



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ESTUDO DA FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL E FERRAMENTAS
APLICADAS AO DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA**

Aluno: WELLINGTON FRANCISCO RODRIGUES

Orientador: PROF. DR. CARLOS UEIRA VIEIRA

UBERLÂNDIA - MG

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ESTUDO DA FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL E FERRAMENTAS
APLICADAS AO DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA**

Aluno: WELLINGTON FRANCISCO RODRIGUES

Orientador: PROF. DR. CARLOS UEIRA VIEIRA

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Bioquímica
(Área Genética)**

UBERLÂNDIA - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R696e
2016 Rodrigues, Wellington Francisco, 1983
 Estudo da fisiopatologia da doença periodontal e ferramentas
 aplicadas ao diagnóstico e terapêutica / Wellington Francisco Rodrigues.
 - 2016.
 84 f. : il.

 Orientador: Carlos Ueira Vieira.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.

 1. Genética - Teses. 2. Periodontia - Teses. 3. Doença periodontal -
Tratamento - Teses. 4. Fisiopatologia - Teses. I. Vieira, Carlos Ueira. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ESTUDO DA FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL E FERRAMENTAS
APLICADAS AO DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA**

ALUNO: Wellington Francisco Rodrigues

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Siomar de Castro Soares

Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

Prof. Dra. Ana Graci Brito Maduro

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Data da Defesa: 08 / 12 / 2016

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

(Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira)

DEDICATÓRIA

A todos que acreditam que a vida pode ser e é algo mais além da busca da felicidade, a todos que acreditam que nas diversidades da vida há reais possibilidades de crescimento moral e/ou científico, a todos que de alguma forma contribuem na perpetuação de minhas crenças e buscas, pois vocês possibilitam a sublime e real menção de meu viver, em especial à minha Mãe, Manoelina Rodrigues, meus avós (*in memoriam*) Nair Alves Rodrigues e Joaquim Rodrigues, às minhas tias Beatriz Rodrigues e Maria Aparecida Rodrigues, e minha companheira, amiga, namorada e futura Esposa Camila Botelho Miguel!

AGRADECIMENTOS

À força singular que pluraliza sonhos... Ações... Emoções... e todo e qualquer movimento nesse espaço incompreensível mais fascinante de se viver!!

À coordenação do curso, Dra. Renata Santos Rodrigues, por fazer parte de um sistema que possibilitou concretizar este trabalho, pelo profissionalismo e dedicação.

Ao meu orientador Dr. Carlos Ueira Vieira pela confiança, apoio, dedicação, profissionalismo em todas as etapas do projeto, e principalmente por fazer parte fundamental na possibilidade da busca da concretização de um sonho.

Ao Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pelo profissionalismo, dedicação e principalmente por acreditar, apoiar e fazer parte da possibilidade da concretização deste objetivo.

Aos Professores (as) Dra. Ana Maria Bonetti (UFU), Dra. Ana Paula Oliveira Nogueira (UFU), Dr. Mário Antônio Spanó, Dr. Foued Salmen Espindola (UFU), Dr. Luiz Claudio Cameron (UFERJ/UFU), Dr. Tony de Paiva Paulino (CEFORES/UFTM), Dr. Siomar de Castro Soares (UFTM), Dr. Carlo José Freire de Oliveira (UFTM), Dr. Javier Emilio Lazo Chica (UFTM), Dr. Marcelo Henrique Napimoga (São Leopoldo Mandic), Dr. Alexandre da Costa Pereira (USP/SP) pela confiança, dedicação, profissionalismo e principalmente pela oportunidade de crescimento científico e moral, assim como a possibilidade da realização deste e outros trabalhos.

Aos colegas e amigos Carlos Antônio Trindade da Silva, Emília Rezende Vaz, Patrícia Terra Alves, Aline Gomes, Gabriela Venturini da Silva, Lara Vecchi obrigado pelas colaborações e apoio de sempre.

Aos órgãos e instituições financiadores e apoiadores deste trabalho: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico, Universidade Federal de Uberlândia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Instituto do Coração – USP e São Leopoldo Mandic.

Aos demais colaboradores, amigos, mestres e instituições em que de alguma forma contribuíram para a execução desta obra e a realização de um sonho os meus agradecimentos.

LISTA DE ABREVEATURAS

μL = Microlitro

cAMP = Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CREP = Elemento ligado à resposta de cAMP

DCV = Doença cardiovascular

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EDTA = Etilenodiaminotetracético

g = Gravitacional

HMDB = Banco de dados metabolômico humano

IL = Interleucina

kDa = Quilodalton

Kg = Quilograma

mL = Mililitro

mm² = Milímetro quadrado

Mmp = Matriz metaloproteinase

MS = Espectrômetro de massas

Ng = Nanograma

OD = Densidade óptica

PBMC = Célula mononuclear do sangue periférico

PBS = Tampão fosfato salino

PCR = Proteína C reativa

Pg = Picograma

RankL = Ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B

SD = Desvio Padrão

ST2 = Receptor ST2

Th = Linfócito T auxiliar

TLR = Receptores do tipo Toll

TNF- α = Fator de Necrose Tumoral-alfa

VEGF = Fator de crescimento endotelial vascular

VIP = Variáveis importantes na projeção

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
APRESENTAÇÃO	9
CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
Referências Bibliográficas.....	15
Capítulo 2 - PARTICIPATION OF THE ADRENERGIC SYSTEM IN THE ACTIVITY OF PROTEINS INVOLVED IN VASCULAR LESIONS ASSOCIATED WITH EXPERIMENTAL PERIODONTAL DISEASE	19
1. Abstract.....	20
2. Introduction	21
3. Materials and Methods.....	22
3.1 Animals.....	22
3.2 Experimental design and ligature placement.....	22
3.3. Hematologic parameters	23
3.4. Histological procedures and histometric analyses	23
3.5. Detection of cytokines	24
3.6. Estimation of C-reactive protein (CRP).....	24
3.7. Statistical analysis	24
4. Results	25
4.1. Experimental periodontitis induced by ligature placement.....	25
4.2. Plasma concentrations of TNF- α , IL-6 and CRP	26
4.3. Effect of propranolol on the hematological parameters of animals with experimental periodontitis.....	27
5. Discussion.....	29
6. Acknowledgements	31
7. Conflict of Interest Statement.....	31
8. References.....	31
CAPÍTULO 3 AVALIAÇÃO METABOLÔMICA DA DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA NA TERCEIRA IDADE	35
1. Resumo.....	36
2. Abstract.....	37
3. Introdução	38
4. Material e Métodos	39
4.1. Aspectos éticos	39
4.2. Critérios de inclusão	39
4.3. Critérios de exclusão	39
4.4. Coleta de Material Biológico	39
4.5. Metaboloma.....	39
4.6. Controle de Qualidade.....	41
4.7. Análise estatística.....	41
5. Resultados	41
6. Discussão	47
7. Referências Bibliográficas.....	48
CAPÍTULO 4 ESTUDO RETROSPECTIVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E PROTEÍNA PRÓ-INFLAMATÓRIA NA SENESCÊNCIA	49
1. Resumo.....	50
2. Abstract.....	51

3. Introdução	52
4. Métodos	53
4.1. Tipo de Estudo	53
4.2. Extração dos Dados e Critérios de Inclusão e Exclusão	53
4.3. Análise Estatística	53
5. Resultados	54
6. Discussão	61
7. Referências Bibliográficas.....	63
CAPÍTULO 5. SELEÇÃO E PREDIÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS PARA	
RECEPTORES ST2	65
1. Resumo.....	66
2. Abstract.....	67
3. Introdução	68
4. Métodos	68
4.1. Amostras biológicas	68
4.2. Células mononucleares humanas (PBMC) e mastócitos peritoneal de ratos ..	69
4.3. Isolamento de peptídeos ligantes a superfície de PBMC e da IL-33	69
4.4. Extração de DNA de fagos	70
4.5. Sequenciamento.....	70
4.6. Bioinformática.....	70
4.7. Elisa.....	71
4.8. Estatística	72
5. Resultados	72
6. Discussão	75
7. Referências Bibliográficas.....	76

APRESENTAÇÃO

O sistema imune é um importante mecanismo de defesa contra agressões, bem como participa na manutenção do equilíbrio orgânico. As moléculas sinalizadoras do sistema imune além de participarem de sinais que visam eliminar os antígenos, se relacionam com danos teciduais. Desta forma se tornam importantes alvos de estudos. Com o advento de técnicas imunológicas, nano biotecnológicas e ainda a inserção das ciências ômicas tem avançado em passos largos na busca de respostas ao desenvolvimento e interações de doenças, assim como na inserção de novas terapias ou mesmo mecanismos de prevenção.

