



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



**Ana Carolina Monachini Marcantonio**

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

**Araraquara**

**2018**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Ana Carolina Monachini Marcantonio**

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

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

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Leal Zandim-Barcelos

**Araraquara**

**2018**

Marcantonio, Ana Carolina Monachini

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

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

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

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

**Ana Carolina Monachini Marcantonio**

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

**Comissão julgadora**

**Dissertação para obtenção do grau de mestre em Periodontia**

Presidente e orientador Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Leal Zandim-Barcelos

2º Examinador Prof. Dr. Rafael Silveira Faeda

3º Examinador Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara, 16 de março de 2018.

## **DADOS CURRICULARES**

**Ana Carolina Monachini Marcantonio**

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

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

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao meu cunhado Felipe que sempre está me ajudando.

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

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

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

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

Aos professores do mestrado por dividirem seus ensinamentos.

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

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

## **RESUMO**

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

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

## SUMÁRIO

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

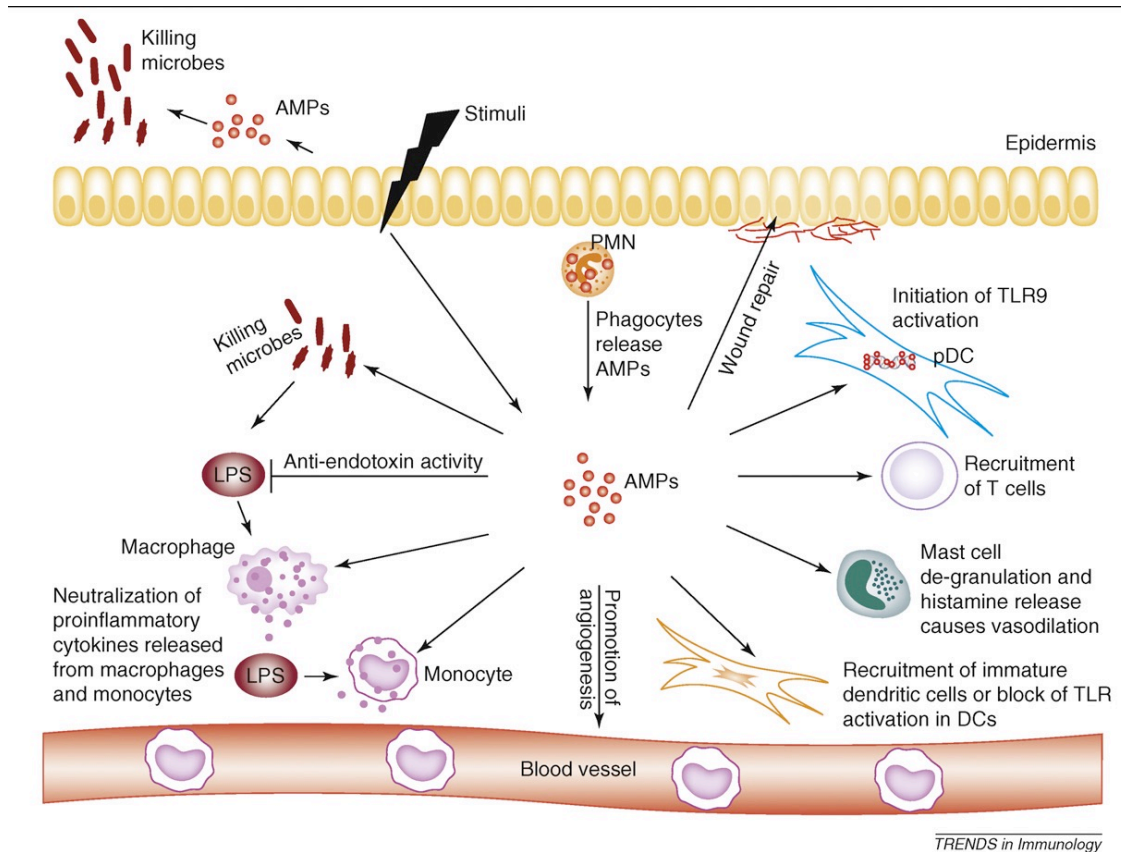
## 1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa de patogênese complexa que se caracteriza clinicamente pela destruição dos tecidos de suporte do dente. O principal fator etiológico da doença periodontal são as bactérias periodontopatogênicas<sup>1</sup>. No entanto, sua instalação, progressão e severidade depende de uma combinação de fatores que envolve o hospedeiro, o agente microbiano, hábitos de higiene oral, fatores ambientais e genéticos. Entre esses fatores ambientais, pode-se citar o fumo como importante fator de risco para a doença periodontal<sup>2</sup>.

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

De maneira geral, o fumo parece inibir a defesa do hospedeiro contra infecções microbianas enquanto promove ou aumenta a reação inflamatória<sup>8</sup>. Porém, o impacto do fumo e de seus produtos, como a nicotina e cotinina, na resposta imune inata local, em particular na expressão de peptídeos antimicrobianos, ainda não está totalmente definido<sup>9</sup>. Os peptídeos antimicrobianos são componentes essenciais da imunidade inata e permitem que os seres humanos resistam à infecção por microrganismos. Estes peptídeos são encontrados principalmente em fagócitos e células epiteliais, mostrando uma atividade direta contra uma ampla gama de agentes microbianos. Embora a deficiência, desregulação, ou superprodução destes peptídeos antimicrobianos não seja a causa direta de uma doença, numerosos estudos já forneceram evidências convincentes do envolvimento dos mesmos na complexa rede de respostas imunes em doenças inflamatórias. Eles são capazes de influenciar diversos processos, dentre eles a liberação de citocinas e quimiocinas, quimiotaxia, apresentação de antígeno, angiogênese, degranulação de mastócitos, reparação de feridas e modulação da resposta de células dendríticas ou células T<sup>10,11</sup>. Desta forma, os peptídeos antimicrobianos funcionam como uma ponte entre imunidade inata e adaptativa<sup>10,11</sup>.

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



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

Fonte: Lai e Gallo, 2009<sup>10</sup>, p.135.

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

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

intramoleculares: alfa-defensinas ou beta-defensinas (hBDs). As alfa-defensinas podem ser subdivididas em defensinas presentes nos grânulos de neutrófilos (HNP 1-4) e defensinas presentes nas células de Paneth do intestino delgado (HD 5 e HD 6). HNP 1-3 também estão presentes em monócitos e células natural killer. As hBDs são produzidas pelas células epiteliais de uma variedade de tecidos e órgãos, incluindo pele, traqueia, sistema urogenital, fígado, pâncreas e outros<sup>12, 13</sup>. Na cavidade bucal, as hBDs estão expressas na gengiva, língua, glândulas salivares e mucosa, podendo ser encontradas na saliva e fluido crevicular gengival. Apesar da identificação genômica de diferentes hBDs em humanos, aproximadamente 28 tipos, as hBDs 1-4 são as mais estudadas<sup>14</sup>.

As hBDs estão localizadas em diferentes sítios do tecido gengival. As hBDs 1 e 2 estão localizadas no epitélio estratificado suprabasal e nas camadas mais externas do epitélio, adjacentes à região de formação da placa na superfície dental e no epitélio sulcular inflamado, o que é consistente com a formação da barreira epitelial<sup>13</sup>. Por outro lado, as hBDs 1 e 2 não são detectadas no epitélio juncional. Enquanto a hBD 2 está localizada nos estratos mais diferenciados do epitélio oral (granuloso e espinhoso), a hBD 3 está localizada no estrato basal menos diferenciado, nos queratinócitos, células de Langerhans e células de Merkel, sugerindo que a hBD 3 pode facilitar a comunicação entre os tecidos gengival e conjuntivo, servindo como elo de ligação entre as respostas imune inata e adaptativa<sup>14,15</sup>.

Uma notável diferença na expressão de hBDs 2 e 3 foi verificada entre o epitélio oral e a maioria dos outros epitélios. Estas defensinas estão expressas apenas na presença de infecção ou inflamação na maioria dos tecidos, incluindo epitélio da pele, intestino e traqueia<sup>16,17</sup>. Porém, tanto a hBD 2 como a hBD 3 estão presentes no tecido gengival normal sem inflamação<sup>13</sup>.

Uma expressão significativamente maior de hBD 2 foi encontrada no epitélio gengival de indivíduos periodontalmente saudáveis em comparação com tecidos clinicamente saudáveis de pacientes com periodontite crônica. Além disso, foi verificado que as hBDs 1 e 2 estavam expressas em um nível mais elevado no epitélio da bolsa periodontal do que no epitélio gengival saudável adjacente<sup>15</sup>.

Em um estudo envolvendo amostras de tecido gengival de pacientes com gengivite, periodontite agressiva e periodontite crônica, foram observadas expressões distintas dos genes hBD 1 e hBD 2<sup>18</sup>. A expressão das hBDs 1 e 2 foram menores nos tecidos gengivais de pacientes com gengivite do que nos tecidos de controles

saudáveis. Por outro lado, a expressão de hBD 1 foi reduzida e a de hBD 2 foi aumentada em pacientes com periodontite agressiva em comparação com controles saudáveis. Pacientes com periodontite crônica, por sua vez, apresentaram níveis mais elevados de hBD 1 em comparação com controles saudáveis, sugerindo que embora esses níveis mais elevados de hBD 1 possam ter oferecido um efeito protetor, eles não foram suficientes para evitar a infecção e destruição periodontal. O aumento da expressão de hBD 2 em pacientes com periodontite agressiva pode ser causada pela estimulação deste peptídeo antimicrobiano por *A. actinomycetemcomitans*. Este microorganismo foi capaz de estimular a expressão hBD-mRNA em queratinócitos orais humanos in vitro<sup>19</sup>.

Alguns estudos têm demonstrado que o cigarro pode comprometer a resposta imune inata mediada por células epiteliais contra patógenos. Fumantes e ex-fumantes apresentaram uma redução significativa nos níveis de hBD 2 no fluido da faringe e no escarro de pacientes com pneumonia aguda comparado com não fumantes. Além disso, foi verificado que exposição ao cigarro reduziu in vitro a expressão de hBD 2 pelas células do epitélio das vias aéreas em resposta ao estímulo bacteriano<sup>20</sup>.

O extrato de fumaça de cigarro e a nicotina (0.1 a 1 mM) suprimiram a expressão de hBD 2 e aumentaram a produção de IL-8 pelas células epiteliais do tecido gengival humano<sup>21</sup>. Este mecanismo imune-modulador do cigarro foi então considerado como um possível mecanismo associado à ocorrência e severidade da doença periodontal em pacientes fumantes. O desequilíbrio da homeostasia oral provocado pela supressão de hBD 2 e aumento da liberação de IL-8 favorece a invasão de patógenos periodontais e aumenta o processo de inflamação crônica que é característico da periodontite<sup>21</sup>.

