as beta-defensins (HBDs), as well as chemokines and cytokines. HBDs are very small cationic peptides that serve a vital function within the mouth by acting as an initial defense mechanism. They have a broad spectrum antimicrobial activity against both gram-negative and gram-positive bacteria, which is achieved through their capacity to form openings in the bacterial membranes.

Protein complexes that act as transcription factors, including nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) and activator protein 1 (AP-1) play an essential role in hBD-2 expression induction by pathogenic factors such as LPS bacterial (lipopolysaccharide) or fungal infections [4,5]. They act by binding to the HBD-2 promoter, necessary for the induction of the gene for this protein. The role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways has also recently been emphasized [6]. Stimulation of Toll-like receptors (TLRs), especially TLR2 and TLR4, in cells specific for pathogen-associated molecular patterns (PAMP) is also crucial for the activation of hBD-2 expression during the course of infection. Furthermore, HBD-2 has the ability to strongly bind to the complement component C1q. Interestingly, this protein does not significantly affect the alternative activation pathway, but can inhibit the classical complement activation pathway, and may be involved in the protection against the uncontrolled activation of the innate immune response [7].

In addition to the importance of HBDs, it has been reported that some chemokines, like CC-chemokine ligand 20 (CCL20), are involved in leukocyte migration and are expressed in tissues with periodontal diseases. CCL20 also possesses antimicrobial properties, [8] and some studies have demonstrated that HBD-2 induces CCL20 transcription in human oral epithelial cells [9,10]. Therefore, CCL20 and HBD-2 serve as comparable mediators, not only exhibiting antimicrobial effects but also potentially bridging the gap between innate and adaptive immune responses by engaging with chemokine receptor 6 (CCR6), thus triggering the

activation of immature dendritic cells [11, 12]. CCL20 plays a crucial role in attracting cells expressing CCR6, including Th17 cells, which are associated with bone resorption in periodontal lesions and thus contribute to the development of periodontal disease [13,14].

In addition to CCL20, for different cell types, AMPs such as HBD-2 also have been shown to induce IL-8 expression [15,16,17], one of the earliest key mechanisms in the etiopathogenesis of periodontal inflammation, which in turn highlights the important role of IL-8 during the initial inflammatory response [18]. Eberhard et al.¹⁹ demonstrated that HBD-2 protein expression was increased on day 3, while IL-8 expression was elevated on day 5 in gingival biopsies. It can be speculated that an increase in HBD-2 concentration triggers IL-8 expression in the gingival epithelium. A better understanding of HBD-2 role during host-bacteria interactions is a prerequisite for future new antimicrobial treatment strategies.

It has been shown that keratinocytes constitutively expressed hBD-2 [20], however, studies in patients demonstrated that HBD-2 levels in gingival crevicular fluid were significantly elevated and positively correlated with most clinical parameters in individuals with periodontitis [21, 22, 23]. The increased expression of hBD-2 in inflamed tissues suggests that HBD-2 may contribute to the defense of epithelial surfaces that are constantly exposed to microbes. Furthermore, copy number variation in the hBD-2 gene has been associated with the severity of periodontal disease, suggesting that variation in gene expression may alter disease susceptibility [22]. Taken together, all of these studies support the value of HBD-2 as a marker of periodontal disease.

Considering that the levels of HBDs are generally altered in response to infection or disease states and that a strong correlation exists between periodontal disease pathogenesis and the immune status of the host, the present study investigated the modulatory effect of HBD-2 on inflammatory response induction in human oral epithelial cells (TIGKs), more specifically on IL-8 and CCL20, and their receptors CXCR1, CXCR2 and CCR6, expression. It was hypothesized that HBD-2 induces the up-regulation of these inflammatory markers from human oral epithelial cells.

2. Materials and methods

2.1 Cells culture condition

Epithelial cells hTERT TIGKs CRL-3397 were obtained from ATCC, certified as mycoplasma-free and was used to culture. The cells were cultured in KBM™Gold™ Basal Medium with KGM™Gold™SingleQuots™Supplement pack, containing: hydrocortisone, transferrin, epinephrine, GA-1000, BPE, hEGF, insulin, from Lonza Bioscience and cultivated in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂, as indicated by the suppliers. Mycoplasma contamination was regularly checked. Cells were cultured (1×10^5 cells/well) on 6-well culture plates and grown until 70–80% confluence. The medium was changed every other day. The periodontopathogenic bacteria *Filifactor alocis* (*F.a.*) (ATCC 25586), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) (ATCC 43718), *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) (ATCC 33277) and *Treponema denticola* (*T.d.*) (ATCC 35405) were used in different concentrations (optical density, O.D.₆₆₀ = 0.050 and 0.100) to simulate in vitro microbial infection. Bacterial strains were pre-cultivated on Schaedler agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK) in an anaerobic atmosphere for 48 h. Subsequently, bacteria were suspended in phosphate-buffered saline (O.D.₆₆₀ = 1, corresponding to 1.2×10^9 bacterial cells/ml) and submitted twice to ultrasonication (160 W for 15 min) resulting in a total killing. The cells were also stimulated with Recombinant Human BD-2 (50 µg - Peptotech- Catalog number: 300-49) at concentrations of 2.5 and 5 µg/ml, for a period of 24 h, consistent with previous in vitro studies [9,24,25]. In addition, cells were pre-incubated with anti-human toll-like receptor (TLR2) monoclonal antibody (10 µg/ml, eBioscience, San Diego, CA, USA) a specific inhibitor of TLR-2 signaling, being this stimulation always performed one hour before the stimulus with bacteria. Untreated cells served as control.

2.2 PCR experiment

After treatments, cells were collected for RNA extraction, reverse transcription for cDNA production and gene expression analysis by qPCR. RNA isolation was performed using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. To determine the RNA concentration, the spectrophotometer NanoDrop ND-2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) was used. Five hundred ng of total RNA was reverse transcribed using iScrip

Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) according to manufacturer's protocol. Gene expression analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta-defensin-2 (hBD-2), chemokine ligand 20 (CCL20), chemokine receptor 6 (CCR6), chemokine ligand 8 (CXCL8) and chemokine receptor (CXCR1 and CXCR2) was performed by real-time PCR using the PCR thermal cycler CFX96 (Bio-Rad Laboratories), SYBR green PCR master mix (QuantiFast SYBR Green PCR Kit, Qiagen), and specific primers (QuantiTect Primer Assay, Qiagen). One μ l of cDNA was mixed with 12.5 μ l master mix, 2.5 μ l primer, and 9 μ l nuclease-free water. The mix was heated at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, and a combined annealing/extension step at 60 °C for 30 s. Data were analyzed by comparative threshold cycle method.

2.3 ELISA experiment

The protein levels of IL-8 (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), HBD-2 (Human BD-2 Standard ABTS ELISA Development Kit, Catalog # 900-K172, PeproTech, Cranbury, NJ, USA) and CCL20 (Human CCL20/MIP-3 alpha DuoSet ELISA, Catalog # DY360, R&D Systems) in the cell supernatants were measured using commercially available ELISA kits according to the manufacturer's instructions. The optical density was determined using a microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) set to 450 nm. The readings at 450 nm were subtracted from the readings at 540 nm for optical correction as per manufacturer's recommendation. Cell numbers were checked and there was no significant difference between groups.

2.4 Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism (version 9.2.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For data analysis, mean values and standard errors of the mean (SEM) were calculated. Data were checked for normal distribution and, subsequently, analyzed with the *t*-test (parametric) or Mann-Whitney-U test (non-parametric). For multiple comparisons, ANOVA or the Kruskal Wallis test was applied, depending on normal distribution. The significance level was set at $p < 0.05$ for all experiments.

3. Results

3.1. Regulation of hBD-2 by different periodontopathogens and involvement of TLR2 in the actions of *F. alocis*

First, we evaluated the regulation of hBD-2 expression by periodontopathogenic bacteria such as *F. alocis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *T. denticola* in human gingival keratinocytes. These bacteria used at two different concentrations induced an upregulation of hBD-2 gene expression, which was significant ($p < 0.05$) for *F. alocis*, *P. gingivalis*, and *T. denticola* (Figure 1a). Furthermore, the stimulatory effect of *F. alocis* ($OD_{660} = 0.050$) on hBD-2 expression was also investigated at protein level. As detected by ELISA, *F. alocis* increased significantly ($p < 0.05$) and time-dependently the hBD-2 protein level in the cell supernatants at 24 h and 48 h, as shown in Figure 1b. We next sought to identify the mechanism underlying the stimulatory effect of *F. alocis* on hBD-2 expression in the keratinocytes. To this end, cells were pre-incubated with a specific inhibitor for TLR2 signaling and, subsequently, exposed to *F. alocis* ($OD_{660} = 0.050$). *F. alocis*-stimulated cells without pre-incubation with the TLR2 inhibitor served as control. Pre-incubation of the cells with the TLR2 inhibitor resulted in a significant ($p < 0.05$) downregulation of hBD-2 expression in *F. alocis*-treated cells at 24 h (Figure 1c).

