

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 16/03/2022.



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



Kahena Rodrigues Soldati

Peptídeos antimicrobianos e doença periodontal: influência do tabagismo na expressão de
peptídeos antimicrobianos e possíveis efeitos de peptídeos sintéticos sobre biofilmes multi-
espécies

Araraquara

2020



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



Kahena Rodrigues Soldati

Peptídeos antimicrobianos e doença periodontal: influência do tabagismo na expressão de
peptídeos antimicrobianos e possíveis efeitos de peptídeos sintéticos sobre biofilmes multi-
espécies

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

Orientador: Profa. Dra Daniela Leal Zandim-
Barcelos

Araraquara

2020

Soldati, Kahena Rodrigues

Peptídeos antimicrobianos e doença periodontal: influência do tabagismo na expressão de peptídeos antimicrobianos e possíveis efeitos de peptídeos sintéticos sobre biofilmes multi-espécies / Soldati, Kahena Rodrigues.-- Araraquara: [s.n.], 2020
128 f.; 30 cm.

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

1. Peptídeos catiônicos antimicrobianos 2. Periodontite
3. Tabagismo 4. Biofilmes I. Título

Kahena Rodrigues Soldati

Peptídeos antimicrobianos e doença periodontal: influência do tabagismo na expressão de
peptídeos antimicrobianos e possíveis efeitos de peptídeos sintéticos sobre biofilmes multi-
espécies

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e orientador: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

2º Examinador: Profa. Dra. Fernanda de Oliveira Bello Corrêa

3º Examinador: Profa. Dra. Andrea Marcia Marcaccini

4º Examinador: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

5º Examinador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga

Araraquara, 16 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

Kahena Rodrigues Soldati

NASCIMENTO 14/02/1990 - Ribeirão Preto - SP

FILIAÇÃO Ana Lucila Rodrigues
José Clovis de Sousa Soldati

2006 – 2010 Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP
Universidade de São Paulo – USP

2011 – 2013 Curso de especialização em Implantodontia
Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia –
FAEPO

2014 – 2016 Curso de Pós-Graduação em Odontologia,
Área de concentração em Periodontia
Nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr
Universidade Estadual Paulista – UNESP

2018 – 2019

Doutorado sanduíche

Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam – ACTA

Amsterdã, Holanda

2016 – 2020

Curso de Pós-Graduação em Odontologia

Área de concentração em Periodontia

Nível Doutorado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Dedico este trabalho aos meus pais, Ana Lucila Rodrigues e José Clóvis de Sousa Soldati, por todo o amor e apoio, peças fundamentais durante todo o caminho percorrido. O que me alimenta é a certeza de que me acompanharão por toda eternidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus e meus anjos da guarda**, que mais uma vez me mostraram que com amor e boas intenções em meu coração, nada devo temer.

Ao **meu irmão**, Bruno, por sempre estar ao meu lado com todo seu carinho e atenção.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos**, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, desde o Mestrado até o Doutorado, permitindo assim não somente meu crescimento profissional, mas principalmente pessoal. Agradeço toda a paciência, dedicação e ensinamentos.

To **Dr. Dongmei Deng**, for sharing her love and dedication to research with me. For all the long meetings discussing every detail of each procedure and result, meetings which used to end up always with a priceless remarkable deeper consideration. I am grateful for always being worried about my personal feelings and helping me to work on personal obstacles. I am grateful for the opportunity of working in the Preventive Dentistry lab with kind and helpful people such as, **Michel, Mark, Rob, Carolien and Wendy**.

To **Ruben Gloerich**, who is always supporting me, not measuring efforts to make me happy. You are like coming up for fresh air!

Às minhas queridas amigas **Erica Dorigatti de Avila e Isabela Manzolli**, que hoje são minha base em Araraquara e que sempre tornam minhas idas muito mais prazerosas. Minha eterna gratidão por tudo o que têm feito por mim! Vocês são excepcionais!

À minha amiga-irmã **Lívia Tavares**, que desde o princípio sempre me escutou e me apoiou. Mesmo com a distância física, sempre se fez presente.