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

Uma correlação negativa foi encontrada entre os níveis salivares de LL-37, um peptídeo antimicrobiano produzido por neutrófilos, e cotinina sugerindo que o tabagismo ou a longa exposição ao tabaco pode resultar em redução dos níveis de LL-37 na cavidade oral e aumentar o risco de periodontite<sup>23</sup>.

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

tabagismo nos níveis de hBD 3 em pacientes com periodontite crônica, conforme verificado em uma recente revisão de literatura<sup>9</sup>, propomos o presente estudo com a seguinte hipótese principal: produtos tóxicos do cigarro promovem uma redução nos níveis de hBD 3 no fluido crevicular gengival afetando a interação microbiota-hospedeiro.

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo principal deste estudo foi determinar a influência do tabagismo nos níveis de hBD 3 no fluido crevicular gengival de indivíduos portadores de periodontite crônica e avaliar a relação deste peptídeo com saúde e doença periodontal. O objetivo secundário foi investigar a correlação deste peptídeo antimicrobiano com marcadores biológicos presentes no fluido crevicular gengival como a metaloproteinase da matriz 8 (MMP-8), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 10 (IL-10), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

### 3 PUBLICAÇÃO

Os resultados deste estudo foram apresentados na forma de um artigo, informado a seguir.

#### 3.1 Publicação 1\*

##### **Influência do tabagismo nos níveis de hBD 3 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica\***

Ana Carolina Monachini Marcantonio<sup>1</sup>, Kahena Rodrigues Soldati<sup>1</sup>, Felipe de Almeida Toledo<sup>1</sup>, Carlos Rossa Júnior<sup>1</sup>, Daniela Leal Zandim-Barcelos<sup>1</sup>

1- Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara, SP, Brasil

**Running title:** Níveis hBD 3 em fumantes e não fumantes com periodontite

#### **Corresponding author**

Daniela Leal Zandim-Barcelos  
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia  
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP  
Rua Humaitá 1680  
Cep 18801-903  
Centro, Araraquara, SP – Brasil. Telefone: +55 16 33016508  
e-mail: [danielalzandim@foar.unesp.br](mailto:danielalzandim@foar.unesp.br)

---

\*Artigo será submetido à revista Journal of Periodontal Research.

## INTRODUÇÃO

Os peptídeos antimicrobianos, como as beta-defensinas (hBDs), são componentes do sistema imune inato que exercem uma forte atividade antimicrobiana. Além disso, as hBDs têm mostrado uma comunicação direta com o sistema imune adaptativo, interagindo com quimiocinas específicas e com receptores Toll-like, resultando na modulação da resposta de células imunocompetentes do hospedeiro (1, 2). Assim, além do efeito antimicrobiano, as hBDs regulam a proliferação de células epiteliais, aumentam a fagocitose por macrófagos, são quimioatraentes para monócitos, macrófagos, linfócitos T e mastócitos, suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias para antígenos microbianos específicos, ativam e promovem a degranulação de mastócitos, regulam o sistema complemento, e aumentam a resposta imune adaptativa (3, 4).

Como o epitélio corresponde à barreira primária contra infecções microbianas, as hBDs exercem um papel importante na proteção dos tecidos periodontais. A hBD 3 é um peptídeo expresso pelas células epiteliais após estímulo por uma variedade de fatores microbianos e do hospedeiro, como os patógenos periodontais (5). Estudos prévios demonstram que a hBD 3 exerce uma rápida atividade bactericida contra uma grande variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo aquelas associadas à doença periodontal, e também contra *Candida albicans* (6, 7).

O tabagismo é considerado um importante fator de risco para a doença periodontal (8). De maneira geral, o fumo parece inibir a defesa do hospedeiro contra infecções microbianas enquanto promove ou aumenta a reação inflamatória (9). Porém, o impacto do fumo e de seus produtos tóxicos na resposta imune inata, em particular na expressão de peptídeos antimicrobianos, ainda não está totalmente definido (10).

Estudos in vitro têm indicado que o tabagismo pode afetar a expressão de peptídeos antimicrobianos. O extrato de fumaça de cigarro e a nicotina suprimiram a expressão de hBD 2 pelas células epiteliais do tecido gengival humano (11) e uma redução na expressão de hBD 2 foi observada em queratinócitos humanos previamente estimulados com nicotina ou estimulados simultaneamente com nicotina e TNF- $\alpha$  (12). Por outro lado, resultados contraditórios também têm sido relatados na literatura. Um aumento na expressão de hBD 2 foi observado em queratinócitos humanos estimulados com nicotina (13) e um aumento na expressão das hBDs 2 e

3 foi verificado após exposição de células epiteliais do tecido gengival à fumaça do cigarro (14).

Uma correlação negativa foi encontrada entre os níveis salivares de LL-37, um peptídeo antimicrobiano produzido por neutrófilos, e cotinina sugerindo que o tabagismo ou a longa exposição ao tabaco pode resultar em redução dos níveis de LL-37 na cavidade oral e aumentar o risco de periodontite (15). Uma redução significativa nos níveis de LL-37 também foi observada no fluido crevicular gengival de pacientes fumantes com periodontite em comparação com não fumantes (16).

Conforme verificado em uma recente revisão da literatura (10), ainda não há estudos clínicos avaliando a influência do tabagismo nos níveis de hBD 3 em pacientes com periodontite crônica. Tendo em vista o papel fundamental das beta-defensinas na resposta imune do hospedeiro, o presente estudo foi realizado com intuito de determinar a influência do tabagismo nos níveis de hBD 3 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite crônica e avaliar a relação deste peptídeo com saúde e doença periodontal. Além disso, foi investigada a correlação deste peptídeo antimicrobiano com marcadores biológicos presentes no fluido crevicular gengival como a metaloproteinase da matriz 8 (MMP-8), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 10 (IL-10), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CAAE 01394712.5.0000.5416) (Anexo A).

### ***População do estudo***

Um total de 40 indivíduos com periodontite crônica moderada, sendo 20 fumantes e 20 não fumantes, e 20 indivíduos sem doença periodontal foram incluídos neste estudo transversal. Assim, três grupos distintos foram constituídos: sem doença periodontal (S), periodontite fumante (PF) e periodontite não fumante (PNF).

Os indivíduos com periodontite crônica deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais e pelo menos 4 sítios com profundidade de sondagem (PS)  $\geq$  5 mm, sangramento à sondagem (SS) e nível clínico de inserção (NCI)  $\geq$  5 mm em dentes

não adjacentes, com exceção dos terceiros molares. Os indivíduos sem doença periodontal deveriam apresentar no mínimo 24 dentes naturais, PS  $\leq$  3 mm, ausência de perda de inserção, índice de placa visível (IPV) e índice de sangramento gengival (ISG)  $\leq$  15%. O hábito de fumar foi investigado por meio de um questionário. Pacientes fumantes deveriam fumar pelo menos 10 cigarros/dia por pelo menos 5 anos consecutivos e os pacientes não fumantes nunca poderiam ter fumado. Os critérios de exclusão adotados foram: histórico de doença sistêmica e/ou desordem imunológica, gestantes e lactantes, tratamento periodontal nos últimos seis meses e uso de antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 3 meses.

Os participantes deste estudo foram recrutados na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP no período de março de 2016 a abril de 2017. Todos os indivíduos foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

### ***Exame clínico periodontal***

A condição clínica periodontal foi determinada por meio dos parâmetros IPV, ISG, PS, SS e NCI. Os parâmetros IPV e ISG foram avaliados em quatro sítios por dente e os demais em seis sítios por dente, com exceção dos terceiros molares. O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador, previamente treinado e calibrado ( $\kappa=0,91$ ). A sondagem dos dentes foi realizada com uma sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (Hu-friedy<sup>®</sup>, Chicago, IL, EUA).

### ***Seleção dos sítios e coleta de amostras de fluido crevicular gengival (FCG)***

Foram coletadas amostras de FCG de sítios sadios (n=4) e doentes (n=4) dos pacientes com periodontite crônica (8, 9) e apenas de sítios sadios (n=4) dos pacientes com ausência de doença periodontal. A seleção dos sítios foi feita de forma aleatória em dentes distintos e não adjacentes. Os sítios sadios deveriam apresentar ausência de sangramento gengival, PS  $\leq$  3 mm e ausência de SS, enquanto os sítios doentes deveriam ter sangramento gengival, PS  $\geq$  5 mm, NCI  $\geq$  5 mm e presença de SS.

As amostras de FCG foram coletadas por um único examinador uma semana após a realização dos exames clínicos. Os sítios selecionados foram isolados com roletes de algodão, gentilmente secos com jato de ar e, se houvesse a presença de placa supragengival, a mesma era removida com cureta estéril. Tiras de papel absorvente (Periopaper<sup>®</sup>, Oraflow Inc., Nova Iorque, EUA) foram inseridas no sulco ou

na bolsa periodontal até uma leve resistência ser sentida, sendo removidas após 30 segundos. Tiras de papel contaminadas com sangue foram descartadas. O volume total de FCG coletado com cada tira de papel absorvente utilizada foi mensurado com um aparelho previamente calibrado (Periotron 8000 - Oraflow Inc.). As amostras de FCG representativas de uma mesma categoria no indivíduo foram colocadas em um tubo eppendorf previamente codificado e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise laboratorial.

### ***Quantificação da hBD 3***

Para eluição das amostras de FCG presentes nas tiras de papel, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de PBS 1x para cada Periopaper presente no tubo eppendorf. Os tubos foram deixados em gelo no agitador horizontal por 30 minutos e, em seguida, colocados em centrífuga refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ , 13.000 g por 10 minutos (17).

A quantificação de hBD 3 no FCG foi feita pela técnica ELISA sanduíche (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA), seguindo protocolo definido pelo fabricante. A absorbância foi medida por um espectrofotômetro (Multiskar Ascent – Labsystems Uniscience, Vantaa, Finlândia) a 450 nm e convertida na concentração de hBD 3 por amostra de acordo com a curva padrão. O limite de detecção do kit utilizado foi de 63 a 4000 pg/mL.

### ***Quantificação da metaloproteinase da matriz e citocinas***

A detecção dos marcadores biológicos MMP 8, IL-10, IL- $1\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no FCG dos pacientes com periodontite crônica, fumantes e não fumantes, foi realizada por meio de ensaio multiplex baseado em beads magnéticas (Human Premixed Multi-Analyte; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Todos os reagentes, padrões e amostras foram preparados seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada pelo equipamento Bio-plex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

### ***Análise Estatística***

Para análise estatística foi utilizado o software Graphpad Prism 6 (San Diego, CA, EUA) e todos os testes estatísticos foram aplicados ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os dados numéricos foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Como os parâmetros Idade, PS e NCI se distribuíram de acordo com a normalidade, o teste de One-way ANOVA complementado pelo teste de

Tukey foi utilizado para a comparação destes parâmetros entre os grupos. Os níveis de hBD 3 no FCG não apresentaram distribuição normal, assim o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn foi utilizado para comparação dos sítios saudáveis dos grupos S, PF e PNF, e o teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar os sítios doentes entre os grupos PF e PNF. Para comparação dos sítios saudáveis e doentes dentro dos grupos com periodontite (PF e PNF), foi usado o teste Wilcoxon.