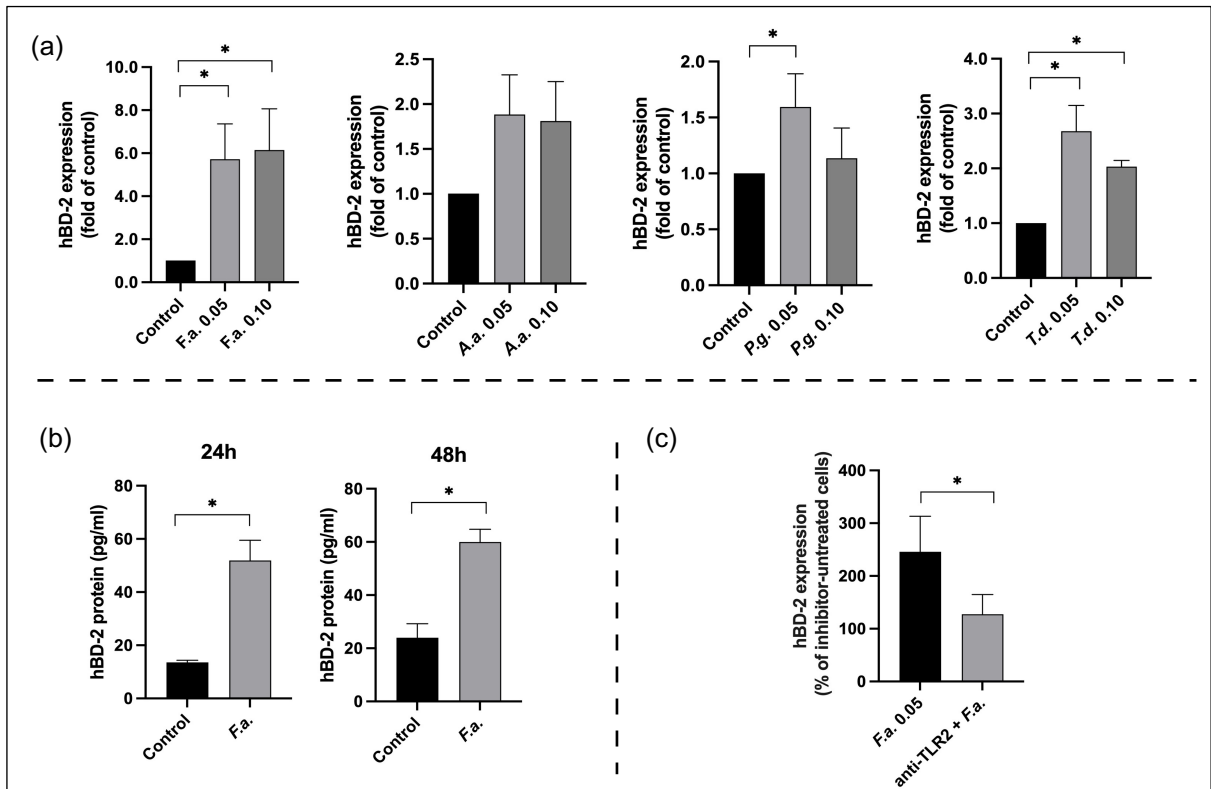


Figure 1 - (a) Regulation of hBD-2 gene expression by different concentrations of *F. alocis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *T. denticola* (O.D.₆₆₀: 0.05, 0.10) in human gingival keratinocytes at 24 h. Cells not exposed to the bacteria served as control. (b) hBD-2 protein levels in the supernatants of keratinocytes exposed or not to *F. alocis* (O.D.₆₆₀: 0.05) for 24 h and 48 h. (c) hBD-2 expression after stimulation with *F. alocis* (O.D.₆₆₀: 0.050) in keratinocytes pre-incubated or not with a specific inhibitor against TLR2 signaling at 24 h. Data shown are representative of three independent experiments. * Significant difference between groups ($p < 0.05$).

3.2 Effect of hBD-2 on the expression of CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2

Next, we investigated whether hBD-2 (2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$) could modulate the expression of the pro-inflammatory cytokine CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 in gingival keratinocytes. As shown by real-time PCR, hBD-2 significantly ($p < 0.05$) increased the expression of CXCL8, CXCR1, and CXCR2 in a dose-dependent manner at 24 h (Figure 2a-c). The stimulatory effect of hBD-2 on CXCL8 expression was also observed at protein level in the supernatants of the keratinocytes. hBD-2-treated keratinocytes showed significantly ($p < 0.05$) and dose-dependently elevated levels of CXCL8 protein in the supernatants at 24 h (Figure 2d).

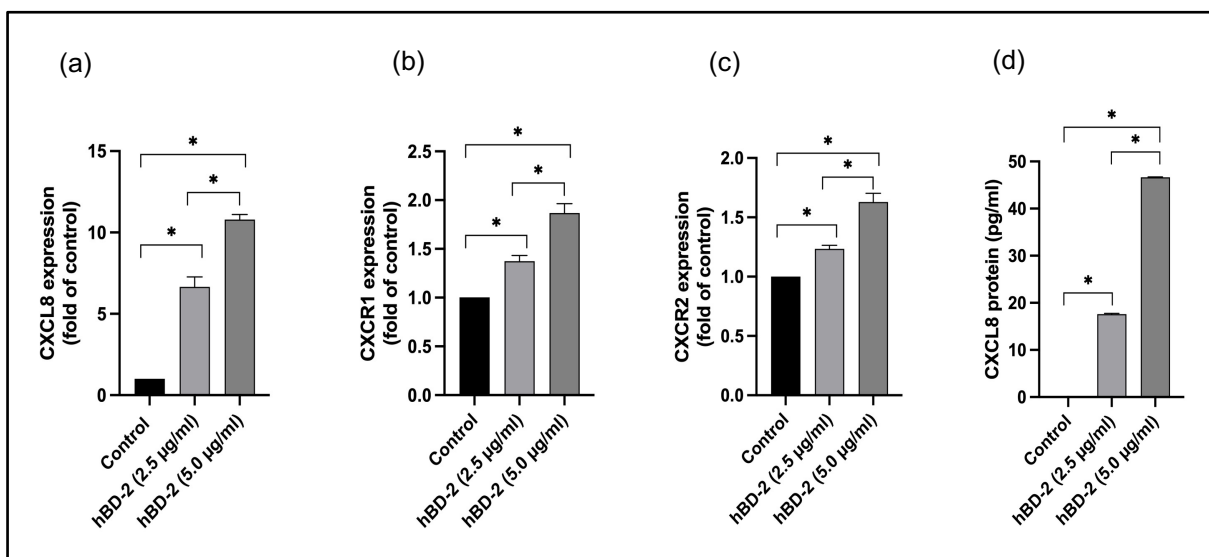


Figure 2 - Modulation of CXCL8 (a), CXCR1 (b), and CXCR2 (c) gene expressions by different concentrations of hBD-2 (2.5 and 5.0 µg/ml) in human gingival keratinocytes at 24 h. Cells not exposed to hBD-2 served as control. (d) CXCL8 protein levels in the supernatants of keratinocytes exposed or not to hBD-2 (2.5 and 5.0 µg/ml) for 24 h, analyzed by ELISA. Data shown are representative of three independent experiments. * Significant difference between groups ($p < 0.05$).

3.3 Effects of hBD-2 on the expression of CCL20 and its receptor CCR6

We then examined the effect of hBD-2 (2.5 and 5.0 µg/ml) on the expression of CCL20 and its receptor CCR6 in gingival keratinocytes. hBD-2 caused a significant ($p < 0.05$) and dose-dependent upregulation of the CCL20 and CCR6 gene expressions at 24 h (Figure 3a-b).

The stimulatory effect of hBD-2 on CCL20 expression was evaluated at the protein level by ELISA. Keratinocytes stimulated with hBD-2 showed a significant increase ($p < 0.05$) in CCL20 protein levels in the supernatants at 24 h. The effect of hBD-2 was also dose-dependent (Figure 3c). Exposure of keratinocytes to hBD-2 (5.0 µg/ml) also resulted in a pronounced CCR6 protein synthesis at 24 h, as determined by immunofluorescence microscopy (Figure 3d).