À minha querida amiga **Suzane Pigossi**, por ter me dado o prazer de dividir não somente o mesmo teto, como também momentos de muita alegria e inúmeros momentos de muita reflexão e aprendizado. A sua coragem e determinação me servem de inspiração para a vida.

To my colleagues and now friends, **Pilar Cornejo, Lin Shang, Yaling Jiang, Danuta Mazurel, Aylin Yilmaz and Kang**, for all the good time we spent together and all the knowledge shared!

Ao **Felipe, Ismênia, Fabiane, Gabi e Vitu** por cada momento único e inesquecível vivido e compartilhado em Amsterdam.

Às minhas amigas desde sempre e para sempre, **Nana, Cami, Caty, Gi, Thau, Marinhinha, Ju, Nick e Tatah**, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e por sempre estarem ao meu lado.

Aos queridos amigos da pós-graduação, **Romerito, Jonleno, Dayane, Cindy, Mariana, Laura, Lorena e Gabriel**, pelo companheirismo e por muitas vezes tornarem tudo mais leve.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa da sua Diretora, **Profª. Drª. Elaine Maria Sgavioli Massucato**, e do Vice-Diretor, **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, pela dedicação, competência e profissionalismo.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior**, **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, **Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico**, **Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior**, **Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos** e **Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili**, pela minha formação, orientação e exemplo de dedicação e conduta profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES):
O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. (Processo nº 88881.189633/2018-01).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro fundamental para realização dessa pesquisa.

À todos os funcionários e ex-funcionários da Disciplina de Periodontia, em especial, **Isabela, Suleima, Claudinha e Lene**, cujo trabalho e dedicação viabilizam o desenvolvimento do nosso trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **José Alexandre e Cristiano**, pela paciência e competência! Aos funcionários da biblioteca, em especial, **Marley e Ceres**, pela contribuição na realização desse trabalho.

Aos **Pacientes**, que tanto colaboraram com a pesquisa, contribuindo com a realização dos exames clínicos e coletas. Muito obrigada!

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

“Hoje eu estou certo de que nós somos os senhores do nosso destino; de que a tarefa que foi colocada diante de nós não está acima das nossas forças; de que suas dores e provações não estão acima da nossa resistência. Enquanto tivermos fé na nossa causa e um desejo indestrutível de vencer, a vitória não nos será negada.”

Robin Sharma

Soldati KR. 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.

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são importantes componentes da resposta do hospedeiro contra patógenos invasores. Além da ação antimicrobiana direta, podem também participar na modulação do sistema imune. No entanto, o papel dos PAMs na etiopatogênese da doença periodontal e os fatores de risco que podem influenciar sua expressão na cavidade bucal ainda não se encontram totalmente elucidados. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram: (1) avaliar a influência do tabagismo nos níveis de LL-37 e HNP 1-3 no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com periodontite e investigar a associação entre os níveis destes PAMs e de mediadores inflamatórios nos sítios com ausência e presença de doença periodontal; (2) investigar o impacto do tabagismo nos níveis de hBD1 e 2 em pacientes com periodontite e avaliar os efeitos da nicotina e cotinina na expressão destes PAMs por queratinócitos; (3) avaliar a atividade metabólica e enzimática durante a recolonização de biofilmes multi-espécies periodontopatogênicos após tratamento com peptídeos sintéticos derivados da catelicidina humana (LL31 e D-LL31). A quantificação dos PAMs e mediadores inflamatórios no FCG foi realizada por meio de ensaio ELISA sanduiche e Multiplex, repectivamente, enquanto a RT-qPCR em tempo real detectou a expressão gênica dos PAMs por queratinócitos. A produção de ácido láctico foi mensurada para determinar a atividade metabólica nos biofilmes pós-tratamento, enquanto a atividade enzimática foi analisada por meio da dipeptidil peptidase (DPP). Além disso, a viabilidade celular foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônia e o qPCR identificou a presença de *P. gingivalis* e a concentração de bactérias totais nos biofilmes. Os resultados dos estudos clínicos demonstraram que o tabagismo pode influenciar na expressão dos PAMs, reduzindo os níveis de LL-37, HNP 1-3 e hBD1 e aumentando os níveis de hBD2 no FCG. Nos sítios doentes, foram observados maiores níveis de LL-37 comparados aos sítios saudáveis, com associação positiva à presença de IL-1 β e MMP-8. A HNP 1-3, por sua vez,