Os parâmetros categóricos (gênero, SS, IPV e ISG) foram comparados por testes não paramétricos. A distribuição dos gêneros entre os grupos foi analisada pelo teste exato de Fischer, e a comparação dos parâmetros SS, IPV e ISG entre os 3 grupos foi executada pelo teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn.

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparação dos níveis de marcadores biológicos no FCG entre os grupos PF e PNF, enquanto a comparação dos níveis dos marcadores biológicos entre os sítios saudáveis e doentes dentro destes grupos foi realizada pelo teste Wilcoxon. Uma análise de correlação linear entre os níveis de hBD 3 e dos marcadores biológicos no FCG (correlação de Pearson) foi realizada.

## **RESULTADOS**

### ***Dados demográficos e condição clínica periodontal***

Participaram deste estudo 60 pacientes que apresentavam idade entre 19-72 anos, sendo que 40 pacientes eram do gênero feminino e 20 pacientes eram do gênero masculino. O grupo S apresentou média de idade inferior em relação aos grupos PF e PNF ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os grupos para gênero. Os dados demográficos da população deste estudo estão expostos na Tabela 1.

O grupo S apresentou menor porcentagem de IPV, ISG e SS que os grupos PF e PNF ( $p < 0,0001$ ). A média de PS e NCI no grupo S também foi significativamente menor em relação a PF e PNF ( $p < 0,0001$ ). Não foram detectadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros clínicos avaliados entre os grupos PF e PNF (Tabela 1).

**Tabela 1** – Características demográficas e dados clínicos de boca toda dos participantes do estudo. Os dados paramétricos estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão e os dados não paramétricos estão expressos em média(mediana) $\pm$ desvio padrão.

| Parâmetros          | S<br>(n=20)                         | PF<br>(n=20)             | PNF<br>(n=20)            |
|---------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Idade               | 25,79 $\pm$ 3,95*                   | 43,75 $\pm$ 12,05        | 41,20 $\pm$ 12,47        |
| Gênero (masc/fem)   | 5/15                                | 10/10                    | 5/15                     |
| IPV (%)             | 6,39(7,14) $\pm$ 4,93 <sup>#</sup>  | 34,46(26,85) $\pm$ 23,19 | 31,72(29,43) $\pm$ 15,01 |
| ISG (%)             | 6,56(1,78) $\pm$ 20,03 <sup>#</sup> | 9,03(4,09) $\pm$ 12,77   | 13,50(11,15) $\pm$ 8,08  |
| SS (%)              | 3,56(2,98) $\pm$ 3,36 <sup>#</sup>  | 18,83(12,17) $\pm$ 20,71 | 20,44(15,16) $\pm$ 15,75 |
| PS (mm)             | 1,49 $\pm$ 0,29*                    | 3,2 $\pm$ 0,74           | 3,00 $\pm$ 0,62          |
| PS $\leq$ 3 mm (%)  | 100(100) $\pm$ 0,00 <sup>#</sup>    | 73,00(78) $\pm$ 18,99    | 76,15(77,50) $\pm$ 18,64 |
| PS 4-5 mm (%)       | 0,00(0,00) $\pm$ 0,00 <sup>#</sup>  | 21,70(17) $\pm$ 13,46    | 19,75(18,50) $\pm$ 14,52 |
| PS $\geq$ 6 mm (%)  | 0,00(0,00) $\pm$ 0,00 <sup>#</sup>  | 5,25(1) $\pm$ 8,13       | 4,1(1) $\pm$ 5,78        |
| NCI (mm)            | 1,49 $\pm$ 0,29*                    | 3,51 $\pm$ 0,99          | 3,30 $\pm$ 1,10          |
| NCI $\leq$ 2 mm (%) | 100(100) $\pm$ 0,00 <sup>#</sup>    | 29,65(28) $\pm$ 17,06    | 34,55(38,50) $\pm$ 22,91 |
| NCI 3-4 mm (%)      | 0,00(0,00) $\pm$ 0,00 <sup>#</sup>  | 42,6(47) $\pm$ 14,24     | 43,15(42,50) $\pm$ 16,66 |
| NCI $\geq$ 5 mm (%) | 0,00(0,00) $\pm$ 0,00 <sup>#</sup>  | 27,85(21) $\pm$ 20,84    | 22,35(16) $\pm$ 19,44    |

\* $p < 0,0001$ -Diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos - One-way ANOVA com Tukey

<sup>#</sup> $p < 0,0001$ - Diferença estatisticamente significativa em relação aos outros grupos - Kruskal-Wallis com Dunn;

IPV - Índice de placa visível; ISG - Índice de sangramento gengival; SS - Sangramento a sondagem; PS - Profundidade de sondagem; NCI - Nível clínico de inserção.

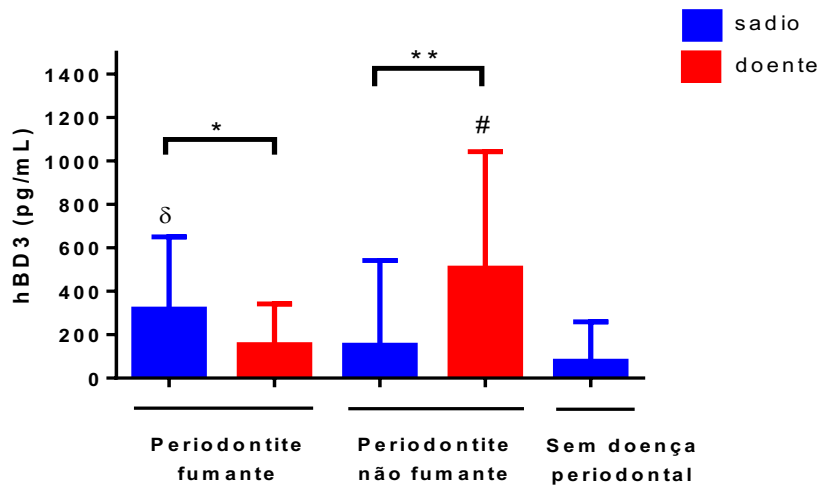
Fonte: Elaboração própria.

### Quantificação hBD 3

Os sítios sadios do grupo PF apresentaram níveis significativamente maiores de hBD 3 em comparação aos sítios sadios dos grupos S e PNF ( $p=0,006$ ). Níveis mais elevados de hBD 3 foram detectados nos sítios doentes de PNF que nos sítios doentes de PF ( $p=0,02$ ). Na comparação dos sítios dentro mesmo grupo, níveis significativamente menores de hBD 3 foram encontrados nos sítios doentes de PF em relação aos sítios sadios destes pacientes ( $p=0,04$ ). No grupo PNF, os níveis de hBD

3 foram significativamente maiores nos sítios doentes que nos sítios sadios ( $p=0,02$ ) (Figura 1).

**Figura 1** - Quantificação dos níveis de hBD 3 no fluido crevicular gengival de sítios sadios e doentes de pacientes com periodontite crônica, fumantes (PF) e não fumantes (PNF), e nos sítios sadios de pacientes sem doença periodontal (S).



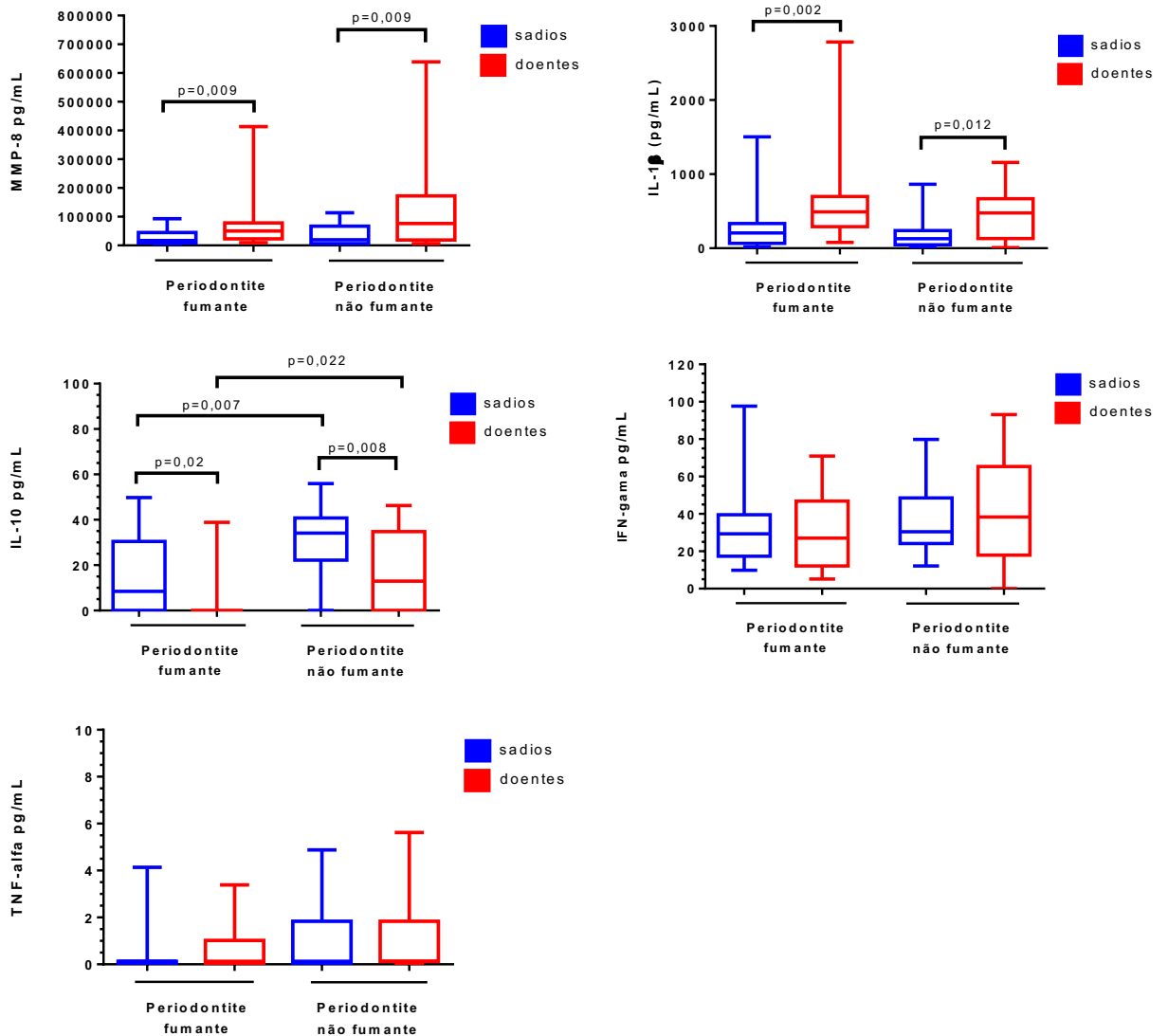
\*  $p = 0,04$ ; \*\*  $p = 0,02$  - Diferença entre sítios sadios e doentes - Teste Wilcoxon  
 $\delta$   $p = 0,006$  - Maiores níveis de hBD3 que os sítios sadios dos demais grupos - Kruskal-Wallis com Dunn  
 $\#$   $p = 0,02$  - Maiores níveis de hBD3 que os sítios doentes do grupo periodontite fumante - Teste Mann-Whitney

Fonte: Elaboração própria.