Essa abordagem traz 5 capítulos, todos relacionam o estudo de moléculas sinalizadoras para indução, tratamento ou diagnóstico de doenças. O primeiro capítulo aborda de forma geral todos os temas que foram discutidos ao longo da tese. O segundo capítulo aborda a interação de um beta bloqueador adrenérgico não seletivo com proteínas sinalizadoras da resposta inflamatória na doença periodontal associadas à participação da indução de doenças cardiovasculares. Os resultados demonstram uma diminuição das proteínas associadas com desenvolvimento de doença cardiovasculares após tratamento com antagonista beta adrenérgico não seletivo em baixas concentrações.

O terceiro relaciona descritores que possibilitam a indicação de principais proteínas sinalizadores na doença periodontal crônica no idoso. Neste relatamos a falta de associação e/ou abordagens que incluam esta importante população relacionada com diminuição da capacidade responsiva do sistema imune e aumento de índices de doença periodontal. Ainda assim, evidenciamos uma proteína que pode estar relacionada ao processo fisiopatogênico da doença periodontal, incluindo ao idoso, a IL-33; da qual é relacionada com a ativação de osteoclastos independente de RankL.

Após certificar do aumento de moléculas sinalizadoras, e evidentemente com o aumento de metabólitos no local que ocorre o processo inflamatório, o estudo foi direcionado para prever alvos para diagnóstico na doença periodontal crônica do idoso. Esta abordagem do 4º capítulo permitiu a predição de 2 metabólitos fortemente correlacionado na população idosa com doença periodontal crônica.

Por fim no quinto capítulo predizemos possíveis sequências com alta associação em se relacionar com o eixo IL-33/ST2, eixo este relacionado com a fisiopatogênese de diversas doenças inflamatórias, mediadas pelo perfil Th2, incluindo a doença

periodontal crônica. Nesta abordagem foi possível indicar sequências com alto potencial na monitoração da ativação e/ou repressão de ST2, tanto diretamente pela interação de um pequeno peptídeo no sítio de ligação ST2, como pela interação com a proteína ligante a IL-33.

Contudo esta tese permitiu contribuir para uma melhor compressão dos mecanismos fisiopatológicos da doença periodontal crônica experimental, bem como na indicação de um possível marcador biológico ao diagnóstico e tratamento da doença.

CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A doença periodontal é um processo inflamatório que afeta cerca de 90% da população e envolve a estrutura de suporte dos dentes (Listgarten, 1986; Pihlstrom e Tabak, 2005). É geralmente uma alteração progressiva destrutiva conduzindo a perda de osso e ligamento periodontal, o que pode eventualmente levar a perda dos dentes. O início da infecção está associado com vários fatores, mas uma das mais importantes é a alteração no equilíbrio da rede de citocinas e outros mediadores solúveis que ligam o sistema imune para o osso, o que leva a danos encontrados em doenças (Listgarten, 1986; Baker, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Kayal, 2013).

A doença periodontal está estreitamente associada com outras doenças inflamatórias crônicas, tais como doença cardiovascular (DCV), síndrome metabólica, diabetes e artrite reumatoide, em que aumenta o risco de desenvolvimento. Evidências mostram que mecanismos inflamatórios, bem como infecções persistentes desempenham um papel importante na aterogênese e DCV (Lundberg *et al.*, 2010; Lalla e Papapanou, 2011; Koppolu *et al.*, 2013; Nibali *et al.*, 2013; Tonetti e Dyke, 2013). A progressão do estado inflamatório na periodontite sistemicamente leva à produção de mediadores nas proximidades, tais como a proteína C reativa (PCR), Interleucinas-1 beta (IL 1 β), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), e a Interleucina 6 (IL-6). A produção desses mediadores inflamatórios em doenças periodontais crônicas depende de vários fatores, incluindo processos infecciosos persistentes (Glurich *et al.*, 2002). Além disso, elevação dos níveis destas proteínas pró-inflamatórias colabora com a lesão do tecido, uma vez que estão ligadas à ativação de algumas células do sistema imune (Laurent *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2013; Tehrani *et al.*, 2013; Genre *et al.*, 2014). Assim, o aumento destas proteínas, citadas anteriormente, na doença periodontal são associadas ao desenvolvimento de doenças com características sistêmicas, incluindo DCV (Laurent *et al.*, 2007).

Foi demonstrado recentemente que o tratamento periodontal em indivíduos com DCV pode contribuir para a redução significativa de PCR e TNF- α , que são fatores associados ao processo de sinalização para o desenvolvimento de DCV (Koppolu *et al.*, 2013) e o aumento da osteoclastogênese, bem como o aumento de mediadores inflamatórios, e ativação de receptores adrenérgicos (Takeuchi *et al.*, 2001; Bonnet *et al.*, 2008). Receptores beta-adrenérgicos são receptores de membrana celular expressos em vários tecidos ao longo do corpo. A sua ativação pode regular a atividade de órgãos

tais como o coração, pulmão, pele, e o cérebro (Guimarães e Moura, 2001) bem como osteoclastos. Foi demonstrado em modelo animal de periodontite que o bloqueio dos adrenoreceptores com propranolol, um antagonista beta-adrenérgico não seletivo, é importante para a regulação dos mediadores inflamatórios locais, e isto contribuiu para redução da lesão tecidual via redução da expressão de RANK-L e, por conseguinte a redução da osteoclastogênese (Rodrigues *et al.*, 2012). Além disso, a ativação dos receptores β -adrenérgicos parece estar relacionada com a expressão aumentada de mRNA para IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Wang *et al.*, 2010). Por outro lado, o bloqueio destes receptores com propranolol também tem sido eficiente na redução da hiperatividade simpático e induziu atividade anti-inflamatória em modelo de coagulopatia (Xu *et al.*, 2015).

Na periodontite (Mcbean *et al.*, 2004; Boehm e Scannapieco, 2007; Ostchega *et al.*, 2007; Tutuncu e Kavanaugh, 2007) a manutenção da microbiota através do sistema imune trata-se de um importante mecanismo para a manutenção da saúde clínica do periodonto, portanto alguns grupos são fragilizados ao desenvolvimento da doença periodontal crônica, como o idoso (Mcbean *et al.*, 2004).

A senescência apresenta diversos eventos que predis põem este grupo a infecções, condições estas que aumentam a morbidade e mortalidade (Bôas *et al.*, 2007). Essa suscetibilidade apresentada nos idosos está associada à diminuição das funções normais do sistema imunológico. A população de linfócitos T é alterada com o avanço da idade, portanto a eficiência dos monócitos/macrófagos em destruir invasores fica prejudicada (Albright e Albright, 1994; Wu e Meydani, 2008), favorecendo a instalação da doença no periodonto.

Dado as características heterogêneas, advindas da diversidade de repostas imunes frente à agressão infecciosa, esforços têm sido feitos para eleger marcadores no fluido crevicular que possibilitam a predição da doença periodontal bem como o seu estado (Kuboniwa *et al.*, 2016).