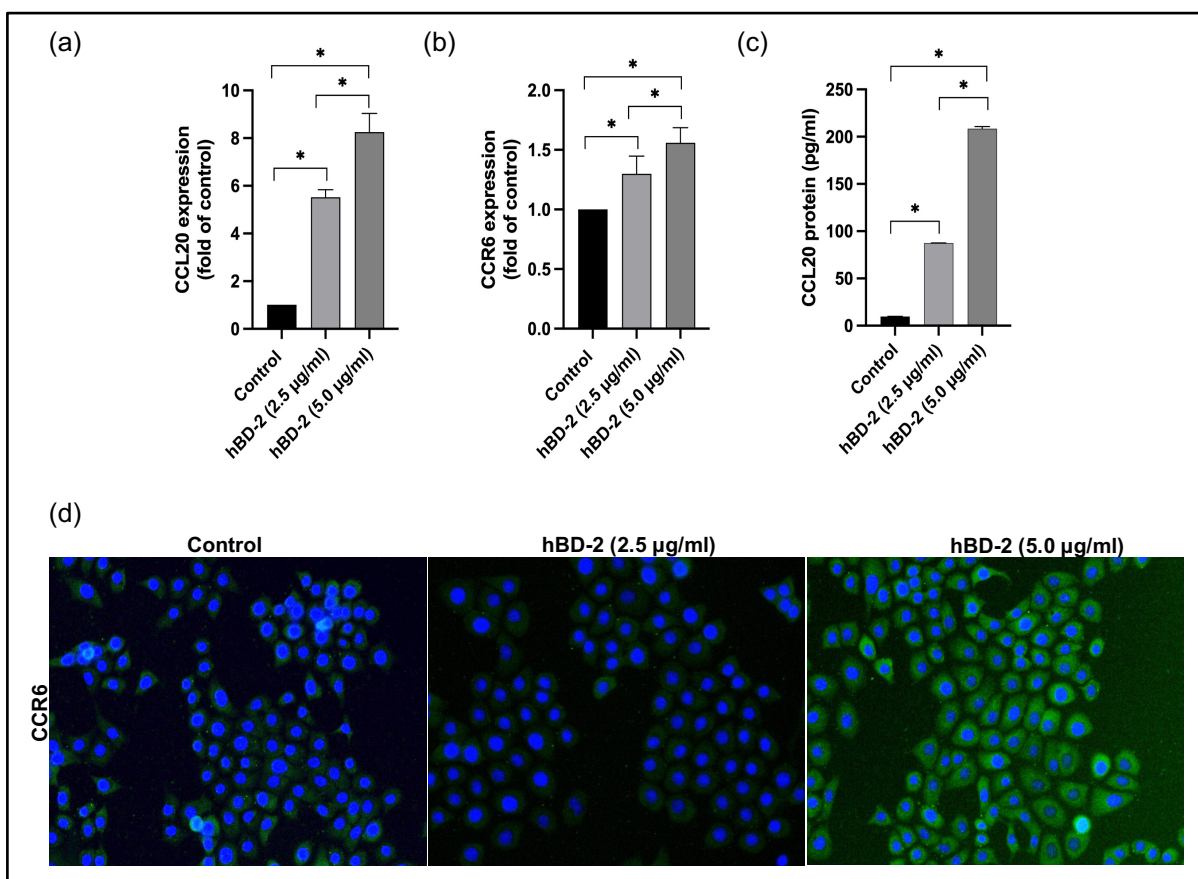


Figure 3- Modulation of CCL20 (a) and CCR6 (b) gene expressions by different concentrations of hBD-2 (2.5 and 5.0 µg/ml) in human gingival keratinocytes at 24 h. Cells not exposed to hBD-2 served as control. (c) CCL20 protein levels in the supernatants of keratinocytes exposed or not to hBD-2 (2.5 and 5.0 µg/ml) for 24 h, analyzed by ELISA. Data shown are representative of three independent experiments. * significant difference between groups ($p < 0.05$). (d) CCR6 protein synthesis in keratinocytes in the presence or absence of hBD-2 (2.5 and 5.0 µg/ml) for 24 h, as analyzed by immunofluorescence. Representative images from three independent experiments are shown.

3.4. Effect of hBD2 on its own expression

We further studied if hBD-2 can regulate its own expression in gingival keratinocytes. Interestingly, hBD-2 was autostimulatory and could significantly ($p < 0.05$) increase its gene expression by approximately 50 % at 24 h (data not shown).

3.5. Effects of different periodontopathogens on CXCL8 and CCL20 expressions

Finally, we also studied the direct effect of different periodontopathogens on the CXCL8 and CCL20 expressions in gingival keratinocytes. Exposure of cells with *F. alocis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *T. denticola* resulted in significantly ($p < 0.05$) enhanced expression levels of CXCL8 and CCL20 at 24 h (Figure

4a-b). Moreover, the stimulatory effect of *F. alocis* ($OD_{660} = 0.050$) on CXCL8 and CCL20 expressions was evaluated at the protein level by ELISA. *F. alocis* increased significantly ($p < 0.05$) and time-dependently the CXCL8 and CCL20 protein levels in the cell supernatants at 24 h and 48 h, as shown in Figure 4c-d.

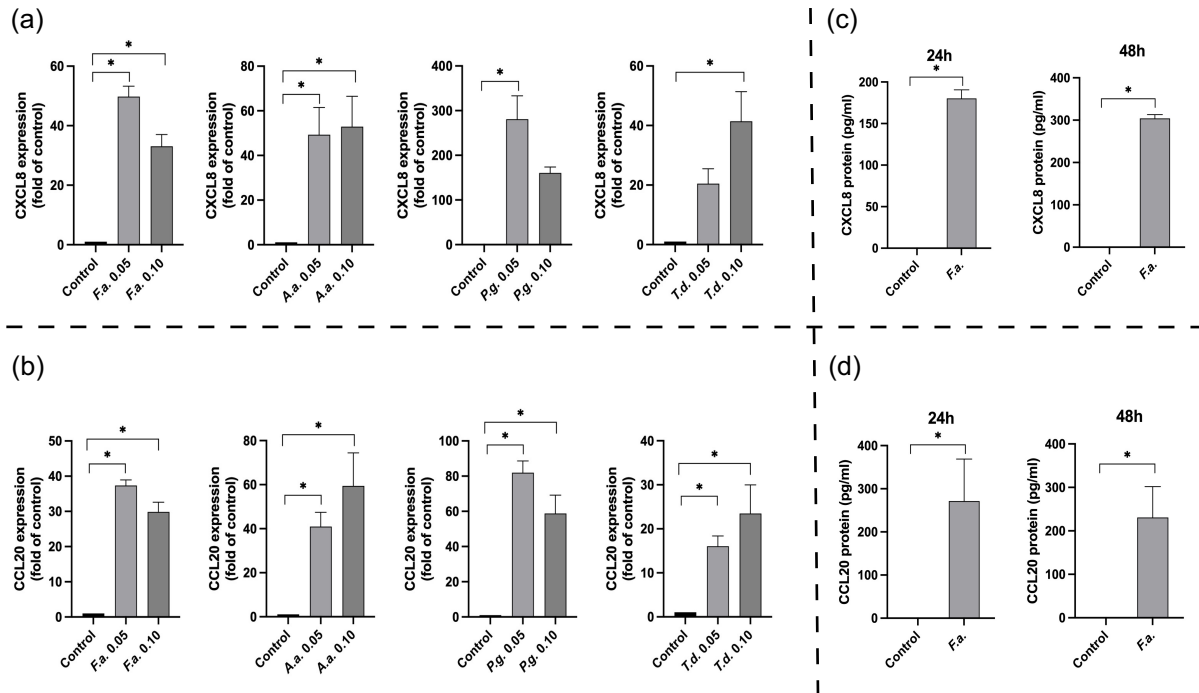


Figure 4- Modulation of CXCL8 (a) and CCL20 (b) gene expressions by different concentrations of of *F. alocis* (O.D.₆₆₀: 0.05, 0.10) in human gingival keratinocytes at 24 h. Cells not exposed to the bacteria served as control. CXCL8 (c) and CCL20 (d) protein levels in the supernatants of keratinocytes exposed or not to *F. alocis* (O.D.₆₆₀: 0.05) for 24 h and 48 h. Data shown are representative of three independent experiments. * Significant difference between groups ($p < 0.05$).

4. Discussion

HBD-2 is an antimicrobial peptide widely investigated in the oral cavity tissues. Previous studies have reported an increased expression of this peptide in gingival tissues of patients with periodontal involvement [26,27,28] and in vitro experiments have also shown upregulated expression patterns of hBD-2 in gingival cells exposed to commensal and pathogenic oral bacteria [29-32]. These findings could be explained by the fact that HBD-2 is part of the group of antimicrobial peptides which, in addition to having a high microbicidal effect against a wide range of microorganisms, they also have immunomodulatory functions that link innate and adaptive immunity [33-38].

Our hypothesis in this study was that HBD-2 has an immunomodulatory function, contributing to innate immunity, stimulating the expression of IL-8, CCL20, hBD-2 and their receptors CXCR1, CXCR2 and CCR6 respectively, in human oral epithelial cells.