### **Quantificação dos marcadores biológicos**

Os níveis de cada marcador biológico no FCG de sítios sadios e doentes de PF e PNF estão descritos na Figura 2. Apenas para a IL-10 foi observada uma diferença significativa entre os grupos PF e PNF tanto nos sítios sadios ( $p=0,007$ ) como nos sítios doentes ( $p=0,022$ ). Níveis significativamente mais elevados de MMP-8 e IL-1 $\beta$  foram detectados nos sítios doentes em comparação com sítios sadios em ambos os grupos. Por outro lado, sítios doentes de ambos os grupos apresentaram níveis significativamente menores de IL-10 que os sítios sadios. Não foram observadas diferenças significativas entre os sítios para os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  tanto em PF como em PNF.

**Figura 2** - Quantificação dos níveis de MMP-8, IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no fluido crevicular gengival de pacientes fumantes e não fumantes com periodontite crônica



Fonte: Elaboração própria.

Em relação à correlação da hBD 3 com os marcadores biológicos avaliados, observou-se, de maneira geral, uma correlação negativa entre os níveis de hBD 3 e MMP-8, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  tanto nos sítios sadios como nos sítios doentes dos grupos PF e PNF. Por outro lado, uma correlação positiva foi verificada entre hBD 3 e IL-10 tanto nos sítios sadios como nos sítios doentes dos grupos PF e PNF (Tabela 2; Apêndice A).

**Tabela 2** - Valores de correlação entre os níveis do peptídeo hBD 3 e os marcadores biológicos do fluido crevicular gengival

| Correlação                     | hBD3             |                   |                   |                    |
|--------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                                | Sítios Sadios PF | Sítios Doentes PF | Sítios Sadios PNF | Sítios Doentes PNF |
| <b>MMP-8</b>                   | -0,452*          | -0,047            | -0,149            | -0,486*            |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | -0,426           | -0,231            | -0,315            | -0,657*            |
| <b>IL-10</b>                   | 0,299            | 0,142             | 0,495*            | 0,506*             |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | -0,322           | -0,046            | -0,204            | -0,319             |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | -0,446*          | 0,009             | 0,256             | -0,142             |

\*Correlações estatisticamente significativas - Teste de correlação de Pearson MMP-8, metaloproteinase da matriz 8; IL-1 $\beta$ , e interleucina 1 beta; IL-10, interleucina 10; IFN- $\gamma$ , interferon gama; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa.

Fonte: Elaboração própria.

## DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo transversal foi determinar se o hábito de fumar interfere nos níveis de hBD 3 no FCG de pacientes com periodontite crônica. Nossos resultados demonstraram que os sítios doentes do grupo PF demonstraram níveis reduzidos de hBD 3 no FCG em comparação com sítios doentes do grupo PNF. Estes dados sugerem um efeito negativo do hábito de fumar na expressão de hBD 3 nos sítios que apresentam atividade de doença periodontal.

Estudos *in vitro* prévios corroboram estes resultados. Mahanonda et al. (11) verificaram que o extrato da fumaça do cigarro pode modular a função das células epiteliais do tecido gengival humano suprimindo a expressão de hBD 2 e aumentando a produção de IL-8. Esta ruptura da homeostasia do tecido periodontal exacerbada pelo fumo, causada pela supressão da hBD 2 e a promoção da resposta à IL-8, poderia favorecer a invasão de bactérias patogênicas e aumentar os efeitos da inflamação crônica. Wolgin et al. (12) também observaram uma redução da expressão de hBD 2 por queratinócitos humanos (HaCaT) estimulados previamente com nicotina ou estimulados simultaneamente com nicotina e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, Semlali et al. (14) observaram um aumento na expressão das hBDs 2 e 3, tanto no nível de mRNA como no nível proteico, após exposição de células epiteliais do tecido gengival humano à fumaça do cigarro por 15 ou 30 minutos. Um aumento significativo na expressão de hBD 2 mRNA também foi verificado por Nakamura et al. (13) após 24 horas de exposição de queratinócitos humanos à nicotina nas concentrações de 30 e

80  $\mu\text{M}$  em relação ao controle não estimulado. O aumento no nível proteico de hBD 2 ocorreu apenas na concentração de 80  $\mu\text{M}$ .

Não foram encontrados na literatura estudos in vivo avaliando o efeito do tabagismo nos níveis de hBD 3 no fluido crevicular gengival ou saliva de pacientes com periodontite crônica para comparação dos nossos resultados. Dentre um número restrito de estudos in vivo que investigaram a influência do fumo sobre a expressão dos peptídeos antimicrobianos, resultados controversos também foram relatados (10). Türkoğlu et al. (16) compararam os níveis de LL-37 no FCG de pacientes fumantes e não fumantes com periodontite crônica. Níveis significativamente reduzidos de LL-37 foram encontrados no FCG de pacientes fumantes em relação a não fumantes. Neste estudo também foram incluídos pacientes fumantes e não fumantes sem doença periodontal. Nestes últimos não foram observadas diferenças para os níveis de LL-37. Assim, o efeito supressivo do tabagismo foi observado apenas nos sítios com doença periodontal ativa. Takeuchi et al. (15) verificaram uma correlação negativa entre os níveis salivares de LL-37 e cotinina em pacientes com periodontite crônica. Os níveis de LL-37 foram significativamente menores nos pacientes que apresentavam altas concentrações de cotinina na saliva ( $\geq 8$  ng/mL) do que nos pacientes com níveis menores de cotinina ( $< 8$  ng/mL). Além disso, foi constatado que os níveis salivares de LL-37 estavam positivamente correlacionados com a severidade da destruição periodontal e que sua produção estava aparentemente associada à infecção por periodontopatógenos. Baseado nestes achados, foi sugerido que o tabagismo ou a longa exposição aos produtos do cigarro pode causar redução nos níveis salivares de LL-37 e aumentar o risco de periodontite. Ertugrul et al. (18) avaliaram os níveis de LL-37 e hBD 2 em quatro grupos distintos de pacientes: não fumantes com gengivite (G), fumantes com gengivite (GF), não fumantes com periodontite agressiva (AgP) e fumantes com periodontite agressiva (AgPF). Os níveis dos peptídeos foram significativamente maiores no grupo GF em relação ao grupo G, e também foram significativamente maiores no grupo AgPF que no AgP. Segundo os autores, este aumento nos níveis de LL-37 e hBD 2 em fumantes poderia estar associado ao aumento do número de microrganismos colonizadores nos sítios dos pacientes fumantes. Este grupo de pesquisadores também observaram níveis mais elevados de hBD 3 no FCG de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 e periodontite crônica em relação a pacientes saudáveis com periodontite crônica ou gengivite e em relação a pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e gengivite (19).

Em um estudo envolvendo amostras do fluido da faringe e do escarro de pacientes com pneumonia aguda, foi verificado os pacientes fumantes e ex-fumantes apresentaram uma redução significativa nos níveis de hBD 2 em comparação com os não fumantes. Além disso, foi verificado que exposição ao cigarro reduziu *in vitro* a expressão de hBD 2 pelas células do epitélio das vias aéreas em resposta ao estímulo bacteriano (20).

Com o intuito de avaliar a relação da hBD 3 com saúde e doença periodontal, realizamos neste estudo a comparação dos níveis deste peptídeo em amostras de FCG de sítios saudáveis e doentes de cada paciente portador de periodontite crônica, incluindo fumantes (PF) e não fumantes (PNF). No nosso ponto de vista, a comparação de amostras de um mesmo paciente reduz a influência da variação individual nas análises. Os níveis de hBD 3 foram significativamente menores nos sítios doentes que nos sítios saudáveis dos pacientes do grupo PF. Por outro lado, níveis mais elevados de hBD 3 foram encontrados nos sítios doentes de pacientes do grupo PNF em relação aos sítios saudáveis dos mesmos. De maneira geral, a relação entre os peptídeos antimicrobianos e a condição periodontal tem sido determinada pela comparação de amostras de pacientes sem doença periodontal com amostras de paciente com doença periodontal. Esta comparação dos níveis de peptídeos antimicrobianos no FCG entre sítios saudáveis e doentes de um mesmo paciente com doença periodontal não foi encontrada em outros estudos. No estudo de Brancatisano et al. (21) foi realizada coleta do FCG de sítios saudáveis e doentes de pacientes com periodontite crônica para quantificação da hBD 3. No entanto, não foi relatado o nível do peptídeo em cada um destes sítios. Foi apenas relatado que os níveis de hBD 3 mostraram uma correlação negativa significativa com a profundidade de sondagem. Neste estudo também foi coletado FCG de pacientes sem doença periodontal. Os resultados obtidos foram contraditórios aos nossos achados. Níveis significativamente maiores de hBD 3 foram detectados no FCG de pacientes periodontalmente saudáveis ( $68,7 \text{ ng/mL} \pm 12,4$ ) que no FCG de pacientes com periodontite crônica ( $6,65 \text{ ng/mL} \pm 1,1$ ). Apesar de observar uma maior expressão de hBD 3 mRNA no tecido gengival de pacientes com periodontite que no tecido gengival de pacientes com gengivite ou sem doença periodontal, a diferença não foi estatisticamente significativa.

Um resultado não esperado foi a detecção de níveis mais elevados de hBD3 nos sítios saudáveis do grupo PF em relação aos sítios saudáveis de PNF e S. Esta maior expressão pode estar associada a alterações locais induzidas pelo tabagismo como

por exemplo, a redução da vascularização, o aumento de periodontopatógenos no biofilme subgengival (22, 23) e a redução da quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares (22). Por outro lado, Wolgin et al. (24) verificaram uma menor expressão das hBDs 1 e 2 em amostras de tecido gengival de pacientes fumantes que não apresentavam doença periodontal em comparação com pacientes não fumantes sem doença periodontal.