apresentou níveis mais baixos, com associação positiva a IL-10. Nos experimentos in vitro, foi constatado que a nicotina reduz significativamente a expressão gênica de hBD1 por queratinócitos, sendo essa redução mais acentuada na presença de *A. actinomycetemcomitans*. Tanto a nicotina como a cotinina promoveram redução na expressão de hBD2 quando associadas à cultura bacteriana. No entanto, esta redução foi significativa apenas para o estímulo simultâneo com cotinina e *P. gingivalis*. Em relação ao efeito dos peptídeos sintéticos sobre a recolonização de biofilmes multi-espécies, os resultados indicam que o D-LL31 possui ação inibitória sobre a atividade metabólica e enzimática durante a recolonização de biofilme multi-espécies periodontopatogênico, podendo seu efeito se prolongar até 5 dias após o tratamento. Assim, podemos concluir que o efeito do tabagismo na expressão dos PAMs pode ser mais um mecanismo associado à maior prevalência e severidade de doença periodontal em fumantes. Além disso, o efeito inibitório do peptídeo sintético D-LL31 torna-o um possível agente terapêutico para utilização no tratamento da doença periodontal.

Palavras chave: Peptídeos catiônicos antimicrobianos. Periodontite. Tabagismo. Biofilmes.

Soldati KR. Antimicrobial peptides and periodontal disease: influence of smoking on the expression of antimicrobial peptides and possible effects of synthetic peptides on multi-species biofilms. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of the host response against invading pathogens. In addition to the direct antimicrobial activity, they can also participate in the immune system modulation. However, the role of AMPs in the etiopathogenesis of periodontal disease and the risk factors that may influence their expression in the oral cavity are not yet fully understood. Thus, the purposes of the present study were: (1) to evaluate the influence of smoking on the levels of LL-37 and HNP 1-3 in the gingival crevicular fluid (GCF) of patients with periodontitis and to investigate the association between the levels of these AMPs and inflammatory mediators at sites with absence and presence of periodontal disease; (2) to investigate the impact of smoking on hBD1 and 2 levels in patients with periodontitis and to evaluate the effects of nicotine and cotinine on the expression of these AMPs by keratinocytes; (3) evaluate the metabolic and enzymatic activity during the recolonization of multi-species periodontopathogenic biofilms after treatment with synthetic peptides derived from human cathelicidin (LL31 and D-LL31). The quantification of AMPs and inflammatory mediators in the GCF was performed by sandwich ELISAs and Multiplex assay, respectively, while RT-qPCR in real time detected the gene expression of the AMPs by keratinocytes. The production of lactic acid was measured to determine the metabolic activity in post-treatment biofilms, while the enzymatic activity was analyzed using dipeptidyl peptidase (DPP). In addition, cell viability was assessed by counting colony-forming units and qPCR identified the presence of *P. gingivalis* and the concentration of total bacteria in biofilms. The results of clinical studies have shown that smoking can influence the expression of AMPs, reducing the levels of LL-37, HNP 1-3 and hBD1 and increasing the levels of hBD2 in the FCG. Higher levels of LL-37 were observed in diseased sites compared to healthy sites, with a positive association with the presence of IL-1 β and MMP-8. Nevertheless, HNP 1-3 presented lower levels with positive association with IL-10. In in vitro experiments, it was found that nicotine significantly reduces the

gene expression of hBD1 by keratinocytes, being this reduction more pronounced in the presence of *A. actinomycetemcomitans*. Both nicotine and cotinine reduced hBD2 expression when associated with bacterial culture. However, this reduction was significant only for the simultaneous stimulation with cotinine and *P. gingivalis*. Regarding the effect of synthetic peptides on the recolonization of multi-species biofilms, the results indicate that D-LL31 has an inhibitory action on the metabolic and enzymatic activity during the recolonization of periodontopathogenic multi-species biofilms, and its effect can be prolonged up to 5 days after treatment. Thus, we can conclude that the effect of smoking on the expression of AMPs may be one of the mechanisms associated with the higher prevalence and severity of periodontal disease in smokers. In addition, the inhibitory effect of the synthetic peptide D-LL31 makes it a possible therapeutic agent for use in the treatment of periodontal disease.