Firstly, we have demonstrated upregulated expression of hBD-2 by keratinocytes when stimulated with classical periodontopathogens (*A.a.*, *P.g.*, *T.d.*) and also with *F.a.* To our best understanding, this is the first study to evaluate the expression of hBD-2 in keratinocytes stimulated with *F.a.*, an emergent Gram-positive anaerobic rod associated to periodontitis [1,39,40,41]. In addition, we also demonstrated that hBD-2 expression is at least partially dependent of Toll-like receptors (TLRs). Our results are therefore in line with other studies that have also shown that HBD-2 uses TLR-2 signaling pathways, among others, for its effects. Kumar A. et al.⁴², demonstrate that expression of the antimicrobial peptide hBD-2 is regulated by TLR2-dependent pathways. This result was also observed by Chung et al.⁴³, who reported the apparent interaction of NODs, PARs and TLRs in the induction of CCL20, hBD-2 and IL-8 in response to various bacteria.

In the oral cavity, several studies have demonstrated that, in addition to being expressed by keratinocytes [20], hBD-2 levels markedly increased in the presence of periodontitis [21-23,26-28]. It was also observed that the expression of hBD-2 [9,10,15-17], together with several cytokines, proteins, transcription factors and binding to enhancers, such as IFN- β , NF- κ B, AP-1 and CCAAT 25 [39,40], is involved in the production of IL-8 and CCL20.

Our data revealed a significant upregulation of IL-8, CCL20 and their receptors CXCR1, CXCR2 and CCR6 expression by keratinocytes stimulated with HBD-2, suggesting that HBD-2 may be associated with modulation of these inflammatory markers in the immune response to bacterial stimulus. CCL20 is a bifunctional peptide with innate and adaptive immune properties that is regulated by inflammatory mediators, expressed by the epithelium, and shares structural and functional properties with HBD-2, including signaling to adaptive immune cells through the highly selective CCR6 receptor [44]. A previous study reported similar findings for CCL20 expression after HOECs cells stimulation with HBD-2 [10] In the oral cavity, a similar expression pattern for hBD-2 and CCL20 in GCF was observed during the development of an experimentally induced gingivitis [45]. In addition, during inflammatory responses, CCL20 also exhibited antimicrobial function and was

regulated by oral bacteria [12,30,31]. Vongsa R.A. et al. evaluated the potential of HBD-2 to stimulate intestinal epithelial migration. They verified that HBD-2 was equipotent to CCL20, through involvement with CCR6, in stimulating migration of intestinal epithelial cells. It has been shown that stimulation of these ligands with CCR6 leads to calcium mobilization and increases active RhoA, phosphorylated myosin light chain, and F-actin accumulation. Together, these data indicate that the canonical wound healing regulatory pathway, along with calcium mobilization, regulates CCR6-directed epithelial cell migration. These findings expand the mechanistic role for chemokines and HBD-2 in mucosal inflammation to include immunocyte trafficking and killing of microorganisms with the concomitant activation of restitutive migration and barrier repair [46]. Hosokawa Y. et al.⁴⁷ observed marked levels of CCR6 expression in lymphocytes that infiltrated inflamed gingival tissue. Furthermore, CCR6-expressing cells infiltrated diseased periodontal tissue, and the proportion of CCR6-positive CD4+ T cells was significantly higher in diseased periodontal tissue than in peripheral blood in the same patient.

In addition to the modulatory activity of HBD-2 in CCL20, our study also showed an increased IL-8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 expression after stimulation of epithelial cells with HBD-2. IL-8 is a member of the chemokine family, small proteins that control diverse tissue functions including cell recruitment and activation under homeostatic and inflammatory conditions. IL-8 acts on the CXCR1 and CXCR2 receptors, which contribute to its biological effects. These CXCR1 and CXCR2 receptors are expressed by many cells, including epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, and neurons [48]. A large body of experimental data suggests that IL-8 and the receptors CXCR1 and CXCR2 contribute not only to pathogen clearance, but also significantly to disease-associated processes, including tissue injury, fibrosis, angiogenesis, among others [49]. Eberhard et al¹⁹. observed that hBD-2 expression increased on day 3, while IL-8 expression was elevated on day 5 in gingival biopsies from patients who underwent the development of experimental gingivitis [19]. It can be speculated that the increased concentration of HBD-2 triggers the expression of IL-8 in the gingival epithelium.

The increased production of IL-8, CCL20 and their receptors by epithelial cells after stimulation with HBD-2 suggests that these inflammatory markers can be increased in saliva, sulcus fluid, gingiva and serum during periodontal inflammation. Clinical studies of experimental gingivitis and periodontitis, as well as periodontal

therapy, i.e. intervention, should further clarify the role of HBD-2 within the periodontium on a local level, as well as its potential effects systemically for the whole organism.

In summary, within its limitations, this in vitro study demonstrated that HBD-2 is capable of increasing the expression of inflammatory markers by epithelial cells. Furthermore, our study revealed that TIGKs epithelial cells constitutively express hBD-2, which is exacerbated in the presence of important periodontopathogenic bacteria, demonstrating the relevance of this peptide in the inflammatory process of periodontal disease.

References

1. Deng ZL, Szafranski SP, Jarek M, Bhujra S, Wagner-Döbler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep.* 2017 Jun 16;7(1):3703. doi: 10.1038/s41598-017-03804-8. PMID: 28623321; PMCID: PMC5473847.
2. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Dec;16(12):745-759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x. PMID: 30301974; PMCID: PMC6278837.
3. Golub LM, Lee HM. Periodontal therapeutics: Current host-modulation agents and future directions. *Periodontol 2000.* 2020 Feb;82(1):186-204. doi: 10.1111/prd.12315. PMID: 31850625; PMCID: PMC6973248.
4. Diamond DL, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Ganz T, Dale BA. Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. *J Immunol Methods.* 2001 Oct 1;256(1-2):65-76. doi: 10.1016/s0022-1759(01)00442-2. PMID: 11516756.
5. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):710-20. doi: 10.1038/nri1180. PMID: 12949495.
6. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2000 Jul;68(1):9-14. PMID: 10914484.
7. Power CA, Church DJ, Meyer A, Alouani S, Proudfoot AE, Clark-Lewis I, Sozzani S, Mantovani A, Wells TN. Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells. *J Exp Med.* 1997 Sep 15;186(6):825-35. doi: 10.1084/jem.186.6.825. PMID: 9294137; PMCID: PMC2199050.
8. Hoover DM, Boulegue C, Yang D, Oppenheim JJ, Tucker K, Lu W, Lubkowski J. The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J Biol Chem.* 2002 Oct 4;277(40):37647-54. doi: 10.1074/jbc.M203907200. Epub 2002 Jul 30. PMID: 12149255.

9. Yin L, Dale BA. Activation of protective responses in oral epithelial cells by *Fusobacterium nucleatum* and human beta-defensin-2. *J Med Microbiol*. 2007 Jul;56(Pt 7):976-987. doi: 10.1099/jmm.0.47198-0. PMID: 17577065.
10. Ghosh SK, Gupta S, Jiang B, Weinberg A. *Fusobacterium nucleatum* and human beta-defensins modulate the release of antimicrobial chemokine CCL20/macrophage inflammatory protein 3 α . *Infect Immun*. 2011 Nov;79(11):4578-87. doi: 10.1128/IAI.05586-11. Epub 2011 Sep 12. PMID: 21911466; PMCID: PMC3257922.
11. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):525-8. doi: 10.1126/science.286.5439.525. PMID: 10521347.
12. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Oct;14(5):409-26. doi: 10.1016/s1359-6101(03)00049-2. PMID: 12948524.
13. Yu X, Antoniades HN, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. *Infect Immun*. 1993 Nov;61(11):4622-8. doi: 10.1128/iai.61.11.4622-4628.1993. PMID: 8406859; PMCID: PMC281213.
14. Yu X, Graves DT. Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. *J Periodontol*. 1995 Jan;66(1):80-8. doi: 10.1902/jop.1995.66.1.80. PMID: 7891256.
15. Li J, Zhu HY, Beuerman RW. Stimulation of specific cytokines in human conjunctival epithelial cells by defensins HNP1, HBD2, and HBD3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:644–653.
16. Dommisch H, Winter J, Willebrand C, Eberhard J, Jepsen S. Immune regulatory functions of human beta-defensin-2 in odontoblast-like cells. *Int Endod J* 2007;40:300–307.
17. Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Correlation between b-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 2005;42:1073–1084.
18. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol* 2014;35:3–11.
19. Dommisch H, Staufienbiel I, Schulze K, Stiesch M, Winkel A, Fimmers R, Dommisch J, Jepsen S, Miosge N, Adam K, Eberhard J. Expression of antimicrobial peptides and interleukin-8 during early stages of inflammation: An experimental gingivitis study. *J Periodontal Res*. 2015 Dec;50(6):836-45. doi: 10.1111/jre.12271. Epub 2015 Mar 24. PMID: 25808131.
20. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006 Oct 2;203(10):2271-9. doi: 10.1084/jem.20061308. Epub 2006 Sep 18. PMID: 16982811; PMCID: PMC2118116.