Em relação aos parâmetros clínicos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos PF e PNF. Ambos os grupos apresentavam a mesma severidade de doença periodontal. Este fato pode explicar a ausência de diferença significativa para os marcadores biológicos MMP-8, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no fluido crevicular gengival de pacientes fumantes e não fumantes com periodontite crônica. Apenas para a citocina IL-10 foi observada uma diferença significativa entre os grupos PF e NFP. Níveis reduzidos de IL-10 foram detectados tanto nos sítios sadios como nos sítios doentes do grupo PF em comparação com grupo PNF. Estudos prévios demonstram que o tabagismo pode alterar as citocinas presentes no fluido crevicular gengival. Nos estudos de Boström et al. (25, 26), foi verificado um aumento significativo de TNF- $\alpha$  no FCG de pacientes fumantes e ex-fumantes em relação aos não fumantes. Por outro lado, os níveis de IL-6 foram similares para os grupos de pacientes fumantes e não fumantes. Em outro estudo deste mesmo grupo, também foi verificado que o tabagismo não teve influência nos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-1ra no FCG. Níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  e IL-1ra foram observados tanto no FCG de pacientes fumantes como no de não fumantes (27). Quando comparado com resultados dos estudos anteriores (25, 26), verificou-se que os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-1ra no FCG eram mais elevados que os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 em todos os grupos.

Como a infecção bacteriana é um fator causal essencial para a doença periodontal, alterações na expressão de peptídeos antimicrobianos que atuam contra patógenos periodontais poderiam influenciar diretamente no risco para doença periodontal. Assim, a redução na expressão de hBD 3 nos sítios doentes de pacientes fumantes poderia ser considerada como um possível mecanismo associado à ocorrência e severidade da doença periodontal nos pacientes fumantes. Frente a estes achados, novos estudos tornam-se necessários para confirmar a influência do tabagismo na expressão dos peptídeos antimicrobianos.

## CONCLUSÃO

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

## REFERÊNCIAS

1. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E et al. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 2001; **167**: 6644-53.
2. Feng Z, Dubyak GR, Lederman MM, Weinberg A. Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol* 2006; **177**: 782-6.
3. McCormick TS, Weinberg A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontol* 2000. 2010; **54**: 195-206.
4. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol.* 2010; **5**: 99-113.
5. Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quiyynen 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**: 1293-303.
6. Maisetta G, Batoni G, Esin S, Florio W, Bottai D, Favilli F, et al. In Vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; **50**: 806-9.
7. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, et al. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jun; **55**: 888-96.
8. Moeintaghavi A, Arab HR, Rezae SAR, Naderi H, Shiezadeh F, Sadeghi S, et al. The effects of smoking on expression of IL-12 and IL-1 $\beta$  in gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Open Dent J.* 2017; **11**: 595-602.

9. Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol 2000*. 2007; **43**: 267-77.
10. Li S, Schmalz G, Schmidt J, Krause F, Haak R, Ziebolz D. Antimicrobial peptides as a possible interlink between periodontal diseases and its risk factors: a systematic review. *J Periodontal Res* 2017; (Epub ahead of print).
11. Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Eksomtramate M, Rerkyen P, Phairat B, Schaecher KE et al. Cigarette smoke extract modulates human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res* 2009; **44**: 557-64.
12. Wolgin M, Liodakis S, Pries AR, Zakrzewicz A, Kielbassa AM. HBD-1 and hBD-2 expression in HaCaT keratinocytes stimulated with nicotine. *Arch Oral Biol*. 2012; **57**: 814-9.
13. Nakamura S, Saitoh M, Yamazaki M, Nishimura M, Kurashige Y, Arakawa T et al. Nicotine induces upregulated expression of beta defensin-2 via the p38MAPK pathway in the HaCaT human keratinocyte cell line. *Med Mol Morphol*. 2010; **43**: 204-10.
14. Semlali A, Witoled C, Alanazi M, Rouabhia M. Whole cigarette smoke increased the expression of TLRs, HBDs, and proinflammatory cytokines by human gingival epithelial cells through different signaling pathways. *PLoS One*. 2012; **7**: 52614.
15. Takeuchi Y, Nagasawa T, Katagiri S, Kitagawara S, Kobayashi H, Koyanagi T, et al. Salivary levels of antibacterial peptide (LL-37/hCAP-18) and cotinine in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2012; **83**: 766-72.
16. 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**: 969-76.
17. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M, Jr., Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2010; **37**: 180-90.
18. Ertugrul AS, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan NZ, Bozoglan 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**: 282-9.
19. Ertugrul, A.S., et al., Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensins 1 and 3 in subjects with periodontitis and/or type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *J Periodontal Res*, 2013. **48**: 475-82.
20. Herr C, Beisswenger C, Hess C, Kandler K, Suttorp N, Welte T et al. Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax*. 2009; **64**: 144-9.

21. Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M, Giuca MR, Campa M, Batoni G. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res.* 2011; **90**: 241-5.
22. Erdemir EO, Duran I, Haliloglu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; **31**: 99-104.
23. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2001; **28**: 377-88.
24. Wolgin M, Lioudakis S, Ulrich I, Zakrzewicz A, Kielbassa AM, Pries AR. Gene expression of human beta defensins-1 and-2 is significantly reduced in non-inflamed keratinized oral tissue of smokers. *J Dent.* 2012; **40**: 949-54.
25. Boström L, Linder LE, Bergström J. Clinical expression of TNF-alpha in smoking-associated periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1998; **25**: 767-73.
26. Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1999; **26**: 352-7.
27. Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and GCF levels of IL-1beta and IL-1ra in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2000; **27**: 250-5.