Keywords: Antimicrobial cationic peptides. Periodontitis. Smoking. Biofilms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 PROPOSIÇÃO.....	22
3 PUBLICAÇÕES.....	23
3. 1 Publicação 1	23
3. 2 Publicação 2	46
3. 3 Publicação 3	73
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
5 CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICE.....	108
ANEXOS.....	125

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte do dente¹. Apesar do biofilme bacteriano ser considerado o fator etiológico primário das doenças periodontais, a severidade e progressão das mesmas depende de um balanço dinâmico entre biofilme, fatores genéticos e fatores ambientais². Portanto, as interações que ocorrem entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e o desafio bacteriano são essenciais para a determinação da suscetibilidade individual à periodontite.

Os mecanismos de defesa do hospedeiro são constituídos pela imunidade inata e adaptativa³. O sistema imune inato mantém uma barreira física e funcional contra microrganismos, tendo um papel primário na defesa do hospedeiro contra o biofilme bacteriano. O epitélio oral funciona como uma barreira física contra microrganismos patogênicos, e os neutrófilos, que migram através do epitélio juncional, formam uma barreira entre o biofilme bacteriano e o epitélio subjacente^{4,5}. Tanto as células epiteliais como os neutrófilos produzem os peptídeos antimicrobianos (PAMs) que possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus⁶⁻⁸. Além disso, estes PAMs são quimioatraentes para células fagocitárias e mastócitos, induzem mediadores inflamatórios e degranulação de mastócitos, regulam eventos inflamatórios iniciais, e aumentam a imunidade adaptativa^{9,10}. As principais atividades imunomodulatórias dos PAMs estão citadas na Tabela 1¹¹. Assim, os PAMs são importantes moléculas do sistema imune inato que contribuem para a manutenção do balanço entre saúde e doença da cavidade bucal. Em relação à sua expressão na cavidade oral, os PAMs podem ser detectados na língua, mucosa bucal, epitélio gengival e glândulas salivares^{5,12,13}.

Dentre os PAMs mais estudados e que apresentam participação importante na resposta imune, pode-se citar a catelicidina e as defensinas¹⁴. As defensinas são uma classe de PAMs produzida por muitos organismos eucariotos, incluindo mamíferos, insetos e plantas¹⁵. Em humanos, são produzidas por células epiteliais de superfície de mucosa e por leucócitos contendo grânulos, incluindo neutrófilos e células natural killer¹⁶, apresentando-se tanto em tecidos saudáveis como em tecidos inflamados¹⁷. A ação antimicrobiana das defensinas é baseada em suas propriedades físicas e

depende de sua capacidade em se ligar às membranas microbianas através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, levando à ruptura da membrana celular dos microrganismos. Enquanto sua atividade quimiotática pode ser efetiva para neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células T^{18,19}, mastócitos e células dendríticas^{20,21}.