21. Sidharthan S, Dharmarajan G, Kulloli A. Gingival crevicular fluid levels of Interleukin-22 (IL-22) and human β Defensin-2 (hBD-2) in periodontal health and disease : A correlative study. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020 Oct-Dec;10(4):498-503. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.07.021. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32874880; PMCID: PMC7452331.
22. Jaradat SW, Hoder-Przyrembel C, Cubillos S, Krieg N, Lehmann K, Piehler S, Sigusch BW, Norgauer J. Beta-defensin-2 genomic copy number variation and chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2013 Nov;92(11):1035-40. doi: 10.1177/0022034513504217. Epub 2013 Sep 9. PMID: 24019264.
23. Öztürk A, Kurt-Bayrakdar S, Avcı B. Comparison of gingival crevicular fluid and serum human beta-defensin-2 levels between periodontal health and disease. *Oral Dis.* 2021 May;27(4):993-1000. doi: 10.1111/odi.13597. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32772492.
24. Li J, Zhu HY, Beuerman RW. Stimulation of specific cytokines in human conjunctival epithelial cells by defensins HNP1, HBD2, and HBD3. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Feb;50(2):644-53. doi: 10.1167/iovs.08-1838. Epub 2008 Sep 20. PMID: 18806299.
25. Ghosh SK, Gupta S, Jiang B, Weinberg A. Fusobacterium nucleatum and human beta-defensins modulate the release of antimicrobial chemokine CCL20/macrophage inflammatory protein 3 α . *Infect Immun.* 2011 Nov;79(11):4578-87. doi: 10.1128/IAI.05586-11. Epub 2011 Sep 12. PMID: 21911466; PMCID: PMC3257922.
26. Dommisch H, Acil 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 Jun;20(3):186–190. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Vardar-Sengul S., Demirci T., Sen B.H., Erkizan V., Kurulgan E., Baylas H. Human β defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodontal Res.* 2007 Oct;42(5):429–437. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. 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 Aug;39(4):221–227. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Dommisch H, Winter J, Açil Y, Dunsche A, Tiemann M, Jepsen S. Human beta-defensin (hBD-1, -2) expression in dental pulp. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Jun;20(3):163-6. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00206.x. PMID: 15836517.
30. Dommisch H, Chung WO, Jepsen S, Hacker BM, Dale BA. Phospholipase C, p38/MAPK, and NF- κ B-mediated induction of MIP-3 α /CCL20 by Porphyromonas gingivalis. *Innate Immun.* 2010 Aug;16(4):226-34. doi: 10.1177/1753425909339237. Epub 2009 Aug 26. PMID: 19710093; PMCID: PMC2889137.
31. Dommisch H, Reinartz M, Backhaus T, Deschner J, Chung W, Jepsen S. Antimicrobial responses of primary gingival cells to Porphyromonas gingivalis. *J Clin Periodontol.* 2012 Oct;39(10):913-22. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01933.x. Epub 2012 Aug 5. PMID: 22860513.

32. Gursoy UK, Pöllänen M, Könönen E, Uitto VJ. A novel organotypic dento-epithelial culture model: effect of *Fusobacterium nucleatum* biofilm on B-defensin-2, -3, and LL-37 expression. *J Periodontol*. 2012 Feb;83(2):242-7. doi: 10.1902/jop.2011.110177. Epub 2011 Jun 21. PMID: 21692631.
33. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):710-20. doi: 10.1038/nri1180. PMID: 12949495.
34. Boniotto M, Jordan WJ, Eskdale J, Tossi A, Antcheva N, Crovella S, Connell ND, Gallagher G. Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr;50(4):1433-41. doi: 10.1128/AAC.50.4.1433-1441.2006. PMID: 16569862; PMCID: PMC1426918.
35. Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology*. 2004 Mar;111(3):273-81. doi: 10.1111/j.0019-2805.2004.01816.x. PMID: 15009427; PMCID: PMC1782421.
36. Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. The human beta-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*. 2005 Aug 1;175(3):1776-84. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1776. PMID: 16034119.
37. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):525-8. doi: 10.1126/science.286.5439.525. PMID: 10521347.
38. 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. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104603. PMID: 15032578.
39. Ikeda E, Shiba T, Ikeda Y, Suda W, Nakasato A, Takeuchi Y, Azuma M, Hattori M, Izumi Y. Japanese subgingival microbiota in health vs disease and their roles in predicted functions associated with periodontitis. *Odontology*. 2020 Apr;108(2):280-291. doi: 10.1007/s10266-019-00452-4. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31502122.
40. Kumar KA, Ganguly K, Mazumdar K, Dutta NK, Dastidar SG, Chakrabarty AN. Amlodipine: a cardiovascular drug with powerful antimicrobial property. *Acta Microbiol Pol*. 2003;52(3):285-92. PMID: 14743981.
41. Kumar A, Zhang J, Yu FS. Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells. *Microbes Infect*. 2006 Feb;8(2):380-9. doi: 10.1016/j.micinf.2005.07.006. Epub 2005 Sep 15. PMID: 16242370; PMCID: PMC2666383.

42. Kumar A, Zhang J, Yu FS. Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells. *Microbes Infect.* 2006 Feb;8(2):380-9. doi: 10.1016/j.micinf.2005.07.006. Epub 2005 Sep 15. PMID: 16242370; PMCID: PMC2666383.

43. Chung WO, An JY, Yin L, Hacker BM, Rohani MG, Dommisch H, DiJulio DH. Interplay of protease-activated receptors and NOD pattern recognition receptors in epithelial innate immune responses to bacteria. *Immunol Lett.* 2010 Jul 8;131(2):113-9. doi: 10.1016/j.imlet.2010.02.006. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20219537; PMCID: PMC2885501.

44. Starner TD, Barker CK, Jia HP, Kang Y, McCray PB Jr. CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Nov;29(5):627-33. doi: 10.1165/rcmb.2002-0272OC. Epub 2003 May 14. PMID: 12748059.

45. Dommisch H, Skora P, Hirschfeld J, Olk G, Hildebrandt L, Jepsen S. The guardians of the periodontium-sequential and differential expression of antimicrobial peptides during gingival inflammation. Results from in vivo and in vitro studies. *J Clin Periodontol.* 2019 Mar;46(3):276-285. doi: 10.1111/jcpe.13084. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30761574.

46. Vongsa RA, Zimmerman NP, Dwinell MB. CCR6 regulation of the actin cytoskeleton orchestrates human beta defensin-2- and CCL20-mediated restitution of colonic epithelial cells. *J Biol Chem.* 2009 Apr 10;284(15):10034-45. doi: 10.1074/jbc.M805289200. Epub 2009 Feb 20. PMID: 19233848; PMCID: PMC2665058.

47. Hosokawa Y, Nakanishi T, Yamaguchi D, Takahashi K, Yumoto H, Ozaki K, Matsuo T. Macrophage inflammatory protein 3alpha-CC chemokine receptor interactions play an important role in the accumulation of CD4+ T cells in periodontal disease tissue. *Clin Exp Immunol.* 2002 Jun;128 (3):548-54. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01865.x. PMID: 12067311; PMCID: PMC1906256).

48. Adage T, Del Bene F, Fiorentini F, Doornbos RP, Zankl C, Bartley MR, Kungl AJ. PA401, a novel CXCL8-based biologic therapeutic with increased glycosaminoglycan binding, reduces bronchoalveolar lavage neutrophils and systemic inflammatory markers in a murine model of LPS-induced lung inflammation. *Cytokine.* 2015 Dec;76(2):433-441. doi: 10.1016/j.cyto.2015.08.006. Epub 2015 Aug 21. PMID: 26303011.

49. 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 May;10(5):593-619. doi: 10.1586/1744666X.2014.894886. Epub 2014 Mar 29. PMID: 24678812.

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 systematic review. *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, Jadlowsky 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, Nordenskjold 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.