#### **4 CONCLUSÃO**

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

## REFERÊNCIAS\*

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

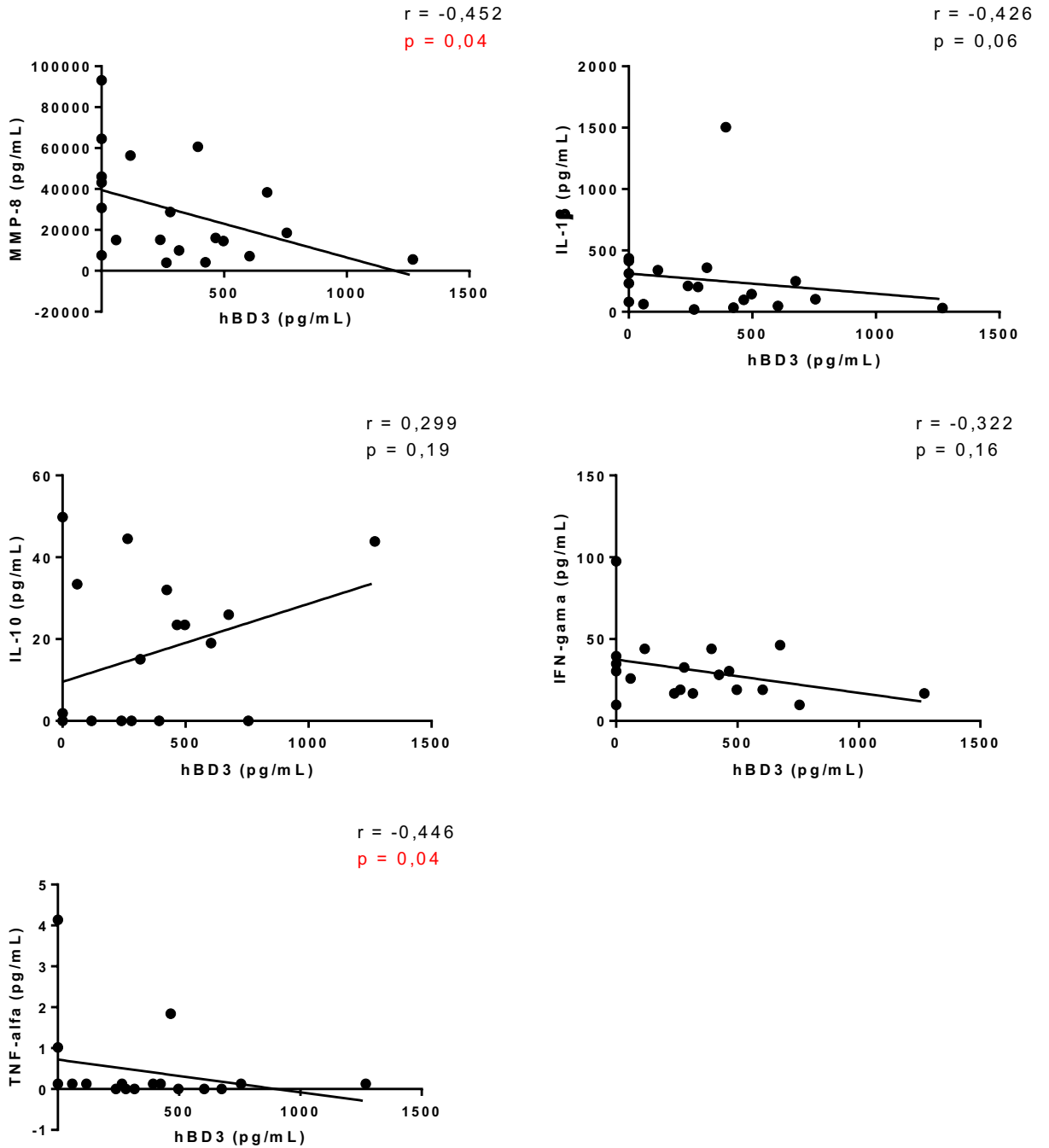
---

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

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

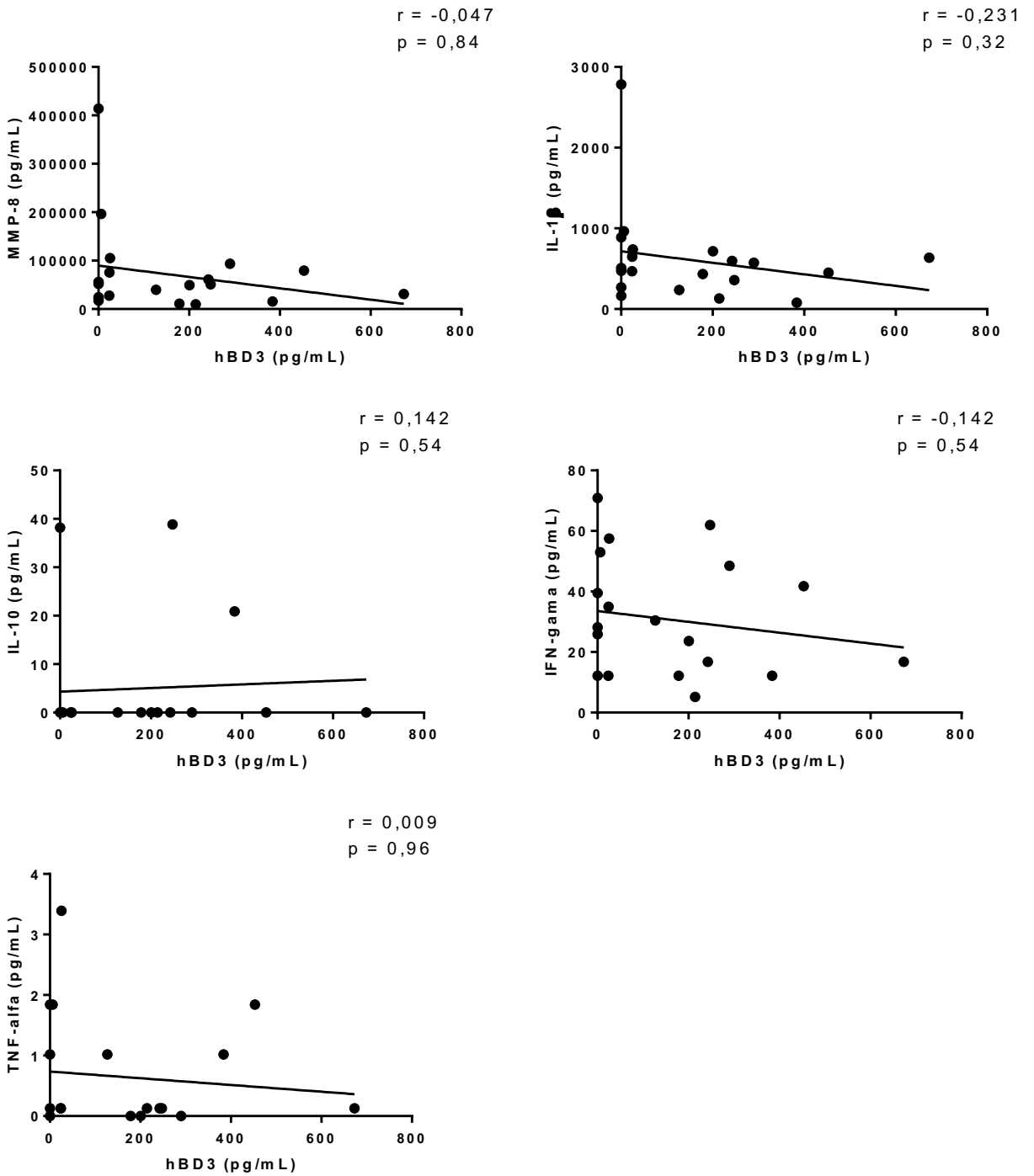
## APÊNDICE A – GRÁFICOS DA CORRELAÇÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS E hBD 3

**Figura 1** - Correlação entre os níveis de hBD-3 e os marcadores biológicos do fluido crevicular gengival nos sítios sadios de pacientes fumantes



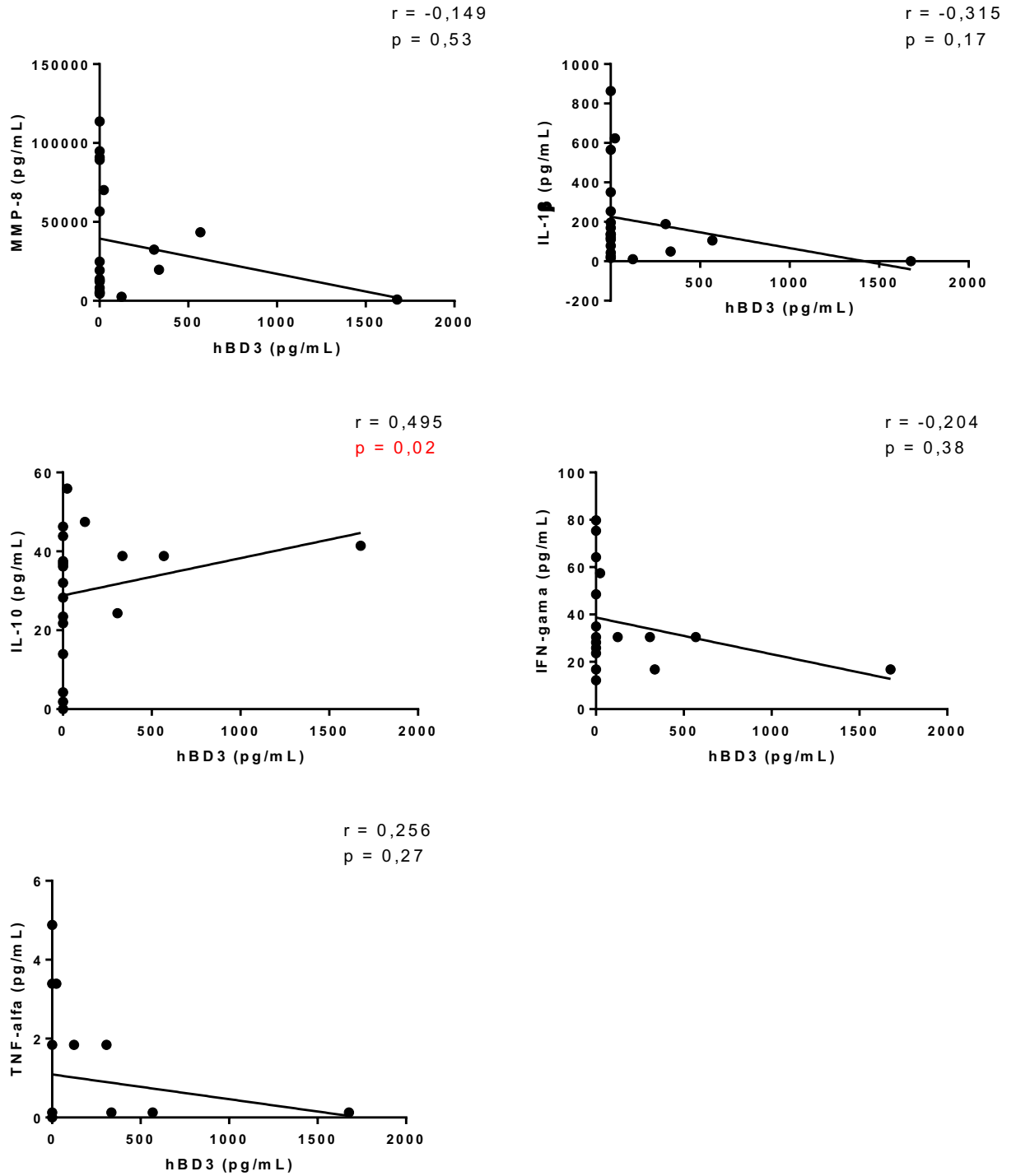
Fonte: Elaboração própria.

**Figura 2** - Correlação entre os níveis de hBD-3 e os marcadores biológicos do fluido crevicular gengival nos sítios doentes de pacientes fumantes



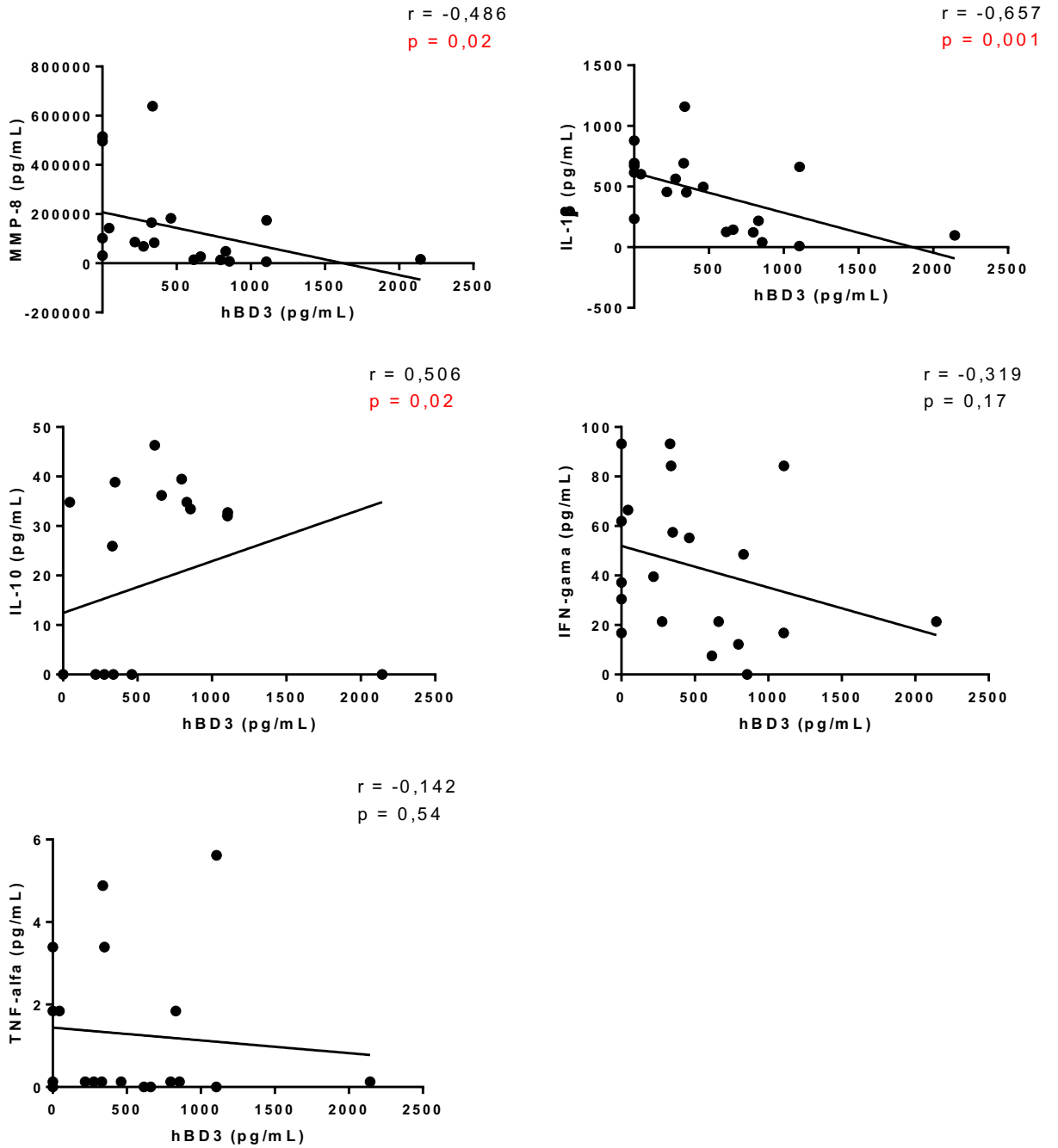
Fonte: Elaboração própria.