A senescência celular traz ao indivíduo uma série de vulnerabilidades que até então não havia passado, onde está associada ao desenvolvimento e índices maiores para o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como: diabetes, hipertensão arterial, artrite reumatoide e doença periodontal (Mcbean *et al.*, 2004; Boehm e Scannapieco, 2007; Ostchega *et al.*, 2007; Tutuncu e Kavanaugh, 2007). O idoso é associado a uma menor saúde do periodonto, bem como uma maior prevalência de doenças periodontais e gravidade. A condição de doença periodontal afeta em sua maioria a

população adulta, com uma estimativa de 10 a 15% do desenvolvimento de periodontite severa (Velden, 1991; Pihlstrom *et al.*, 2005). As doenças periodontais incluem diversas alterações dos tecidos de proteção e sustentação dos órgãos dentais, cuja etiologia está relacionada à placa dental bacteriana (Loesche, 1993; Franceschi *et al.*, 2000).

A interação entre o sistema imune e os agentes bacterianos irá determinar o estado de doença ou a manutenção do tecido saudável, onde na velhice há uma nítida alteração entre os padrões da resposta imune inata e adaptativa, das quais podem favorecer ao desenvolvimento e manifestações de doenças, incluindo a doença periodontal (Ebersole *et al.*, 2016). De forma geral os fatores bacterianos induzem uma reação inflamatória local, da qual é capaz de ativar o sistema de imunidade inata, através da ativação dos receptores do tipo Toll (TLR), localizadas na superfície de células residentes e leucócitos. A ativação destas células resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de fagócitos e linfócitos para a zona de inflamação (Gankovskaya *et al.*, 2015).

Além disso, mediadores de respostas Th1 e Th2 estão presentes no tecido periodontal, e o balanço destas resposta imune adaptativa mista poderia estar relacionado ao grau de severidade da doença (Gemmell e Seymour, 2004). Na doença crônica ativa mecanismos sinalizadores que permitem processos que favorecem a reabsorção óssea, com perda de matriz e suporte, somado a isto, o processo inflamatório e as proteínas liberadas, estão relacionados com desenvolvimento de doenças crônicas (Accarini e Godoy, 2006; Alves *et al.*, 2007; Cochran, 2008).

A IL-33 (também chamado IL-1F11), é uma citocina pertencente à família IL-1, é mais relacionada em estrutura com a IL-18 e IL-1 β (Schmitz *et al.*, 2005). A IL-33 induz as células T auxiliares, mastócitos, basófilos, eosinófilos, pela sinalização do receptor da IL-1 relacionada com a proteína ST2 (Schmitz *et al.*, 2005; Hayakawa *et al.*, 2007) e o receptor acessório da IL-1 (Palmer *et al.*, 2008), onde ativa NF-kB e quinases para induzir a produção de citocinas tipo 2 (Dinarello, 2005; Schmitz *et al.*, 2005; Komai-Koma *et al.*, 2007).

O gene da IL-33 humana está localizado na região cromossômica 9p24, enquanto o seu homólogo do rato pode ser encontrado na região cromossômica 19qC1 (Schmitz *et al.*, 2005). As sequências de cDNA da IL-33 codificam 270 e 266 aminoácidos para homem e camundongo, respectivamente, correspondentes a todo o comprimento de proteínas com massas calculadas de 30 e 29,9 kDa (Schmitz *et al.*,

2005). A IL-33 estimula uma via pró-inflamatória e Th2 em mastócitos e linfócitos Th2 (Ali *et al.*, 2007; Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009), induzindo assim a quimiotaxia de células Th2, promove adesão de eosinófilos e basófilos, além de aumenta a sobrevivência e migração de eosinófilos e basófilos (Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009).

A ativação da IL-33 via o seu receptor ST2 faz parte do eixo de diversas doenças, principalmente associadas a processos alérgicos, como a asma (Préfontaine *et al.*, 2009), ou ainda diabetes, doenças cardíacas e periodontal. A ativação do eixo IL-33/ST2 modula de maneira semelhante a transcrição de genes vinculados à mediadores inflamatórios e a osteoclastogênese, processo semelhante ao eixo RANK/RANKL (Figura 1). Desta forma o eixo IL-33/ST2 torna-se um importante alvo terapêutico e diagnóstico (Liew *et al.*, 2010; Miller e Liew, 2011).

- 6 LUNDBERG, K. et al. Periodontitis in RA—the citrullinated enolase connection. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 12, p. 727-730, 2010. ISSN 1759-4790.
- 7 LALLA, E.; PAPAPANOU, P. N. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 738-748, 2011. ISSN 1759-5029.
- 8 NIBALI, L. et al. Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 3, p. 913-920, 2013. ISSN 0021-972X.
- 9 TONETTI, M. S.; DYKE, T. E. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of clinical periodontology**, v. 40, n. s14, 2013. ISSN 1600-051X.
- 10 KOPPOLU, P. et al. Estimate of CRP and TNF-alpha level before and after periodontal therapy in cardiovascular disease patients. **Pan African Medical Journal**, v. 15, n. 1, 2013. ISSN 1937-8688.
- 11 GLURICH, I. et al. Systemic inflammation in cardiovascular and periodontal disease: comparative study. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 2, p. 425-432, 2002. ISSN 1556-6811.
- 12 GENRE, F. et al. Adipokines, biomarkers of endothelial activation, and metabolic syndrome in patients with ankylosing spondylitis. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. ISSN 2314-6133.
- 13 LIN, Q. et al. [Relationship between obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome and high sensitivity C-reactive protein in non-obese subjects]. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 93, n. 30, p. 2355-2358, 2013. ISSN 0376-2491.
- 14 TEHRANI, D. M. et al. Impact of inflammatory biomarkers on relation of high density lipoprotein-cholesterol with incident coronary heart disease: cardiovascular Health Study. **Atherosclerosis**, v. 231, n. 2, p. 246-251, 2013. ISSN 0021-9150.
- 15 LAURENT, F. et al. [Relationship between coronary artery disease and periodontal disease. What the cardiologist must know]. *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 2007. 297-302 p.
- 16 TAKEUCHI, T. et al. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. **Biochemical pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 579-586, 2001. ISSN 0006-2952.
- 17 BONNET, N.; PIERROZ, D.; FERRARI, S. L. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 8, n. 2, p. 94-104, 2008.
- 18 GUIMARÃES, S.; MOURA, D. Vascular adrenoceptors: an update. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 2, p. 319-356, 2001. ISSN 1521-0081.
- 19 RODRIGUES, W. et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 7, p. 2140-2151, 2012. ISSN 1476-5381.
- 20 WANG, J. et al. β -adrenoceptor mediated surgery-induced production of pro-inflammatory cytokines in rat microglia cells. **Journal of neuroimmunology**, v. 223, n. 1, p. 77-83, 2010. ISSN 0165-5728.
- 21 XU, L. et al. Impact of β -Adrenoceptor Blockade on Systemic Inflammation and Coagulation Disturbances in Rats with Acute Traumatic Coagulopathy. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 468, 2015.
- 22 MCBEAN, A. M. et al. Differences in diabetes prevalence, incidence, and mortality among the elderly of four racial/ethnic groups: whites, blacks, Hispanics, and Asians. **Diabetes care**, v. 27, n. 10, p. 2317-2324, 2004. ISSN 0149-5992.