APÊNDICE A – METODOLOGIA

1 ESTUDO IN VIVO

Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (CAAE: 96972718.2.0000.5416) e foi realizado de acordo com as diretrizes da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Antes da realização de qualquer procedimento, os pacientes foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo e os procedimentos que serão realizados, e tiveram que ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

1.1 População do estudo

Vinte e dois pacientes com periodontite, apresentando perda de inserção moderada a avançada, foram selecionados para este estudo. Estes pacientes foram recrutados na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. O diagnóstico de periodontite foi realizado de acordo com os critérios estabelecidos pelo Workshop Mundial de 2017, sobre a Classificação de Doenças e Condições Periodontais e Peri- implantes¹. Os critérios de inclusão foram: possuir mais de 18 anos para ambos os sexos, presença de ao menos 15 dentes na cavidade oral (excluindo os terceiros molares) e presença de pelo menos 4 dentes com profundidade de sondagem (PS) \geq 4 mm, sangramento à sondagem (SS) e nível clínico de inserção (NCI) \geq 4 mm. Foram excluídos do estudo fumantes ou ex-fumantes, pacientes que fazem uso crônico de álcool, mulheres em fase de menopausa, gestantes ou lactantes, diabéticos, pacientes com hipertireoidismo ou hipotireoidismo não controlado, pacientes com coagulopatias, usuários de drogas ilícitas, pacientes que receberam tratamento radioterápico na região de cabeça ou pescoço, pacientes em tratamento quimioterápico, pacientes que receberam tratamento periodontal e(ou) uso de antibióticos 3 meses antes da pesquisa, uso crônico de anti-inflamatórios e imunossupressores, uso de soluções para bochecho contendo agente antimicrobianos nos últimos 2 meses antes da seleção para o estudo e presença de limitação física que impeça ou dificulte a realização dos procedimentos de higiene oral.

1.2 Cálculo da amostra

O tamanho da amostra foi calculado utilizando software estatístico (GPower 3.1 Statistical Power Analysis for Windows, Düsseldorf, Alemanha). Considerando valores médios de expressão e desvio padrão de outras moléculas, avaliados pré e pós-tratamento periodontal não cirúrgico, em um único estudo anterior disponível na literatura¹, obteve-se tamanho de efeito de 1,30. Com base nesse tamanho de efeito, um nível de significância de 0,05 e um poder de estudo de 0,80, determinou-se ser necessário um tamanho de amostra de 8 indivíduos para esse estudo. Considerando a possibilidade de desistências, ou necessidade de exclusão de algum paciente, foram selecionados 22 pacientes para a realização desse estudo.

1.3 Delineamento do estudo e obtenção das amostras

Trata-se de um estudo clínico prospectivo longitudinal. Após a seleção dos pacientes, baseado nos critérios de inclusão e exclusão descritos anteriormente, os pacientes passaram por uma fase de preparo para remoção de fatores retentivos de placa como cálculos supragengivais, restaurações sem polimento ou com sobrecontorno. Ainda nesta fase, todos os pacientes receberam instruções de higiene oral (IHO) padronizadas, recomendando-se a utilização da técnica de Bass ou Bass modificada, o uso de escovas macias e de fio dental. Posteriormente, os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados por um único examinador calibrado: Índice de Placa Visível (IPV)², Índice Sangramento Gengival (ISG)³, Profundidade de Sondagem (PS), Sangramento à Sondagem (SS) e Nível Clínico de Inserção (NCI). Os parâmetros IPV e ISG foram avaliados em quatro sítios por dente (mesial, vestibular, distal e lingual), sendo registrados como presença ou ausência. Os demais parâmetros foram avaliados em seis sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual, disto-lingual). Para realizar a calibração do examinador, foram efetuadas duas sondagens de boca inteira em 5 pacientes voluntários, com um intervalo de 48 horas entre os exames. A calibração foi aceita, sendo que a percentagem de concordância entre as mensurações para os parâmetros PS e NCI foi maior que 90%.

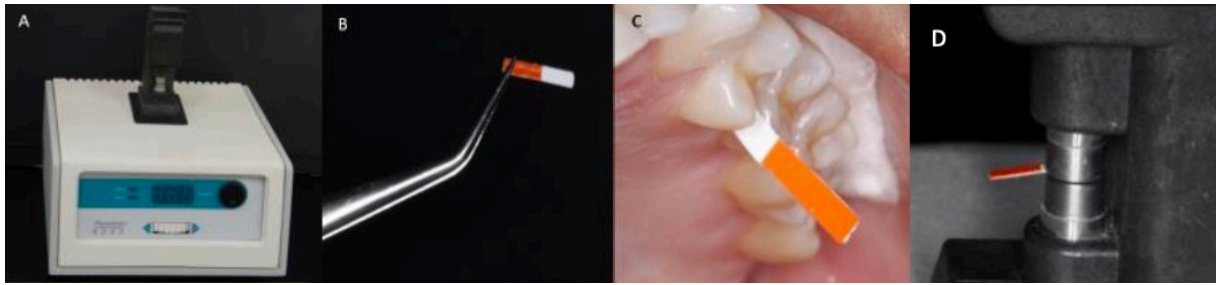
Um dia após o exame clínico inicial, foi realizada a coleta de amostras do FCG. Foram obtidas amostras de FCG de pelo menos 6 sítios, se possível não adjacentes, sendo dois sítios com saúde e quatro sítios apresentando sinais clínicos de periodontite, incluindo, 2 sítios com perda de inserção moderada, PS = 4-5 mm, SS e

NCI \geq 4 mm e de 2 sítios com perda de inserção avançada, PS \geq 6 mm, SS e NCI \geq 6 mm. A coleta de FCG foi realizada utilizando tiras de papel absorvente (Periopaper[®], Oraflow Inc., Nova Iorque, EUA), ilustrado na figura 1.

Antes da coleta do FCG, a placa supragengival do dente selecionado era removida com gaze estéril e o mesmo era isolado com roletes de algodão e gentilmente seco com jato de ar. Em seguida, a tira de papel era inserida na bolsa periodontal de forma cuidadosa e removida após 30 segundos. As tiras de papel que se mostraram visualmente contaminadas com saliva e/ou sangue eram descartadas. O volume de FCG coletado foi mensurado imediatamente após a coleta, por meio de aparelho específico (Periotron 8000 - Oraflow Inc., Nova Iorque, EUA), que foi calibrado com base no protocolo descrito anteriormente⁴ (calibração do Periotron 8000 por regressão polinomial) (Figura 2, tabela 1). As amostras de cada sítio selecionado foram armazenadas em um tubo eppendorf estéril e seco previamente codificado e, em seguida, congeladas a -80°C , para posterior análise imunológica.

Após realização da coleta inicial de FCG (baseline), foi realizado o tratamento periodontal não-cirúrgico por meio da raspagem e alisamento radicular (RAR), sob anestesia local com utilização de instrumentos manuais e ultra-sônicos, por hemi-arco (a depender da complexidade do caso), começando pelos sítios com maior profundidade de sondagem. Durante o tratamento periodontal era feita a orientação de higiene oral adequada e, se necessário, reforço nessa orientação durante as outras consultas. O tratamento periodontal foi realizado por um especialista. Uma nova coleta de FCG dos dentes selecionados foi realizada após um mês do término do tratamento periodontal não-cirúrgico¹. Os parâmetros clínicos também foram reavaliados 1 mês após término do tratamento (Figura 3).

Figura 1- Coleta do FCG com utilização de tiras de papel absorvente



A) Periotron 8000®; B) Filtro de papel antes da coleta; C) Filtro de papel em posição durante a coleta; D) Mensuração do volume coletado de FCG.

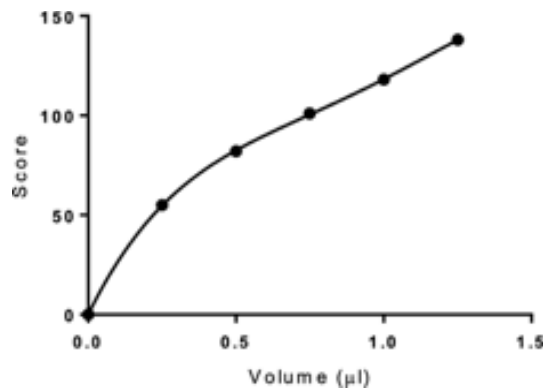
Fonte: Kahena Soldati⁵, p.110, 2020.

Tabela 1 - Valores de referência utilizados para construção da curva padrão

Volume (ul)	Leitura Periotron
0.00	0
0.25	55
0.50	82
0.75	101
1.00	118
1.25	138

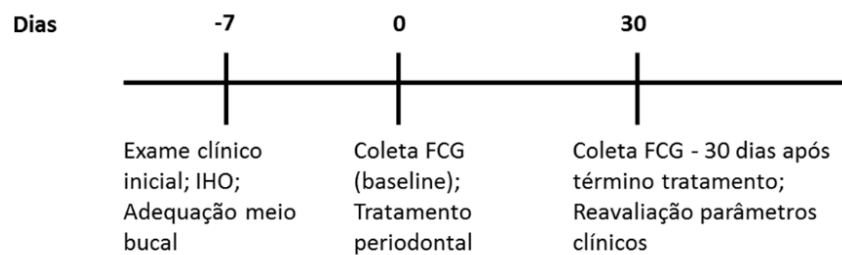
Fonte: Adaptado de Kahena Soldati⁵, p.110, 2020.

Figura 2 - Curva padrão do Periotron ($r = 0.9999$ - Regressão Polinomial de 4a ordem)



Fonte: Kahena Soldati⁵, p.111, 2020.