**Figura 3** - Correlação entre os níveis de hBD-3 e os marcadores biológicos do fluido crevicular gengival nos sítios sadios de pacientes não fumantes



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 4** - Correlação entre os níveis de hBD3 e os marcadores biológicos do fluido crevicular gengival nos sítios doentes de pacientes não fumantes



Fonte: Elaboração própria.

## APÊNDICE B – MATERIAL E MÉTODO DETALHADO

### METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CAAE 01394712.5.0000.5416) (Anexo).

#### ***População do estudo***

Um total de 40 indivíduos com periodontite crônica moderada, sendo 20 fumantes e 20 não fumantes, e 20 indivíduos sem doença periodontal foram incluídos no presente estudo. Assim, três grupos distintos foram constituídos: sem doença periodontal (S), periodontite fumante (PF) e periodontite não fumante (PNF).

Os indivíduos com periodontite crônica deveriam apresentar um mínimo de 15 dentes naturais e pelo menos 4 sítios com profundidade de sondagem (PS)  $\geq 5$  mm, sangramento à sondagem (SS) e nível clínico de inserção (NCI)  $\geq 5$  mm em dentes não adjacentes, com exceção dos terceiros molares. Os indivíduos sem doença periodontal deveriam apresentar no mínimo 24 dentes naturais, PS  $\leq 3$  mm, ausência de perda de inserção, índice de placa visível (IPV) e índice de sangramento gengival (ISG)  $\leq 15\%$ . O hábito de fumar foi investigado por meio de um questionário. Pacientes fumantes deveriam fumar pelo menos 10 cigarros/dia por pelo menos 5 anos consecutivos e os pacientes não fumantes nunca poderiam ter fumado. Os critérios de exclusão adotados foram: histórico de doença sistêmica e/ou desordem imunológica, gestantes e lactantes, tratamento periodontal nos últimos seis meses e uso de antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 3 meses.

Os participantes deste estudo foram recrutados na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP no período de agosto de 2015 a abril de 2017. Todos os indivíduos foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

#### ***Exame clínico periodontal***

O exame clínico periodontal de todos os participantes foi realizado por um único examinador, previamente treinado e calibrado. Para calibração do examinador, o parâmetro clínico profundidade de sondagem foi mensurado em seis dentes (16, 21, 24, 36, 41 e 44), de acordo com o índice de Ramfjord, em um total de 6 pacientes (36

sítios/paciente) em duas ocasiões distintas com um intervalo de 7 dias. Os dados foram submetidos à análise de concordância Kappa. O valor obtido,  $k=0,91$ , demonstrou um excelente índice de concordância intra-examinador.

Os parâmetros clínicos avaliados foram IPV e ISG (Ainamo e Bay, 1975), PS, SS e NCI. Os índices IPV e ISG foram avaliados em quatro sítios por dente (mesial, distal, vestibular e lingual), enquanto os demais parâmetros foram avaliados em seis sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) em todos os dentes, com exceção dos terceiros molares. A sondagem dos dentes foi realizada com uma sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (Hu-friedy®, Chicago, IL, EUA).

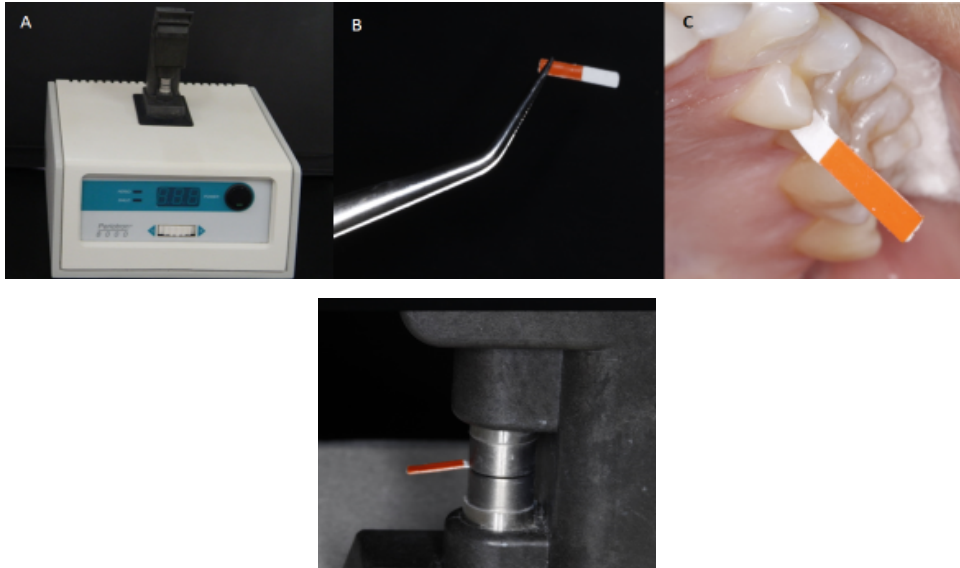
### ***Coleta de amostras de fluido crevicular gengival (FCG)***

Foram coletadas amostras de FCG de sítios sadios ( $n=4$ ) e doentes ( $n=4$ ) dos pacientes com periodontite crônica<sup>5,6</sup> e apenas de sítios sadios ( $n=4$ ) nos pacientes com ausência de doença periodontal. A seleção dos sítios foi feita de forma aleatória em dentes distintos e não adjacentes. As amostras de FCG foram coletadas por um único examinador uma semana após a realização dos exames clínicos.

- Sítio Sadio - sítio com ausência de sangramento gengival,  $PS \leq 3$  mm, ausência de sangramento a sondagem e ausência de perda inserção
- Sítio doente - sítio com sangramento gengival,  $PS \geq 5$  mm, com sangramento à sondagem e perda de inserção ( $NCI \geq 5$  mm)

As amostras de FCG foram coletadas por um único examinador uma semana após a realização dos exames clínicos. Os sítios selecionados foram isolados com roletes de algodão, gentilmente secos com jato de ar e, se houvesse a presença de placa supragengival, a mesma era removida com cureta estéril. Tiras de papel absorvente (Periopaper®, Oraflow Inc., Nova Iorque, EUA) foram inseridas no sulco ou na bolsa periodontal até uma leve resistência ser sentida, sendo removidas após 30 segundos. Tiras de papel contaminadas com sangue foram descartadas. O volume total de FCG coletado com cada tira de papel absorvente utilizada foi mensurado com um aparelho previamente calibrado (Periotron 8000 - Oraflow Inc.). As amostras de FCG representativas de uma mesma categoria no indivíduo foram colocadas em um tubo eppendorf previamente codificado e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise laboratorial.

**Figura 1** - Coleta do FCG com utilização de tiras de papel absorvente. A) Periotron 8000®; B) Filtro de papel absorvente antes da coleta; C) Filtro de papel em posição durante a coleta; D) Mensuração do volume coletado de FCG



Fonte: Arquivo do Grupo de Pesquisa da FOAr coordenado pela Profa. Daniela Zandin Leal-Barcelos.

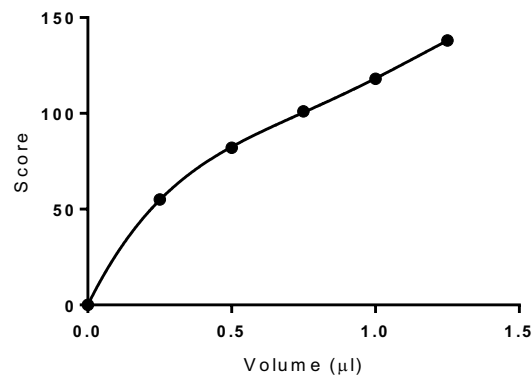
### ***Construção da curva padrão para Periotron***

Para a construção da curva padrão foram utilizados volumes de fluidos pré-definidos (valores de referência). Em uma tira de papel absorvente (Periopaper®) foi pipetada água destilada no volume pré-definido e, em seguida, foi feita a mensuração no aparelho Periotron. Esse procedimento foi realizado duas vezes para cada volume, sendo a média dos valores obtidos no aparelho utilizada para construção da curva padrão (Tabela 1). Esse protocolo é considerado fundamental devido às variações climáticas de diferentes regiões que podem interferir na mensuração do fluido pelo aparelho. Esta curva deve ser construída para que o volume de fluido sulcular coletado e mensurado por meio de aparelho seja transformado em unidade de volume ( $\mu\text{L}$ ) com o auxílio de um programa específico para esse fim (Periotron Professional - Oraflow Inc.) que insere os valores obtidos do Periotron nessa curva padrão (Figura 2).

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

| Volume ( $\mu$ l) | Leitura Periotron |
|-------------------|-------------------|
| 0.00              | 0                 |
| 0.25              | 55                |
| 0.50              | 82                |
| 0.75              | 101               |
| 1.00              | 118               |
| 1.25              | 138               |

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 2** - Curva padrão do Periotron ( $r = 0.9999$  - Regressão Polinomial de 4ª ordem) utilizada no presente estudo

Fonte: Elaboração própria.

### **Quantificação da hBD 3**

Para eluição das amostras de FCG presentes nas tiras de papel, adicionou-se 150  $\mu$ L de PBS 1x para cada Periopaper presente no tubo eppendorf. Os tubos foram deixados em gelo no agitador horizontal por 30 minutos e, em seguida, colocados em centrífuga refrigerada a 4°C, 13.000 g por 10 minutos (Marcaccini et al., 2010\*).

\* Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M, Jr., Teofilo JM et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2010; 37: 180-90.

A quantificação de hBD 3 no fluido gengival foi feita pela técnica ELISA sanduíche (Peprtech, Rocky Hill, NJ, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. Resumidamente, noventa e seis poços foram revestidos com 100 µL de anticorpo específico (anti hBD 3) por 12 horas. Após quatro lavagens com PBST, os poços foram bloqueados por 1 hora à temperatura ambiente com 300 µL de uma solução bloqueadora. As placas foram lavadas e 100 µL das amostras ou da solução padrão foi adicionado aos respectivos poços em duplicata, e as placas foram incubadas por 2 horas. Após nova lavagem, 100 µL do anticorpo de detecção foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas por mais 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas e 100 µL de estreptavidina-peroxidase foi adicionada aos respectivos poços. Placas foram incubadas em temperatura ambiente por mais trinta minutos. Reações colorimétricas foram produzidas e a absorbância foi medida por um espectrofotômetro (Multiskar Ascent – Labsystems Uniscience, Vantaa, Finlândia) a 450 nm. A absorbância foi convertida na concentração do peptídeo antimicrobiano por amostra, de acordo com a curva padrão. O limite de detecção do kit utilizado foi de 63 a 4000 pg/mL.