- 23 OSTCHEGA, Y. et al. Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control in older US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1988 to 2004. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 55, n. 7, p. 1056-1065, 2007. ISSN 1532-5415.
- 24 TUTUNCU, Z.; KAVANAUGH, A. Rheumatic disease in the elderly: rheumatoid arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 57-70, 2007. ISSN 0889-857X.
- 25 BOEHM, T. K.; SCANNAPIECO, F. A. The epidemiology, consequences and management of periodontal disease in older adults. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, p. S26-S33, 2007. ISSN 0002-8177.
- 26 BÔAS, P. J. F. V.; LÚCIA, A.; FERREIRA, A. Infecção em idosos internados em instituição de longa permanência. **Cep**, v. 18600, p. 005, 2007.
- 27 WU, D.; MEYDANI, S. N. Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 4, p. 900-914, 2008. ISSN 0741-5400.
- 28 ALBRIGHT, J. W.; ALBRIGHT, J. F. Ageing alters the competence of the immune system to control parasitic infection. **Immunology letters**, v. 40, n. 3, p. 279-285, 1994. ISSN 0165-2478.
- 29 KUBONIWA, M. et al. Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. **Journal of Dental Research**, p. 0022034516661142, 2016. ISSN 0022-0345.
- 30 PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, 2005. ISSN 0140-6736.
- 31 VELDEN, U. The onset age of periodontal destruction. **Journal of clinical periodontology**, v. 18, n. 6, p. 380-383, 1991. ISSN 1600-051X.
- 32 FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, n. 1, p. 244-254, 2000. ISSN 1749-6632.
- 33 LOESCHE, W. J. Bacterial mediators in periodontal disease. **Clinical infectious diseases**, v. 16, n. Supplement 4, p. S203-S210, 1993. ISSN 1058-4838.
- 34 EBERSOLE, J. L. et al. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 72, n. 1, p. 54-75, 2016. ISSN 1600-0757.
- 35 GANKOVSKAYA, L. et al. [ROLE OF INNATE IMMUNITY FACTORS IN PERIODONTITIS PATHOGENESIS]. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, n. 2, p. 100-107, 2015. ISSN 0372-9311.
- 36 GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 35, n. 1, p. 21-41, 2004. ISSN 1600-0757.
- 37 COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 8S, p. 1569-1576, 2008. ISSN 0022-3492.
- 38 ACCARINI, R.; GODOY, M. F. D. Periodontal disease as a potential risk factor for acute coronary syndromes. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 87, n. 5, p. 592-596, 2006. ISSN 0066-782X.
- 39 ALVES, C. D. A. D. et al. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. 2007. ISSN 0004-2730.
- 40 SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479-490, 2005. ISSN 1074-7613.
- 41 HAYAKAWA, H. et al. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 36, p. 26369-26380, 2007. ISSN 0021-9258.

- 42 PALMER, G. et al. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. **Cytokine**, v. 42, n. 3, p. 358-364, 2008. ISSN 1043-4666.
- 43 DINARELLO, C. A. An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 461-462, 2005. ISSN 1074-7613.
- 44 KOMAI-KOMA, M. et al. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. **European journal of immunology**, v. 37, n. 10, p. 2779-2786, 2007. ISSN 1521-4141.
- 45 ALI, S. et al. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 47, p. 18660-18665, 2007. ISSN 0027-8424.
- 46 PECARIC-PETKOVIC, T. et al. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1526-1534, 2009. ISSN 0006-4971.
- 47 PRÉFONTAINE, D. et al. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 8, p. 5094-5103, 2009. ISSN 0022-1767.
- 48 MILLER, A. M.; LIEW, F. Y. The IL-33/ST2 pathway—a new therapeutic target in cardiovascular disease. **Pharmacology & therapeutics**, v. 131, n. 2, p. 179-186, 2011. ISSN 0163-7258.
- 49 LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNIS, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 103-110, 2010. ISSN 1474-1733.
- 50 da Luz F. A.; Oliveira A. P.; Borges D.; Brígido P. C.; Silva M. J. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediators Inflamm.* V. 2014, p. 8, 2014.

Capítulo 2 - PARTICIPATION OF THE ADRENERGIC SYSTEM IN THE ACTIVITY OF PROTEINS INVOLVED IN VASCULAR LESIONS ASSOCIATED WITH EXPERIMENTAL PERIODONTAL DISEASE

Wellington Francisco Rodrigues^{a,b,c#}, Camila Botelho Miguel^{a#}, Javier Emilio Lazo Chica^{a,d}, Carlos Ueira-Vieira^c, Juliana Trindade Clemente-Napimoga^e, Carlo Jose Freire Oliveira^d, Marcelo Henrique Napimoga^{e*}

^aCurso de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil

^bDepartamento de Ciências Biofuncionais, Faculdade Morgana Potrich, Mineiros, Goiás, Brasil

^cInstituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

^dInstituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil

^eLaboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brasil

1. Abstract

Background: Levels of tumour necrosis factor- α , interleukin-6, and C-reactive protein, observed during periodontal disease, has been shown to be associated with cardiovascular diseases. The β -blocker propranolol has been recently demonstrated to have reduced pathological parameters associated with a reduction of proinflammatory molecules at the site of bone injury. Thus, the purpose of this study was to investigate the effect of β -antagonist drug, propranolol, on haematological parameters and on the concentration of systemic pro-inflammatory cytokines and C-reactive protein in an experimental model of periodontitis.

Methods: Periodontal disease was induced in Wistar rats. After euthanasia, the numbers of inflammatory cells were quantified through histopathological evaluations. In addition, haematological parameters were obtained by automation, and cytokine levels were estimated via enzyme-linked immunosorbent assay, and C-reactive protein level was assessed by immunoturbidimetric high-sensitivity assay.

Results: Low-dose and not high-dose β -blocker propranolol suppresses the systemic production of proinflammatory cytokines, tumour necrosis factor- α , and interleukin-6 as well as the acute phase protein, C-reactive protein. The haematological parameters, however, were not influenced by treatment with propranolol.

Conclusions: The β -adrenergic blockade indirectly contributes to the pattern of systemic inflammatory molecules that are involved in the development of cardiovascular disease as a consequence of periodontal disease.

Keywords: Adrenergic System, C-reactive protein, Cytokines, Periodontal disease, Vascular Lesions

2. Introduction

Periodontal disease is an inflammatory process that affects almost 90% of the population and involves the supporting structure of teeth.(Pihlstrom e Tabak, 2005; Wang *et al.*, 2013) It is usually a progressively destructive change leading to loss of bone and periodontal ligament around the teeth, which may eventually lead to their loss. The beginning of the infection is associated with several factors but one of the most important is the change in the balance of the network of cytokines and other soluble mediators that link the immune system to the bone, which leads to damage found in disease (Baker, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Mione e Zon, 2012; Wang *et al.*, 2013). Periodontal disease has been found to be closely associated with other chronic inflammatory diseases such as cardiovascular disease (CVD), metabolic syndrome, diabetes, and rheumatoid arthritis, where it increases the risk of developing such diseases (Dang *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2012; Goldsmith e Jobin, 2012; Lai *et al.*, 2012). There is mounting evidence that inflammatory mechanisms as well as unremitting infections play an important part in atherogenesis and CVD (Park e Cho, 2011). The aftermath of inflammatory progression in periodontitis systemically leads to production of mediators in the vicinity, such as C-reactive protein (CRP), interleukins-1beta (IL-1 β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and interleukin 6 (IL-6) (Silveira *et al.*, 2012; Monclaro, 2013; Hajipour *et al.*, 2014). The production of these inflammatory mediators in chronic periodontal diseases depends on several factors including the persistent infectious process(Glurich *et al.*, 2002). Moreover, the elevation in the levels of these pro-inflammatory proteins collaborates to tissue injury since they are linked to immune cell activation.(Laurent *et al.*, 2007; Nayak *et al.*, 2013; Amal *et al.*, 2015; Ülker *et al.*, 2016) Thus, the increase of these proteins in periodontal disease has been associated with the development of diseases with systemic features including CVD (Nayak *et al.*, 2013; Amal *et al.*, 2015; Ülker *et al.*, 2016).

It was demonstrated recently that periodontal treatment in subjects with CVD may contribute to significant reduction in CRP and TNF- α production, which are factors associated with the development of CVD (Park e Cho, 2011). One signaling-factor associated with increased osteoclastogenesis, as well as its inflammatory mediators, is the activation of beta-adrenergic receptors (Ali *et al.*, 2015; Souli *et al.*, 2015). Adrenoreceptors are cell membrane receptors expressed in several tissues throughout the body and their activation can regulate the activity of organs such as the heart, lung,

skin, and the brain (Spilmont *et al.*, 2015) as well as osteoclasts (Kang *et al.*, 2015). Our group recently demonstrated in an animal model of periodontitis that blockage of adrenoreceptors with propranolol, a nonselective beta-adrenoceptor antagonist, is important for regulating local inflammatory mediators and this contributes to tissue injury by reducing RANK-L expression and consequently, osteoclastogenesis (Zhao *et al.*, 2015). Moreover, the activation of β -adrenergic receptors seems to be linked with increased expression of mRNA for IL-1 β , TNF- α and IL-6 in microglial cells (Wang *et al.*, 2010). On the other hand, blocking these receptors with propranolol also shown to be efficient in reducing sympathetic hyperactivity and induce anti-inflammatory activity in a model of acute traumatic coagulopathy (Xu *et al.*, 2015). As cardiovascular diseases are associated with an increased amount of pro-inflammatory cytokines and acute phase proteins in circulation, the purpose of this study was to investigate the effect of β -antagonist drug, propranolol, on hematological parameters and on the concentration of systemic pro-inflammatory cytokines and C-reactive protein in an experimental model of periodontitis.