Figura 3- Fluxograma representando o delineamento do estudo clínico



Fonte: Elaboração própria.

1.4 Quantificação das beta-defensinas – ELISA

Amostras de proteína total foram extraídas do fluido crevicular gengival coletado por meio do periopaper, conforme descrito anteriormente, utilizando 1x Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Thermo Fisher). 150 µL do PBS foram adicionados ao eppendorf, contendo o periopaper, e foi seguido o seguinte protocolo de diluição das amostras: 1) os eppendorfs, já contendo o PBS 1x, foram agitados em um mixer dentro da geladeira por 30 minutos; 2) centrifugação dos eppendorfs a 13.000 rotações por minuto (RPM) a 4°C por 10 minutos; 3) Remoção do periopaper do eppendorf, deixando apenas o volume das amostras já diluídas; 4) eppendorfs passaram por vórtex, por 30 segundos, e o conteúdo dividido em dois eppendorfs (de acordo com o volume pré-estabelecido para cada defensina a ser avaliada) e armazenados à -80°C.

Os níveis de HBD-1, 2 e 3 no FCG foram medidos utilizando o ensaio ELISA sanduíche, de acordo com as diretrizes do fabricante (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA). A absorbância foi medida por um espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm (VersaMax, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Os níveis de PAMs (HBD-1, HBD-2 e HBD-3) em cada amostra foram determinados utilizando os valores de concentração dos padrões incluídos no conteúdo do kit. A faixa de detecção de HBD-1 foi de 7,8 a 500 pg/mL, HBD-2 de 15, 62 a 1.000 pg/mL e HBD-3 foi de 63 a 4.000 pg/mL. A quantidade de proteína em cada amostra foi extrapolada com base na curva padrão e as concentrações são relatadas em pg/30 segundos.

1.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, EUA). Os dados numéricos de todos os pacientes, referentes aos parâmetros clínicos e imunológicos (quantificação níveis peptídeos antimicrobianos) foram organizados em tabelas e foi realizado a análise estatística específica para cada um, possibilitando a avaliação criteriosa dos resultados de antes e após o tratamento periodontal não-cirúrgico. Foi aplicado teste normalidade para verificar distribuição dos dados de acordo com teorema da distribuição central. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

2 ESTUDO IN VITRO

A seguir, descrevemos a metodologia seguida para os experimentos in vitro, que avaliou o efeito do estímulo das células epiteliais (TIGKs) com HBD-2. Esse efeito modulatório do estímulo com HBD-2 foi avaliado a partir da expressão dos marcadores inflamatórios IL-8, CCL20 e seus receptores CCR6, CXCR1 e CXCR2. Além disso, inicialmente, avaliamos a expressão dessas mesmas moléculas e da própria hBD-2, perante ao estímulo das células epiteliais (TIGKs) com as bactérias: *F. alocis* (*F.a.*), *A. actinomycetemcomitans* (*A.a.*), *P. gingivalis* (*P.g.*) and *T. denticola* (*T.d.*).

2.1 Condições de cultura das células

As células epiteliais hTERT TIGKs CRL-3397 foram obtidas da ATCC, certificadas como isentas de micoplasma e foram utilizadas para cultura. As células foram cultivadas em KBM™ Gold™ Basal Medium com KGM™ Gold™ SingleQuots™ Supplement, contendo: hidrocortisona, transferrina, epinefrina, GA-1000, BPE, HEGF, insulina, da Lonza Bioscience e cultivadas numa incubadora humidificada a 37 °C com 5% de CO₂, conforme indicado pelos fornecedores. A contaminação por micoplasma foi verificada regularmente. As células foram cultivadas (1 × 10⁵ células/poço) em placas de cultura de 6 poços e cultivadas até 70-80% de confluência. O meio foi mudado de dois em dois dias e 24 horas antes da estimulação. As bactérias periodontopatogênicas *Filifactor alocis* (*F.a.*) (ATCC 25586), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) (ATCC 43718), *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) (ATCC 33277) e *Treponema denticola* (*T.d.*) (ATCC 35405) foram utilizadas em diferentes concentrações (densidade ótica, D.O.660 = 0,050 e 0,100) para simular a infecção microbiana in vitro. As células foram estimuladas com HBD-2 (50 µg - Peprotech- Número de catálogo: 300-49) em concentrações de 2,5 e 5 µg/mL, por um período de 24 horas, para ambas as concentrações, consistente com estudos anteriores in vitro^{6,7}. Além disso, as células foram pré-incubadas com anticorpo monoclonal anti-receptor toll-like humano (TLR2) (10 µg/ml, eBioscience, San Diego, CA, EUA), um inibidor específico da sinalização de TLR-2, sendo esta estimulação realizada sempre uma hora antes do estímulo com bactérias. As células não tratadas serviram de controle.

2.2 Real-Time qPCR

Logo após o estímulo, foram realizadas coleta, extração de RNA, realização de cDNA e PCRs dos experimentos. O isolamento do RNA foi realizado utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Para determinar a concentração de RNA, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). Quinhentos ng de RNA total foram transcritos reversamente usando o kit de síntese de cDNA iScript Select (Bio-Rad Laboratories, Munique, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Análise da expressão gênica de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), beta-defensina-2 (hBD-2), ligante de quimiocina 20 (CCL20), receptor de quimiocina 6 (CCR6), ligante de quimiocina 8 (CXCL8) e receptor de quimiocina (CXCR1 e CXCR2) foi realizado por PCR em tempo real usando o termociclador de PCR CFX96 (Bio-Rad Laboratories), master mix de PCR verde SYBR (QuantiFast SYBR Green PCR Kit, Qiagen) e primers específicos (QuantiTect Primer Assay, Qiagen). Um μL de cDNA foi misturado com 12,5 μL de master mix, 2,5 μL de primer e 9 μL de água livre de nuclease. A mistura foi aquecida a 95°C durante 5 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 s, e uma etapa combinada de recozimento/extensão a 60°C durante 30 s. Os dados foram analisados pelo método do ciclo de limiar comparativo.

2.3 Determinação do nível proteico - ELISA

Os níveis proteicos de IL-8 (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), HBD-2 (Human BD-2 Standard ABTS ELISA Development Kit, Catálogo n.º 900- K172, PeproTech, Cranbury, NJ, EUA) e CCL20 (Human CCL20/MIP-3 alpha DuoSet ELISA, Catálogo n.º DY360, R&D Systems) nos sobrenadantes celulares, foram medidos utilizando kits ELISA disponíveis no mercado, de acordo com as instruções do fabricante. A densidade ótica foi determinada utilizando um leitor de microplacas (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) regulado para 450 nm. As leituras a 450 nm foram subtraídas das leituras a 540 nm para correção ótica, de acordo com as recomendações do fabricante. O número de células foi verificado e não se registaram diferenças significativas entre os grupos.

2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism (versão 9.2.0, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para a análise dos dados, foram calculados os valores médios e os erros padrão da média (EPM). Os dados foram verificados quanto à distribuição normal e, posteriormente, analisados com o teste t (paramétrico) ou o teste Mann-Whitney-U (não paramétrico). Para comparações múltiplas, foi aplicado ANOVA ou o teste de Kruskal Wallis, dependendo da distribuição normal. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$ para todos os experimentos.

REFERÊNCIAS

1. Madruga D, Garcia MM, Martino L, Hassan H, Elayat G, Ghali L, Ceballos L. 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; 23(1): 335.
2. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018; 45(Suppl 20): S1-S8.
3. Animo J, Bay I. Problems and proposal for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975; 25(4): 229-35.
4. Ciantar M, Caruana DJ. Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *Journal of periodontal research*. 1998; 33(5): 259-64.
5. Soldati K. Peptídeos antimicrobianos e doença periodontal: influência do tabagismo na expressão de peptídeos antimicrobianos e possíveis efeitos de peptídeos sintéticos sobre biofilmes multi-espécies [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.
6. Li J, Zhu HY, Beuerman RW. Stimulation of specific cytokines in human conjunctival epithelial cells by defensins HNP1, HBD2, and HBD3. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50(2): 644-53.
7. Ghosh SK, Gupta S, Jiang B, Weinberg A. *Fusobacterium nucleatum* and human beta-defensins modulate the release of antimicrobial chemokine CCL20/macrophage inflammatory protein 3 α . *Infect Immun*. 2011; 79(11): 4578-87.

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



CÂMPUS DE ARARAQUARA FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Pesquisa: **“Efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico nos níveis de peptídeos antimicrobianos no fluido crevicular gengival em pacientes com periodontite crônica”**. Pesquisador responsável: Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você, (nome) _____, (nacionalidade) _____, (profissão) _____, portador(a) do RG _____, CPF _____, residente à Rua/Av. _____, na cidade de _____, Estado de _____

, a participar voluntariamente da pesquisa intitulada: **“Efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico nos níveis de peptídeos antimicrobianos no fluido crevicular gengival em pacientes com periodontite crônica”**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos. Para isso convidamos você a assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com a finalidade de autorizar sua participação voluntária na pesquisa, considerando que você recebeu as explicações necessárias para a sua tomada de decisão livre e espontânea vontade.