Tabela 1 - Atividades imunomodulatórias dos peptídeos antimicrobianos

Peptídeo antimicrobiano	Tipo	Atividade relevante para imunidade	
		In vitro	In vivo
Alfa-defensinas	HNP 1-3	Atividade antimicrobiana	Recrutamento de células imunes
		Atividade antiviral	Indução de citocinas
		Atividade quimiotática	Aumento da resposta imune humoral e celular
		Promoção fagocitose	(Ag-específica)
		Degranulação de mastócitos	Confere resistência à invasão bacteriana
		Estimula a produção de citocinas e quimiocinas	
		Regula ativação complemento	
Beta-defensinas	hBD 1-3	Inibição do receptor ACTH e produção de glucocorticóide	
		Atividade antimicrobiana	Aumento da resposta imune humoral e celular
		Atividade quimiotática através CCR6	(Ag-específica)
		Degranulação de mastócitos	Confere resistência à invasão bacteriana
		Estimula a produção de citocinas e prostaglandinas	
Catelicidina	LL-37	Indução da maturação de células dendríticas através TLR4 (apenas mBD 2)	
		Atividade antimicrobiana	Efeito antibacteriano
		Atividade quimiotática	Estimula angiogênese
		Promoção fagocitose	Estimula re-epitelização de feridas na pele
		Estimula a produção de quimiocinas	
		Degranulação de mastócitos	
		Neutralização endotoxina bacteriana	

Fonte: Tabela adaptada de Yang et al.¹¹, 2004

As duas principais subfamílias de defensinas humanas, denominadas alfa e beta-defensinas (hBD), são diferenciadas pela localização das pontes de dissulfeto, pelo comprimento dos aminoácidos e também pelas diferentes células que as expressam^{22,23}. As alfa-defensinas são subdivididas em seis diferentes tipos, que podem ser sintetizados por neutrófilos, peptídeos neutrofilicos humanos (HNP) 1-4, ou pelas células de Paneth presentes na mucosa do intestino (defensina humana 5 e 6 – HD 5 e HD 6). As HNP 1-4 são sintetizadas como precursores, clivadas proteoliticamente, gerando uma defensina catiônica madura que é estocada em grânulos azurófilos, presentes nos neutrófilos, e depois liberada^{24,25}. Estruturalmente

semelhante às HNP, as hBD também são constituídas por três pontes de dissulfeto, porém diferenciam-se pelo espaçamento e emparelhamentos dos resíduos de cisteína²⁶. As hBDs, por sua vez, são sintetizadas por células epiteliais. As defensinas podem ser expressas na gengiva, língua, glândulas salivares e mucosa, podendo ser encontradas na saliva e fluido crevicular gengival (FCG).

Embora tenham sido encontradas cerca de 30 tipos de catelicidina em mamíferos, apenas uma foi identificada em humanos até hoje, a LL-37/hCAP18 que primeiramente apresenta-se como uma proteína antibacteriana catiônica humana de 18 kDa (hCAP18). Nos neutrófilos, os hCAP18 são armazenados nos grânulos secundários, outro tipo de grânulo citoplasmático especializado, que contém agentes antimicrobianos. O aminoácido número 37 da alfa hélice da extremidade C-terminal desta proteína precursora é clivado, formando o peptídeo LL-37, que é a forma ativa e madura da catelicidina^{27,28}. Na cavidade oral, a LL-37 tem sido encontrada no epitélio gengival, FCG e saliva^{29,30}.

Na última década, observa-se um aumento do número de publicação sugerindo uma possível implicação dos PAMs na homeostasia periodontal. No sétimo Workshop Europeu de Periodontia foi destacado que os PAMs podem influenciar a homeostasia da cavidade bucal não somente devido à sua atividade antimicrobiana contra patógenos bucais, mas também pelas suas propriedades imunomodulatórias tanto na resposta imune inata como na adaptativa.

Em resposta à condição de saúde ou doença nos tecidos periodontais, a regulação de PAMs pode sofrer as mais diferentes alterações. Estudos clínicos demonstraram que a catelicidina, LL-37/hCAP18, apresentou-se significativamente elevada no FCG de pacientes com periodontite crônica em comparação com pacientes periodontalmente saudáveis^{31,32}, assim como em pacientes com periodontite agressiva quando comparados à gengivite e a pacientes saudáveis³³. Foram observadas concentrações mais elevadas de HNP1-3 no FCG de pacientes com periodontite agressiva e crônica do que em pacientes periodontalmente saudáveis³². No entanto, biópsias gengivais de pacientes com periodontite apresentaram níveis mais baixos de mRNAs de hBD1, hBD2 e hBD3 em comparação com biópsias de tecido gengival saudável^{34,35}. Também foi demonstrado que o nível de hBD3 estava inversamente correlacionado com a severidade da doença e o grau de colonização de espécies bacterianas com elevado potencial periodontopatogênico³⁶.