3. Materials and Methods

3.1 Animals

Thirty male Wistar rats were used in this study. The animals were 90 days of age and weighed 235 ± 20 g at the beginning of the study. During the acclimatization (5 days) and experimental (30 days) periods, the animals were housed in groups of five, in plastic cages, with access to food and drinking water *ad libitum*. The rats were kept in a room with a 12-h light/dark cycle and temperature maintained between 22 to 24°C. All the animal care and experimental procedures were approved by The Institutional Committee for Animal Care and Use at University of Uberaba (protocol #048/2009).

3.2 Experimental design and ligature placement

Experimental periodontitis was induced by a ligature placement. More specifically, under muscle relaxation and general anesthesia by intramuscular (IM) administration of xylazine and ketamine - 1.0 mL/kg, a ligature was placed and immobilized around both mandible first molars of each animal. The ligature was left in

position for the entire experimental period so that inflammation could be constantly induced bacteria colonizing the tissue. The next day after ligature placement, the animals were randomly assigned to one of the following groups: (i) sham-ligated animals administered vehicle (control) ($n = 6$); (ii) animals with ligature administered vehicle ($n = 6$); (iii) animals with ligature administered 0.1 mg/kg·day propranolol orally (p.o.) ($n = 6$); animals with ligature administered 5 mg/kg·day propranolol p.o. ($n = 6$); and (iv) animals with ligature administered 20 mg/kg·day propranolol p.o. ($n = 6$).

3.3. Hematologic parameters

Thirty days after ligature placement, the animals were anaesthetized (40 mg/kg sodium pentobarbital intraperitoneally [IP]) for blood collection from the ophthalmic plexus. The blood was separated into two tubes, one containing EDTA and the other, without anticoagulant for obtaining serum. The animals were then euthanasia by administering an overdose of anesthesia. Blood counts were obtained using an automated method (ABX MICROS 60 – Horiba ABX Diagnostics – France), where the differential leukocyte was performed by preparing a blood smears on glass slides and staining by Panotic (NewProv - Products Laboratory LTDA – Brazil).

3.4. Histological procedures and histometric analyses

The sections were obtained as previously described (H Ahmed *et al.*, 2014). The mandible was dissected, fixed in 10% buffered neutral formalin for 48 hours, and decalcified in 10% EDTA for 3 months. After that, decalcified samples were briefly washed in running tap water, dehydrated, and embedded in paraffin wax. Each sample was sliced into 6- μ m sections in the sagittal direction. After excluding the first and last sections in which the furcation area was totally evident, 10 equally distant sections every 30 μ m, of each molar were chosen for histometric evaluation. The area between the inter-radicular bone crest and furcation roof were assessed for the inflammatory infiltrate. Images were obtained using a light microscope plus camera (Nikon – Eclipse 50i) in a magnification of 20x. The evaluations were performed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Thereafter we obtained the ratio of the number of cell marked by area analyzed. The area analyzed was standardized by insertion of a square (51.25

$\times 10^{-3} \text{ mm}^2$), which was distributed in random way in total area evaluated, to reach a total area of $10.25 \times 10^{-1} \text{ mm}^2$ per animal.

3.5. Detection of cytokines

The levels of TNF- α and IL-6 from the serum were evaluated by performing Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, United States). Briefly, 100 μL of detection antibody was added to all wells, except the blank well, mixed gently, and incubated overnight (16 to 24h) at room temperature. Plates were washed three times, and standards and supernatants from blood (centrifuged at 1831 g/10 min) were added into respective wells in duplicate. After 2 h incubation at room temperature, the plates were washed again and incubated with 100 μL of conjugate for 60 min at room temperature. Plates were then washed three times; then, 100 μL avidin–peroxidase was added and incubated for 30 min at room temperature, followed by three washes. Next, 100 μL substrate was added, incubated for 15 min at room temperature in the dark, after which the reaction was stopped by adding 50 μL of stop solution. The color was measured using an automated microplate spectrophotometer (Microplate Reader/Model 3550, Bio-Rad Laboratories). The quantity of cytokines was determined in pg/mL. Results were calculated using the standard curves from each assay. The person carrying out ELISA assays was blind to the treatment given to each group.

3.6. Estimation of C-reactive protein (CRP)

CRP it was estimated from the serum after centrifugation (1831 g/10 min) of whole blood, using the immunoturbidimetric CRP-latex high-sensitivity assay (Denka Seiken, Tokyo, Japan), according to the manufacturer's protocol. For all laboratory tests were considered internal quality control application (Rodrigues *et al.*, 2014).

3.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 4.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Normality (Kolmogorov–Smirnov test) and homogeneous variance tests (Bartlett's test) were applied to all variables. Parametric tests (ANOVA followed by

Bonferroni's test) were used for cases with normal distributions and homogeneous variances, and the results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Non-parametric tests (the Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison) were used for cases with non-Gaussian distributions, and the results were expressed as median, maximum, and minimum values. A p -value of ≤ 0.05 was considered significant.

4. Results

4.1. Experimental periodontitis induced by ligature placement

Inflammatory infiltrate is key markers in periodontitis. So, evaluate this parameter is essential to determine the progression of the disease and to assess whether propranolol has any effect on it. The inflammatory infiltrate we mainly found mononuclear cells however, in the animals with periodontitis it was also possible to find multinucleated cells (osteoclast), osteoblasts and fibroblast (Figure 1A). The ratio of the number of cells per area of inflammatory infiltrate was significantly Increased in the untreated group and in the group of animals treated with 20 mg/kg of propranolol ($p < 0.05$) (Figure 1B).