### ***Quantificação da metaloproteinase da matriz e citocinas***

A detecção de múltiplos marcadores biológicos no fluido crevicular gengival dos pacientes com periodontite crônica fumantes e não fumantes foi realizada por meio de ensaio Multiplex com beads magnéticas, com utilização do kit Human Premixed Multi-Analyte (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Todos os reagentes, padrões e amostras foram preparados seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 50 µL da solução com as micropartículas diluídas a cada poço de uma placa de 96 poços. Logo em seguida, 50 µL das soluções padrão e amostras foram adicionados em seus respectivos poços e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente no agitador orbital horizontal a 800 rpm. Após período de incubação, o líquido foi removido pelo dispositivo de sucção a vácuo e cada poço da placa foi preenchido com 100 µL do tampão de lavagem; este procedimento de lavagem foi realizado três vezes. Posteriormente à lavagem, 50 µL da solução anticorpo-biotina foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente sobre o agitador orbital horizontal a 800 rpm. Após nova sequência de lavagens, 50 µL de estreptavidina foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por mais 30 minutos sobre o agitador orbital horizontal a 800 rpm. As etapas de lavagem foram

repetidas e, logo em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L de tampão de lavagem e a placa foi incubada por 2 minutos sobre o agitador horizontal e a leitura realizada pelo equipamento Bio-plex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

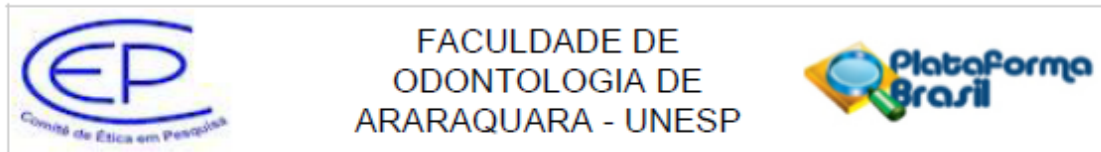
### ***Análise Estatística***

Para análise estatística desse estudo foi utilizado o software Graphpad Prism 6 (San Diego, CA, EUA) e todos os testes estatísticos foram aplicados ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os dados numéricos (Idade, PS, NCI, nível do peptídeo hBD-3 e níveis marcadores biológicos) foram submetidos a um teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Como os parâmetros Idade, PS e NCI se distribuíram de acordo com a normalidade, testes paramétricos foram utilizados para análise estatística inferencial desses dados. O teste de One-way ANOVA complementado pelo teste de Tukey foi utilizado para a comparação entre os grupos (sem doença periodontal, periodontite fumante e periodontite não fumante). Os níveis de hBD-3 no FCG não apresentaram distribuição normal, assim o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn foi utilizado para comparação dos sítios saudáveis desses 3 grupos e o teste Wilcoxon foi utilizado para comparação dos sítios saudáveis e doentes dentro dos grupos (periodontite fumante e periodontite não fumante). O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar os sítios doentes entre os grupos periodontite fumante e periodontite não fumante. O teste de Mann-Whitney também foi usado para comparação dos níveis de marcadores biológicos no FCG entre estes grupos, enquanto a comparação dos níveis dos marcadores biológicos entre os sítios saudáveis e doentes dentro destes grupos foi realizada pelo teste Wilcoxon.

Os parâmetros categóricos (gênero, SS, IPV e ISG) foram comparados por testes não paramétricos. A distribuição dos gêneros entre os grupos foi analisada pelo teste exato de Fischer, enquanto que a comparação dos outros parâmetros entre os 3 grupos foi executada por meio do teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn.

Também foi executada uma análise de correlação linear entre os níveis de hBD3 e MMP-8, IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no FCG. Essa correlação foi executada por meio do teste de correlação de Pearson.

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Comparação da expressão de peptídeos antimicrobianos no fluido gengival crevicular de pacientes fumantes e não fumantes com periodontite crônica

**Pesquisador:** Daniela Leal Zandim-Barcelos

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 01394712.5.0000.5416

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**Patrocinador Principal:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP  
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.456.405

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto em execução desde 2012, que solicita emenda (alteração do título, da metodologia, do número de sujeitos e do prazo). Analisando a emenda e suas justificativas, bem como o relatório parcial apresentado, percebe-se que o projeto está sendo conduzido dentro das possibilidades de recursos do pesquisador e respeitando a ética, uma vez que não se obtiveram amostras de tecido gengival (contrariando o planejamento inicial) porque não houve indicação clínica que possibilitasse tal obtenção de tecido.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo foi reformulado (bem como o título), porque não foi possível obter amostras de tecido gengival.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram adequadamente dimensionados. Não há riscos para os pacientes, pois todos os procedimentos clínicos serão realizados conforme protocolos rígidos e normas de biossegurança. A coleta de fluido gengival é indolor e não invasivo. Benefícios: paciente estará sendo assistido quanto à sua saúde periodontal e contribuirá para construção do conhecimento.

O fumo é comprovadamente um importante fator de risco para a doença

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

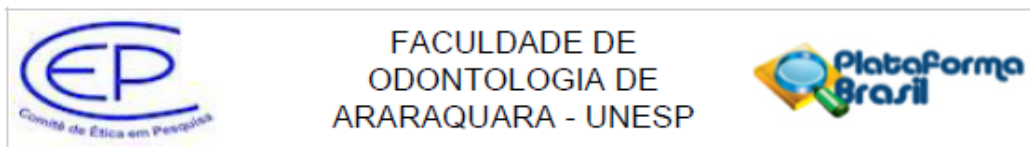
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.456.405

periodontal. Assim, o objetivo deste estudo é identificar fatores da resposta imune do hospedeiro que podem estar associados à maior ocorrência e gravidade da doença periodontal em pacientes fumantes. A doença periodontal é uma doença infecciosa de origem bacteriana, em que a resposta imunológica do indivíduo

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Considero que a pesquisa está sendo conduzida dentro de critérios éticos, as informações presentes no relatório foram bem apresentadas, demonstrando claramente o que já foi realizado, as emendas foram adequadamente apresentadas e justificadas demonstrando o preocupação do pesquisador em melhorar o projeto de pesquisa (aumentando o número de sujeitos, segundo o que lhe foi aconselhado em Banca de Qualificação) e em cumprir o que já tinha sido proposto em termos de metodologia, já que houve o atraso para liberação de verba.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE adequado, bem como demais termos.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Meu parecer é de aprovação do relatório parcial e das alterações solicitadas na emenda.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Emenda APROVADA em reunião de 17 de março de 2016.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento  | Arquivo                              | Postagem               | Autor                        | Situação |
|---|--------------------------------------|------------------------|------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_661933_E2.pdf | 15/02/2016<br>09:17:00 |                              | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Emenda2DEFENSINAS.pdf                | 15/02/2016<br>09:11:50 | Daniela Leal Zandim-Barcelos | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEEMENDA2.pdf                      | 15/02/2016<br>09:10:58 | Daniela Leal Zandim-Barcelos | Aceito   |
| Outros  | RelatorioparcialCEP2016.pdf          | 15/02/2016             | Daniela Leal                 | Aceito   |

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903


UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

## ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**UNESP**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Pesquisa: “COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS NO FLUIDO GENGIVAL CREVICULAR E NO TECIDO GENGIVAL DE PACIENTES FUMANTES E NÃO FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA”.

Pesquisador responsável: Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por este instrumento particular, declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu (nome)

\_\_\_\_\_,  
(nacionalidade) \_\_\_\_\_, (profissão) \_\_\_\_\_,  
portador do R.G. \_\_\_\_\_, C.I.C. \_\_\_\_\_,  
residente à Rua/ Av. \_\_\_\_\_, na cidade  
de \_\_\_\_\_, Estado de \_\_\_\_\_, concordo em

participar da pesquisa intitulada: “Comparação da expressão de beta defensinas humanas no fluido gengival crevicular e no tecido gengival de pacientes fumantes e não fumantes com periodontite crônica”. A doença periodontal é uma doença que ocorre nos dentes, gengiva e osso, levando a uma inflamação da gengiva, sangramento e perda progressiva do osso em volta dos dentes. O objetivo desta pesquisa é identificar a presença de alterações no tecido gengival de pacientes fumantes que podem estar relacionadas com a maior ocorrência e severidade da doença periodontal em fumantes comparado com não fumantes.

Fui esclarecido que deverei responder a um questionário de saúde, serei submetido a exame clínico de rotina dos dentes e da gengiva, exame radiográfico de todos os dentes e coleta de fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e a superfície do dente). Estes procedimentos serão realizados antes do início do tratamento na Clínica de Periodontia desta faculdade.

Estou ciente de que o procedimento de coleta de fluido gengival não apresenta riscos e não causa prejuízo para o tratamento periodontal. A coleta será realizada pelos pesquisadores que deverão utilizar todos os equipamentos de proteção individual (máscara, gorro, avental, óculos e luvas). Para a realização das tomadas radiográficas, usarei avental de chumbo e colar de tireóide, como medida de proteção. As radiografias ficarão armazenadas juntamente com a ficha clínica no prontuário da Clínica de Periodontia.

Caso seja necessária a realização de algum procedimento cirúrgico durante o meu tratamento periodontal, autorizo a coleta dos fragmentos de tecido gengival que forem removidos durante a cirurgia para utilização nesta pesquisa. Fui informado que este procedimento não irá provocar nenhum dano ou prejuízo para o paciente pois o tecido seria descartado após a cirurgia. Os

cuidados pós-operatórios são de responsabilidade dos alunos da Clínica de Periodontia e dos professores da disciplina. Porém, os pacientes poderão entrar em contato com o pesquisador a qualquer momento, inclusive se houver algum problema após a cirurgia.

Torno ciente que recebi todas as informações sobre a minha participação nesta pesquisa e esclareço que minha adesão ao presente trabalho foi voluntária, sem qualquer tipo de pressão ou coação por parte dos pesquisadores. Fui informado que não terei gastos extras, e que a minha desistência ou não aceitação em fazer parte desta pesquisa não irá interferir no meu tratamento na Clínica de Periodontia. Além disso, tenho plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização.

Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e publicação em revistas científicas, brasileiras ou estrangeiras, dos dados obtidos na pesquisa. Recebi a garantia do sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.

Caso haja qualquer dúvida sobre a minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contactar o pesquisador responsável, Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos, pelo telefone: (16) 3301-6376. Além disso, estou ciente que possuo plena liberdade em consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação adicional em relação à pesquisa da qual participo, pelo telefone (16) 3301-6432 ou (16) 3301-6434.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos e, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, lido e assino esse Termo de Consentimento.

Araraquara, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

---

Assinatura do Paciente

---

Assinatura do Pesquisador Responsável  
Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de até 16 de março de 2020.**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 16 de março de 2018.**

**Ana Carolina Monachini Marcantonio**