Alguns trabalhos têm demonstrado que fatores de risco para a doença periodontal como tabagismo, diabetes melitus e obesidade podem provocar alterações na expressão dos PAMs. Dessa forma, os PAMs poderiam funcionar como um possível mecanismo de ligação entre as doenças periodontais e seus fatores de risco.

Diferentes mecanismos biológicos podem explicar a maior prevalência e severidade da doença periodontal em fumantes. Componentes do cigarro podem alterar mecanismos como: vasoconstrição periférica³⁷, a qual reduz a distribuição de oxigênio e nutrientes no tecido gengival; alterações nas funções imunológicas³⁸, podendo afetar a função neutrofílica³⁹ e fibroblástica^{40–42} além de promover a diferenciação de osteoclastos no tecido periodontal^{43–46}. Além disso, o tabagismo pode aumentar a degradação periodontal e ainda comprometer a resposta ao tratamento periodontal^{47,48}. De maneira geral, o fumo parece inibir a defesa do hospedeiro contra infecções microbianas enquanto promove ou aumenta a reação inflamatória⁴⁹. Quanto à regulação de PAMs, estudos prévios mostraram que os níveis de hBD2 e LL-37 estavam significativamente mais elevados no FCG de pacientes fumantes com periodontite agressiva generalizada em comparação com não fumantes. Da mesma forma, níveis mais altos destes PAMs foram detectados no FCG de fumantes com gengivite quando comparados a não fumantes com gengivite⁵⁰. No entanto, a expressão de hBD1 e 2 no tecido gengival saudável, com ausência de inflamação, de pacientes fumantes foi significativamente menor do que no tecido gengival de pacientes não fumantes⁵¹. Além disso, pacientes fumantes com periodontite crônica também apresentaram níveis mais baixos de LL-37 na saliva e no FCG quando comparados aos não fumantes⁵². Apesar destas evidências clínicas, o efeito do tabagismo na regulação da expressão dos PAMs ainda não se encontra devidamente elucidado.

Tem sido hipotetizado que uma combinação específica de PAMs poderia preservar a saúde bucal e que qualquer modificação desta combinação poderia refletir em um desequilíbrio da resposta imune inata⁵³. Este desequilíbrio poderia representar uma parte dos processos chaves que ainda faltam ser identificados para a compreensão dos mecanismos envolvidos no início e no desenvolvimento das doenças periodontais^{54–57}. De fato, um melhor entendimento sobre a regulação dos PAMs nos tecidos periodontais é importante para o desenvolvimento de novas medidas preventivas, diagnósticas e/ou terapêuticas para as doenças periodontais.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que existe uma associação entre o tabagismo e alterações na expressão de PAMs. O tabagismo teve um efeito negativo na expressão de PAMs de origem neutrofílica, como a LL-37 e HNP 1-3, no FCG de sítios saudáveis e doentes de pacientes com periodontite crônica. Já nos PAMs de origem epitelial, o fumo reduziu os níveis de hBD1, porém aumentou os níveis de hBD2 nos sítios que apresentavam sinais clínicos de periodontite.

Em relação à condição clínica periodontal, PAMs apresentaram modulações distintas. Sítios doentes apresentaram maiores níveis de LL-37, positivamente correlacionados com mediadores pro-inflamatórios, enquanto a HNP 1-3 apresentava-se em menores níveis quando comparados a sítios saudáveis, sendo positivamente correlacionada a mediadores anti-inflamatórios, independentemente da presença do hábito de fumar.

Além disso, produtos tóxicos do cigarro, como a nicotina e cotinina, promoveram uma redução na expressão gênica de hBD1 por queratinócitos humanos, sendo essa redução mais intensa na presença do patógeno *A. actinomycetemcomitans*. Estes mesmos produtos reduziram a expressão gênica de hBD2 apenas na presença de patógenos periodontais, sendo o efeito da nicotina mais acentuado na presença de *A. actinomycetemcomitans* e da cotinina na presença de *P. gingivalis*.