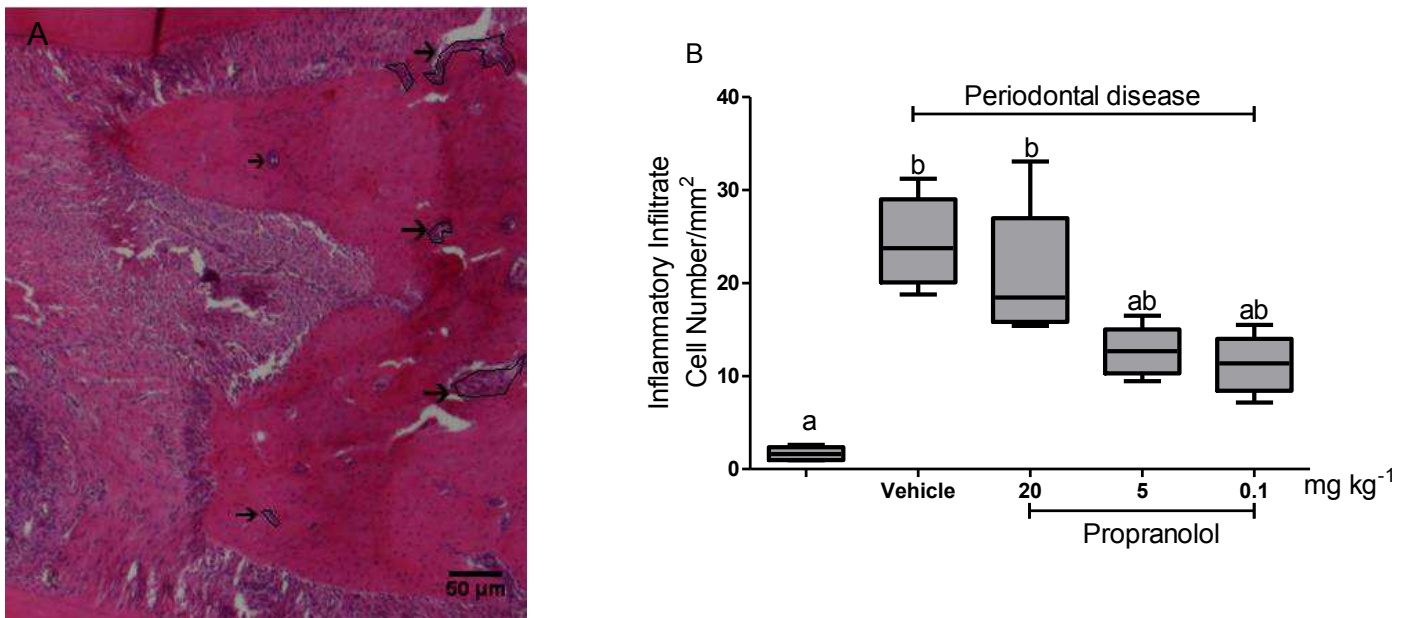


Figure 1. Inflammatory infiltrate induced by ligation in the periodontal disease model. Experimental periodontitis was induced by ligature placement. The inflammatory infiltrate was evaluated 30 days post induction in all groups. Histologically processed sections were stained with hematoxylin and eosin (H & E) and images were captured and evaluated using the ImageJ program (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). In A, the quadrants indicates the area of analysis/image, the arrows indicate areas marked with inflammatory infiltrate, the arrowhead indicates multinucleated cell (osteoclast). In B comparison of ratio of the infiltrated cells by area evaluated between the different groups. The letters a, b, and c represent statistical

differences among groups ($p < 0.05$). Groups were compared using Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison.

4.2. Plasma concentrations of TNF- α , IL-6 and CRP

Systemic levels of TNF- α , IL-6 and CRP were evaluated (Figure 2). We found a significant increase ($p < 0.05$) in the plasma concentration of TNF- α in animals with experimental periodontitis (48.59 ± 3.59 pg/mL) as compared to non-periodontitis animals (8.83 ± 2.07 pg/mL) (Figure 2a). The same pattern was observed for IL-6 (47.57 ± 6.64 pg/mL in the group with periodontitis and 15.09 ± 5.79 pg/mL in the group without periodontitis). The periodontitis-induced animals who were treated with 0.1 mg/kg (13.67 ± 3.25 pg/mL) and 5 mg/kg propranolol (18.67 ± 1.85 pg/mL) showed a strong and significant reduction in TNF- α production when compared to periodontitis-induced animals who were not treated ($p < 0.05$). The animals who received the highest concentration of propranolol (20 mg/kg) also showed a significant reduction in TNF- α production, although this effect was much less evident than that observed for lower concentrations (Figure 2a). Concerning IL-6 production, all groups treated with different doses of propranolol showed a significant decrease in the concentration of IL-6, 0.1 mg/kg (16.59 ± 1.67 pg/mL), 5 mg/kg (27.03 ± 1.74 pg/mL), and 20 mg/kg (25.00 ± 2.54 pg/mL) when compared with untreated animals (47.57 ± 6.64) (Figure 2b). As depicted in Figure 2c, animals with experimental periodontitis had higher CRP concentration (1.175 ± 0.142 ng/mL) when compared with non-periodontitis animals (0.400 ± 0.096 ng/mL). The production was reduced in the animals with periodontitis treated with propranolol at low concentrations (0.1 and 5 mg/kg); however this decrease was not significant. On the other hand, the animals treated with high doses of propranolol (20 mg/kg) showed similar CRP production as untreated animals.

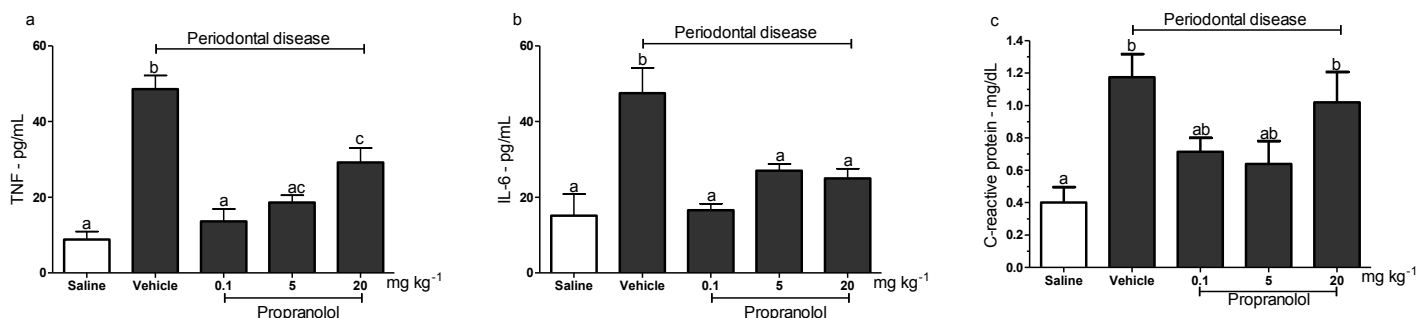


Figure 2 - Effect of propranolol administration on the systemic levels of pro-inflammatory cytokines and levels of CRP. Thirty days after periodontitis induction and propranolol treatment, the levels of TNF- α , IL-6

and CRP in the serum were estimated. The letters a, b, and c represent statistical differences among groups ($p < 0.05$). ANOVA followed by Bonferroni-test were used to compare groups.

4.3. Effect of propranolol on the hematological parameters of animals with experimental periodontitis

We also assessed the quantitative differences in the counts of erythrocytes, platelets, total leukocytes, neutrophils, lymphocytes, and monocytes from the different groups evaluated in this work. Although no statistical differences were found in hematological parameters when we compared periodontitis-induced animals with negative controls, we found a small decrease in erythrocytes (-6.81%), hematocrit (-4.49%), hemoglobin (-30%), total leukocytes (-10.65%), and lymphocytes (-18.25%). A small increase in red cell distribution width (+7.16%), platelets (+9.85%), and neutrophils (+17.01%) was also observed. The results in the groups treated with propranolol were quite similar to the untreated group and we observed no differences in the statistical data. Although not significant, we found a negative trend in monocyte counts in animals treated with 20 mg/kg propranolol. The individual results are depicted in Figure 3A-I.