1. A doença periodontal é uma doença que ocorre nos dentes, gengiva e osso, podendo levar a uma inflamação da gengiva, sangramento, vermelhidão, inchaço, dor e perda progressiva do osso em volta dos dentes. O objetivo deste estudo é investigar o efeito do tratamento de raspagem e alisamento das raízes dos dentes (tratamento periodontal não-cirúrgico) sobre os níveis de proteínas com efeito antibacteriano presentes no fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e a superfície do dente). Espera-se obter uma redução nos níveis dessas proteínas, que são componentes importantes do sistema de defesa do indivíduo.
2. Ao concordar em participar da pesquisa você será solicitado a comparecer em diversas consultas odontológicas (em torno de 8 consultas – com duração de 2 horas – no período de 3 meses) na Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, onde será preenchida uma ficha com os dados pessoais e clínicos (anamnese e exame clínico) do(a) participante, serão fornecidas instruções de higiene oral adequada e será realizado tratamento odontológico dos dentes e da gengiva (com materiais odontológicos apropriados esterilizados e equipamentos de proteção individual). Será realizada a coleta de fluido do sulco gengival de pelo menos dois dentes da cavidade bucal antes e após a realização do tratamento.
3. Você recebeu informações de haver riscos mínimos, semelhantes aos riscos de um tratamento periodontal convencional, e não causam prejuízo a condição bucal do (a) participante. O tratamento e a coleta de material biológico serão realizados por um pesquisador (cirurgião-dentista) que possui conhecimento e habilidade manual para desempenhá-los, que irá utilizar todos os equipamentos de proteção individual (máscara, gorro, avental, óculos e luvas).

4. Aproveitamos para informar que seu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a sua privacidade.
5. Estará garantida sua indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.
6. Você tem direito a solicitar ressarcimento, inclusive para seu acompanhante, para participar da pesquisa, caso julgue necessário.
7. Gostaríamos de informá-lo que sua participação é voluntária nesta pesquisa, e que terá o direito de interrompê-la em qualquer momento sem sofrer penalizações. A desistência ou não aceitação em fazer parte desta pesquisa não irá interferir na continuidade do tratamento na Clínica de Periodontia. Após a conclusão do tratamento, o(a) participante será incluído em um programa de manutenção periodontal.
8. Gostaríamos ainda de solicitar sua autorização para uso, divulgação e publicação em revistas científicas dos dados obtidos nesta pesquisa, respeitando o item 4.
9. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, você poderá entrar em contato com a Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos pelo telefone (16) 3301-6508.
10. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Desta forma, confirmo que recebi de maneira clara, todas as informações necessárias ao meu consentimento e que me foi concedido tempo necessário antes da tomada de decisão de participação na presente pesquisa. Assim, informo que irei participar desta pesquisa por livre e espontânea vontade.

Araraquara, _____ de _____ de 20 .

Assinatura do voluntário

Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome do responsável pela pesquisa: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim- Barcelos
Contato: Rua Humaitá, 1680/ telefone: 3301-6508

Comitê de Ética em Pesquisa da FOAr
Contato: Rua Humaitá, 1680/ telefone: 3301-6459

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico nos níveis de peptídeos antimicrobianos no fluido crevicular gengival em pacientes com periodontite crônica

Pesquisador: Daniela Leal Zandim-Barcelos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 96972718.2.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.896.370

Apresentação do Projeto:

Os peptídeos antimicrobianos são importantes componentes da reposta imune inata e podem apresentar um papel chave na suscetibilidade ou resistência a doenças na cavidade oral. Pesquisas já realizadas por nosso grupo de pesquisa mostraram que há uma diferença nos níveis de peptídeos antimicrobianos em sítios com saúde e doença periodontal. Assim, o objetivo deste estudo longitudinal é avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre os níveis de peptídeos antimicrobianos no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com periodontite crônica (PC). Vinte pacientes com boas condições de saúde geral, portadores de periodontite crônica, serão incluídos neste estudo. Estes pacientes deverão apresentar pelo menos 2 sítios com profundidade de sondagem (PS) 5 mm, sangramento à sondagem (SS) e nível clínico de inserção (NCI) 4 mm em quadrantes distintos. Inicialmente, os seguintes parâmetros clínicos serão avaliados: índice de Placa Visível (IPV), Índice de Sangramento Gengival (ISG), PS, SS e NCI. Após uma semana do exame clínico, será feita coleta do FCG dos dentes selecionados para o estudo. Em seguida, um único operador irá realizar o tratamento periodontal não-cirúrgico por meio raspagem e alisamento radicular (RAR). Após uma semana, 1 e 3 meses do término do tratamento periodontal não-cirúrgico, serão realizadas novas coletas do FCG dos dentes previamente selecionados. Os parâmetros clínicos serão reavaliados 1 e 3 meses após tratamento. A

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

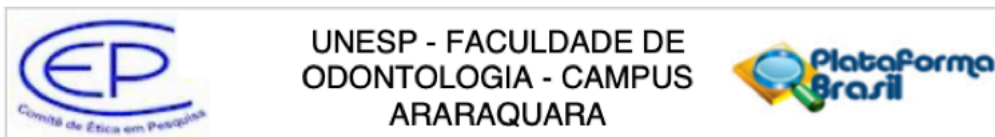
UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.896.370

quantificação dos peptídeos antimicrobianos no FCG será feita pela técnica ELISA sanduíche, seguindo as recomendações do fabricante de cada kit. Serão realizadas análises estatística apropriadas, de acordo com distribuição dos dados, para comparação dos dados clínicos e imunológicos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre os níveis de peptídeos antimicrobianos no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes portadores de periodontite crônica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O estudo apresenta riscos mínimos, uma vez que os procedimentos de intervenção são procedimentos realizados rotineiramente na prática clínica odontológica. Todos os procedimentos clínicos serão realizados de acordo com protocolos rígidos e seguindo todas as normas de biossegurança. A coleta de fluido gengival é um procedimento simples, indolor e não invasivo, feito com papel absorvente estéril.

Benefícios: Todos os participantes receberão tratamento periodontal de todos os sítios acometidos. Após realização dos tratamentos, todos os pacientes serão incluídos em um programa de manutenção regular, com realização de profilaxia profissional mensal nos três primeiros meses e a cada três meses até completar 1 ano de acompanhamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem delineada e é possível desenvolvê-la em 3 anos, como proposto. Apenas não há menção quanto à realização prévia do tamanho amostral a fim de determinar se um n=20 pacientes é suficiente para se obter resultados confiáveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

No item 1 do TCLE, o objetivo deve ser escrito com termos que um participante leigo possa compreender.

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminhe-se ao pesquisador para atender as recomendações acima, com as seguintes orientações da CONEP:

1) Solicitamos aos pesquisadores que enviem anexa Carta Resposta, na qual sejam apresentadas como foram atendidas cada uma das pendências.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

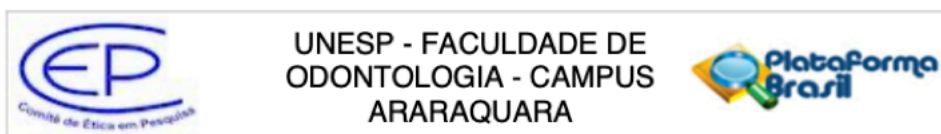
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

Município: ARARAQUARA

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.896.370

2) Além disso, cada alteração deve ser realçada (na cor amarela) nos documentos anexados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1143098.pdf	24/07/2018 11:18:48		Aceito
Outros	Cartacomite.pdf	24/07/2018 11:18:27	Daniela Leal Zandim-Barcelos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Cartacumprimentonormascomite.pdf	24/07/2018 11:18:11	Daniela Leal Zandim-Barcelos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOFINAL.pdf	24/07/2018 11:18:03	Daniela Leal Zandim-Barcelos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	24/07/2018 10:15:04	Daniela Leal Zandim-Barcelos	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	12/07/2018 14:35:52	Daniela Leal Zandim-Barcelos	Aceito
Outros	CARTALAB.pdf	12/07/2018 14:35:42	Daniela Leal Zandim-Barcelos	Aceito
Outros	CARTACLIN.pdf	12/07/2018 14:35:26	Daniela Leal Zandim-Barcelos	Aceito
Folha de Rosto	FOLHAROSTO.pdf	12/07/2018 14:34:48	Daniela Leal Zandim-Barcelos	Aceito
Cronograma	CronogramaProjeto.pdf	12/07/2018 10:46:33	Daniela Leal Zandim-Barcelos	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 14 de Setembro de 2018

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de
defesa**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 27 de março de 2024.

Lorena Silva Gutierrez