Em relação aos peptídeos sintéticos testados em biofilmes multi-espécies, foi possível demonstrar que a versão D-aminoácido da LL-31 apresenta maior efeito inibitório, proporcionando maior redução da atividade metabólica e enzimática sobre a recolonização de biofilme multi-espécies periodontopatogênico.

REFERÊNCIAS*

1. Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 2005;49:517–32.
2. Van Dyke TE, Dave S. Risk Factors for Periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* 2005;7(1):3–7.
3. Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (Fpr1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T Cells. *J Exp Med.* 2000;192:1069–74.
4. Ji S, Hyun J, Park E, Lee B-L, Kim K-K, Choi Y. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. *J Periodont Res.* 2007;42:410–9.
5. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O’Neal R, et al. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodont Res.* 2001;36:285–94.
6. Barlow PG, Findlay EG, Currie SM, Davidson DJ. Antiviral potential of cathelicidins. *Future Microbiol.* 2014;9:55–73.
7. Delattin N, Brucker KD, Cremer KD, Cammue BPA, Thevissen K. Antimicrobial peptides as a strategy to combat fungal biofilms. *Curr Top Med Chem.* 2017;17:604–12.
8. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol.* 2017;133:117–38.
9. McCormick TS, Weinberg A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity: Epithelial cell-derived antimicrobial peptides in immunity. *Periodontol 2000.* 2010;54:195–206.
10. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol.* 2010;5:99–113.
11. 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.
12. Devine DA. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol Immunol.* 2003;40:431–43.

* 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. 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;146:218–25.
14. 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 Periodont Res*. 2018;53:145–55.
15. Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(3 Pt 1):381–90; quiz 391–2.
16. Oppenheim J, Biragyn A, Kwak L, Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:17–21.
17. 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;13:3084–95.
18. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9:356–68.
19. Semple F, Dorin JR. β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immun*. 2012;4:337–48.
20. Cullen TW, Schofield WB, Barry NA, Putnam EE, Rundell EA, Trent MS, et al. Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science*. 2015;347:170–5.
21. Rodríguez-García M, Oliva H, Climent N, García F, Gatell JM, Gallart T. Human immature monocyte-derived dendritic cells produce and secrete alpha-defensins 1-3. *J Leukoc Biol*. 2007;82:1143–6.
22. Selsted ME, Harwig SS. Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide. *J Biol Chem*. 1989;264(7):4003–7.
23. Tang YQ, Selsted ME. Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *J Biol Chem*. 1993;268:6649–53.
24. Lundy FT, Orr DF, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ. Detection of individual human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in unfractionated gingival crevicular fluid--a MALDI-MS approach. *Mol Immunol*. 2005;42:575–9.
25. van Wetering S, Sterk PJ, Rabe KF, Hiemstra PS. Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung? *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:1131–8.
26. Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:727–38.
27. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest*. 2003;111:1665–72.

28. Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, Blecha F. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 2002;4:361–72.
29. Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun.* 1999;67:2561–6.
30. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res.* 2002;81:845–50.
31. Turkoglu O, Emingil G, Kutukculer N, Atilla G. Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. *J Periodont.* 2009;80:969–76.
32. Puklo M, Guentsch A, Hiemstra P, Eick S, Potempa J. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:328–35.
33. Turkoglu O, Emingil G, Eren G, Atmaca H, Kutukculer N, Atilla G. Gingival crevicular fluid and serum hCAP18/LL-37 levels in generalized aggressive periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2017;21:763–9.
34. Kuula H, Salo T, Pirilä E, Hagström J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, et al. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol.* 2008;53:175–86.
35. 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;33:278–85.
36. 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;90:241–5.
37. Baab DA, Oberg PA. The effect of cigarette smoking on gingival blood flow in humans. *J Clin Periodontol.* 1987;14:418–24.
38. Barbour SE, Nakashima K, Zhang JB, Tangada S, Hahn CL, Schenkein HA, et al. Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8:437–60.
39. Persson L, Bergström J, Ito H, Gustafsson A. Tobacco smoking and neutrophil activity in patients with periodontal disease. *J Periodontol.* 2001;72:90–5.
40. Lahmouzi J, Simain-Sato F, Defresne MP, De Pauw MC, Heinen E, Grisar T, et al. Effect of nicotine on rat gingival fibroblasts in vitro. *Connect Tissue Res.* 2000;41:69–80.