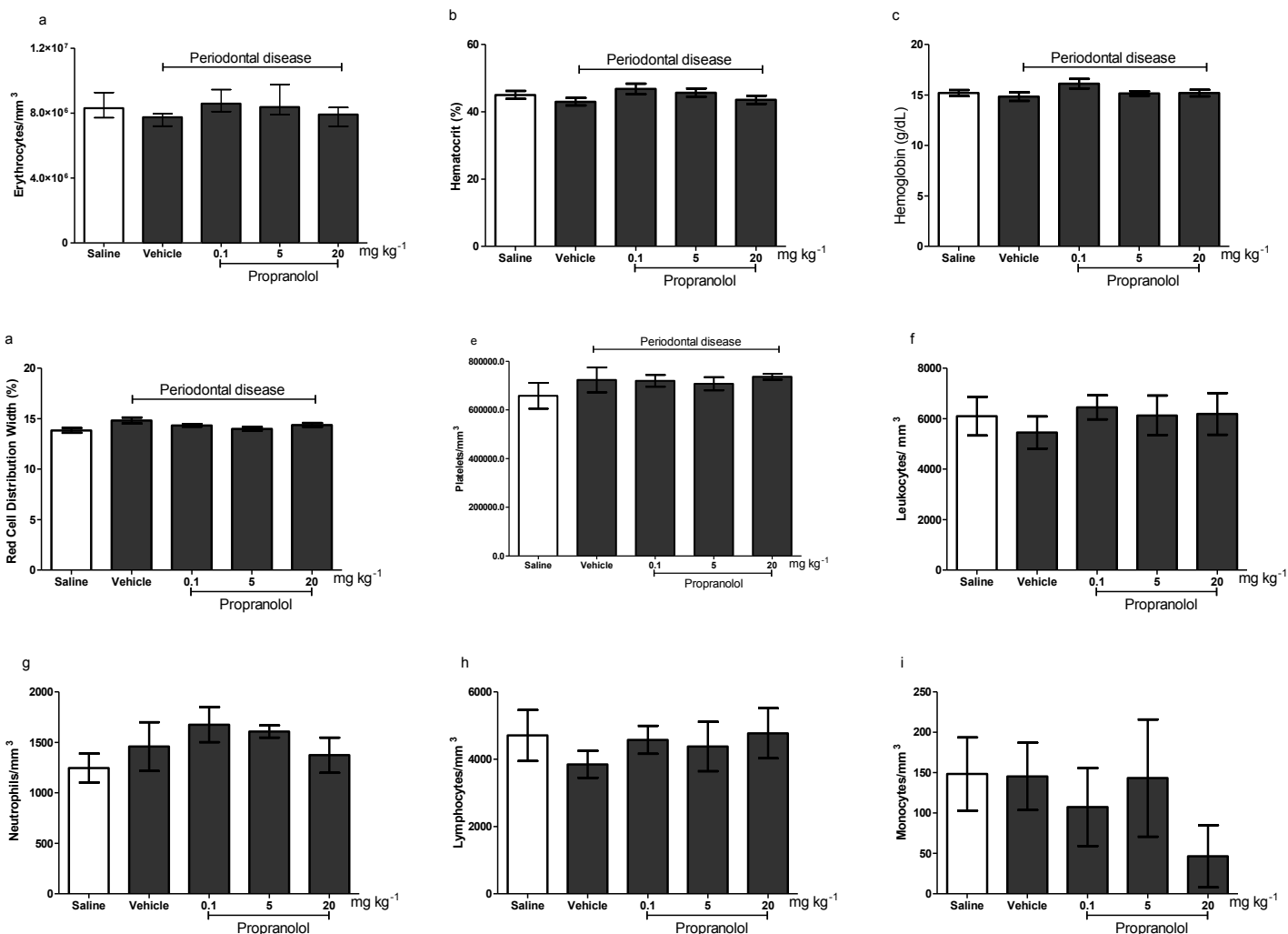


Figure 3 - Rats had experimental periodontitis induced by placement of a ligature and 30 days post induction and treatment with different doses of propranolol, blood from animals of all groups was collected with EDTA (10%) and the hematological parameters were determined. As depicted above, erythrocytes (A), hematocrit (B), hemoglobin (C), red cell distribution width (D), platelets (E), total leukocytes (F), neutrophils (G), lymphocytes (H), and monocytes (I) were measured. The erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, and red cell distribution width were evaluated automatically with the ABX MICROS 60 – Horiba ABX Diagnostics – France. The total leukocytes were counted using a Neubauer chamber, while the differential cell count (100 cells in total) was obtained using stained blood smear slides. ANOVA followed by Bonferroni-test were used to compare groups.

5. Discussion

Bacterial antigens are known to increase local and systemically pro-inflammatory mediators in periodontal disease. This increase may lead to the development of various illnesses including cardiovascular diseases. (Ahmed *et al.*, 2014; Guneidy *et al.*, 2014; Husari *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2014) Thus, efficient drugs that reduce the production of these molecules during periodontal disease are necessary.

Several efforts have been made in the last few years towards this question and endogenous, adrenergic, receptor blockers have been shown to play a central role in this process.(Trigueros *et al.*, 2014; Zahin *et al.*, 2014) Recent studies have demonstrated that while chronic treatment with β -adrenoceptor agonists exacerbates lung inflammation,(Diwakar *et al.*, 2014) chronic exposure to beta-blockers attenuates inflammation in a murine asthma model.(Zahin *et al.*, 2014) Moreover, at minimal doses, propranolol has been demonstrated to relieve inflammatory pain and this may contribute significantly to the reduction of periodontitis and its consequences.(Cavallini *et al.*, 2014)

Herein we show that proinflammatory proteins synthesis decreased in a periodontal disease model when the animals were treated with the β -adrenergic receptor blocker, propranolol. Important to note that the therapeutic dosage of propranolol is variable and depends mainly on the objective to be achieved with drug therapy. Thus, in this study we used three propranolol concentrations (0.1, 5 and 20 mg/kg/Day) of which the smallest does not alter the cardiac parameters and is close to what is being proposed for the initial treatment of some hemangiomas³³ and the other two doses refer to therapeutic doses which is capable of interfering with cardiac function or is above the therapeutic dose, respectively.²² We focused on proinflammatory proteins, namely CRP, IL-6, and TNF- α , since the levels of these molecules increased systemically after induction of experimental periodontal disease and they may be associated with cardiovascular diseases as suggested by other authors (Rana *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2014; Dushkin *et al.*, 2014; Guneidy *et al.*, 2014; Husari *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2014). Although there are few studies correlating these data, such as in our study, there is a growing concern regarding measures to modulate the production/secretion of proinflammatory molecules in periodontal diseases in order to reduce the incidence of human cardiovascular disease(Ranjbar *et al.*, 2014). Our current data suggests that inhibiting

the inflammatory process triggered by CRP, IL-6, and TNF- α specifically in the periodontium or systemically by the usage of beta-blockers, the severity of periodontal diseases and subsequently the risk of cardiovascular diseases will be reduced. As indicated in our results, the propranolol activity was dose dependent and is in line with other studies that show the interdependence of propranolol concentration in the β -adrenergic regulation. (Wang *et al.*, 2010; Diwakar *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015) Smaller doses of propranolol have been used in the treatment of Infantile hemangiomas presenting a good tolerability and exceptional antagonistic action (Léauté-Labrèze *et al.*, 2008; Diwakar *et al.*, 2014; Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2015). In the case of higher concentrations (5mg/day/kg), although there is evidence of a decrease in negative effects, there is an interaction with the cardiovascular system (Zhao *et al.*, 2015), changes that are expected and already exploited in the therapeutic use in humans (Vogelpoel *et al.*, 2004). At higher concentrations (20mg/day/kg), in addition to negative effects on the cardiovascular system, the action of propranolol demonstrates not be effective in reducing bone resorption (Stephen, 1966; Zhao *et al.*, 2015).

In addition to the dose response relationship in the adrenergic blocking of the inflammatory activity, we believe that the regulation of the expression of genes involved in the inflammatory responses, such as NF- κ B, is also dose-dependent. (Wang *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015) Thus, the non-regulation of transcriptional levels of pro-inflammatory proteins (Zhao *et al.*, 2015), associated with the systemic effects of high dose of propranolol (20mg/kg/day) collaborate to the negative effects evidenced in our study.

Despite these and other biological effects of propranolol, the mechanism of action of this β -blocker remains unclear. Propranolol is a nonselective β -adrenergic receptor antagonist that has been shown to suppress cell migration, activation, and proliferation in experimental cancer studies. These effects have been attributed to the inhibition of cAMP/PKA and Ras signaling, which in turn regulate activation of the MAPK pathway and transcription factors, such as NF- κ B, AP-1, and CREB, in addition to expression of its target genes, MMP-9, MMP-2, and VEGF.(Ferreira *et al.*, 2005; Schevey *et al.*, 2013; Spilmont *et al.*, 2014; Tapias *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015).

Further studies are required to evaluate if the signaling characterized by the activation of these molecules is affected by propranolol in experimental models of periodontal disease.

With respect to adrenergic receptor ligands and periodontal diseases we have established that the β -blocker propranolol suppresses local inflammatory markers and bone resorption by inhibiting RANKL-mediated osteoclastogenesis.(Zhao *et al.*, 2015) Here, we have added that this suppression is reflected in the kind of cells on the inflammatory infiltrate and in the systemic levels of proinflammatory proteins involved in the development of cardiovascular diseases. In agreement with this, we have demonstrated in this study that the decrease in bone resorption observed with propranolol is dose-dependent.