41. Tanur E, McQuade MJ, McPherson JC, Al-Hashimi IH, Rivera-Hidalgo F. Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J Periodontol*. 2000;71:717–22.
42. Ho Y-C, Chang Y-C. Regulation of nicotine-induced cyclooxygenase-2 protein expression in human gingival fibroblasts. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27:409–13.
43. Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000*. 2007;44:178–94.
44. Chang Y-C, Huang F-M, Tai K-W, Yang L-C, Chou M-Y. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodont Res*. 2002;37:279–85.
45. Giannopoulou C, Geinoz A, Cimasoni G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol*. 1999;26:49–55.
46. Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH, et al. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol*. 2003;74:1440–6.
47. Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol*. 1996;67:675–81.
48. Labriola A, Needleman I, Moles DR. Systematic review of the effect of smoking on nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2005;37:124–37.
49. Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol 2000*. 2007;43:267–77.
50. 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 Periodont Res*. 2014;49:282–9.
51. Wolgin M, Liodakis 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.
52. Turkoglu O, Eren G, Emingil G, Azarsiz 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.
53. Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet*. 2002;360:1116–7.
54. Putsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet*. 2002;360:1144–9.

55. 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.
56. Karlsson J, Carlsson G, Ramme KG, Hagglund H, Fadeel B, Nordenskjöld M, et al. Low plasma levels of the protein pro-LL-37 as an early indication of severe disease in patients with chronic neutropenia. *British journal of haematology*. 2007;137:166–9.
57. 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.
58. Johannsen A, Susin C, Gustafsson A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease: Smoking and inflammation. *Periodontology* 2000. 2014;64:111–26.
59. Palmer GD, Watts TLP, Addison IE. A skin window study of neutrophil migration in subjects with localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1993;20:452–6.
60. Payne JB, Johnson GK, Reinhardt RA, Dyer JK, Maze CA, Dunning DG. Nicotine effects on PGE2 and IL-1 beta release by LPS-treated human monocytes. *J Periodont Res*. 1996;31:99–104.
61. Makino A, Yamada S, Okuda K, Kato T. Nicotine involved in periodontal disease through influence on cytokine levels. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;52:282–6.
62. Sugano N, Shimada K, Ito K, Murai S. Nicotine inhibits the production of inflammatory mediators in U937 cells through modulation of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252:25–8.
63. Mansour SC, Pena OM, Hancock REW. Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol*. 2014;35:443–50.
64. Nijnik A, Hancock REW. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol*. 2009;16:41–7.
65. Yamamoto-Furusho JK, Barnich N, Hisamatsu T, Podolsky DK. MDP-NOD2 stimulation induces HNP-1 secretion, which contributes to NOD2 antibacterial function. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:736–42.
66. Turkoglu O, Emingil G, Kutukculer N, Atilla G. Evaluation of gingival crevicular fluid adrenomedullin and human neutrophil peptide 1-3 levels of patients with different periodontal diseases. *J Periodontol*. 2010;81:284–91.
67. Grant M, Kilsgård O, Åkerman S, Klinge B, Demmer RT, Malmström J, et al. The human salivary antimicrobial peptide profile according to the oral microbiota in health, periodontitis and smoking. *J Innate Immun*. 2018;1–12.
68. Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;11:37–51.

69. McCrudden MTC, Orr DF, Yu Y, Coulter WA, Manning G, Irwin CR, et al. LL-37 in periodontal health and disease and its susceptibility to degradation by proteinases present in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 2013;40:933–41.
70. Hong SY, Oh JE, Lee KH. Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. *Biochem Pharmacol*. 1999;58:1775–80.