Importantly, the findings shown here serve as a basis for further clinical studies that relates the chronic periodontal disease, the development of CVD and the use of nonselective β -adrenergic antagonists at different stages of life and these related events must take into account the pathophysiology of the disease, the resident microbiota and the circulating soluble antigens. Thus, it is important to highlight that propranolol is the drug of choice for several indications, including hypertension, angina, and migraine. Thus, the positive results indicate that modulation of systemic inflammatory mediators could be an adjuvant to periodontitis treatment, with a possible consequence of preventing cardiovascular disease.

6. Acknowledgements

The authors thank Dr. Cesar Augusto de Moraes clinical for technical assistance. This research was supported by, CAPES/Demanda Social, FAPEMIG and FAPESP.

7. Conflict of Interest Statement

There was no funding and no publishable conflict of interests for this work.

8. References

1. Pihlstrom BL, Tabak L. The National Institute of Dental and Craniofacial Research: research for the practicing dentist. *Journal of the American Dental Association (1939)* 2005;**136**(6):728-37.
2. Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 1986;**13**(5):418-25.
3. Kayal RA. The role of osteoimmunology in periodontal disease. *BioMed research international* 2013;**2013**:639368,12p.

4. Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes and Infection* 2000;**2**(10):1181-92.
5. Zhang D, Goetz W, Braumann B, Bourauel C, Jaeger A. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. *Journal of periodontal research* 2003;**38**(3):324-32.
6. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nature Reviews Rheumatology* 2010;**6**(12):727-30.
7. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nature Reviews Endocrinology* 2011;**7**(12):738-48.
8. Nibali L, Tatarakis N, Needleman I, Tu Y-K, D'Aiuto F, Rizzo M, et al. Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013;**98**(3):913-20.
9. Tonetti MS, Dyke TE. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of clinical periodontology* 2013;**40**(s14):S24-S29.
10. Koppolu P, Durvasula S, Palaparthi R, Rao M, Sagar V, Reddy SK, et al. Estimate of CRP and TNF-alpha level before and after periodontal therapy in cardiovascular disease patients. *Pan African Medical Journal* 2014;**15**(1).
11. Renvert S, Lindahl C, Roos-Jansåker A-M, Lessem J. Short-term effects of an anti-inflammatory treatment on clinical parameters and serum levels of C-reactive protein and proinflammatory cytokines in subjects with periodontitis. *Journal of periodontology* 2009;**80**(6):892-900.
12. Kobayashi T, Yokoyama T, Ishida K, Abe A, Yamamoto K, Yoshie H. Serum cytokine and periodontal profiles in relation to disease activity of rheumatoid arthritis in Japanese adults. *Journal of periodontology* 2010;**81**(5):650-57.
13. Han D-H, Shin H-S, Kim M-S, Paek D, Kim H-D. Group of serum inflammatory markers and periodontitis-metabolic syndrome coexistence in Koreans. *Journal of periodontology* 2012;**83**(5):612-20.
14. Glurich I, Grossi S, Albin B, Ho A, Shah R, Zeid M, et al. Systemic inflammation in cardiovascular and periodontal disease: comparative study. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2002;**9**(2):425-32.
15. Genre F, López-Mejías R, Miranda-Filloy JA, Ubilla B, Carnero-López B, Blanco R, et al. Adipokines, Biomarkers of Endothelial Activation, and Metabolic Syndrome in Patients with Ankylosing Spondylitis. *BioMed research international* 2014;**2014**:860651,11p.
16. Lin Q, Xie H, Liu X, Zhou J, Zhao J. [Relationship between obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome and high sensitivity C-reactive protein in non-obese subjects]. *Zhonghua yi xue za zhi* 2013;**93**(30):2355-58.
17. Tehrani DM, Gardin JM, Yanez D, Hirsch CH, Lloyd-Jones DM, Stein PK, et al. Impact of inflammatory biomarkers on relation of high density lipoprotein-cholesterol with incident coronary heart disease: cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* 2013;**231**(2):246-51.
18. Laurent F, Romagna C, Laurent Y, Chaux-Bodard A, Veyre S, Hemar J, et al. [Relationship between coronary artery disease and periodontal disease. What the cardiologist must know]. In: *Annales de cardiologie et d'angiologie*; 2007;**2007**:297-302.
19. Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M, Togari A. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochemical pharmacology* 2001;**61**(5):579-86.

20. Bonnet N, Pierroz D, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008;**8**(2):94-104.
21. Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological Reviews* 2001;**53**(2):319-56.
22. Aitken SJ, Landao-Bassonga E, Ralston SH, Idris AI. β 2-Adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics* 2009;**482**(1):96-103.
23. Rodrigues W, Madeira M, da Silva T, Clemente-Napimoga J, Miguel C, Dias-da-Silva V, et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *British journal of pharmacology* 2012;**165**(7):2140-51.
24. Wang J, Li J, Sheng X, Zhao H, Cao X-D, Wang Y-Q, et al. β -adrenoceptor mediated surgery-induced production of pro-inflammatory cytokines in rat microglia cells. *Journal of neuroimmunology* 2010;**223**(1):77-83.
25. Xu L, Yu W-k, Lin Z-l, Tan S-j, Bai X-w, Ding K, et al. Impact of β -Adrenoceptor Blockade on Systemic Inflammation and Coagulation Disturbances in Rats with Acute Traumatic Coagulopathy. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 2015;**21**:468.
26. Napimoga MH, Benatti BB, Lima FO, Alves PM, Campos AC, Pena-dos-Santos DR, et al. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. *International immunopharmacology* 2009;**9**(2):216-22.
27. Rodrigues WF, Miguel CB, Napimoga MH, Oliveira CJF, Lazo-Chica JE. Establishing Standards for Studying Renal Function in Mice through Measurements of Body Size-Adjusted Creatinine and Urea Levels. *BioMed research international* 2014;**2014**,872827:8p.
28. Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *Journal of periodontology* 1996;**67**(10s):1123-37.
29. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical microbiology reviews* 2003;**16**(3):379-414.
30. Demmer RT, Desvarieux M. Periodontal infections and cardiovascular. *J Am Dent Assoc* 2006;**137**:14S-20S.
31. Watts A, Crimmins EM, Gatz M. Inflammation as a potential mediator for the association between periodontal disease and Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment* 2008;**4**(5):865.
32. Nguyen LP, Omoluabi O, Parra S, Frieske JM, Clement C, Ammar-Aouchiche Z, et al. Chronic exposure to beta-blockers attenuates inflammation and mucin content in a murine asthma model. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008;**38**(3):256-62.
33. Verburg-van Kemenade B, Van der Aa L, Chadzinska M. Neuroendocrine-immune interaction: Regulation of inflammation via G-protein coupled receptors. *General and comparative endocrinology* 2013;**188**:94-101.
34. Lin R, Degan S, Theriot BS, Fischer BM, Strachan RT, Liang J, et al. Chronic treatment in vivo with β -adrenoceptor agonists induces dysfunction of airway β 2-adrenoceptors and exacerbates lung inflammation in mice. *British journal of pharmacology* 2012;**165**(7):2365-77.
35. Wang D, Zhou X, Hong Y. Effects of a combination of ketanserin and propranolol on inflammatory hyperalgesia in rats. *European journal of pharmacology* 2013;**721**(1):126-32.

36. Hirschfield G, Pepys M. C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *Qjm* 2003;**96**(11):793-807.
37. Kanda T, Takahashi T. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Japanese heart journal* 2004;**45**(2):183-93.
38. Cacciapaglia F, Navarini L, Menna P, Salvatorelli E, Minotti G, Afeltra A. Cardiovascular safety of anti-TNF-alpha therapies: facts and unsettled issues. *Autoimmunity reviews* 2011;**10**(10):631-35.
39. Brown CM, Turner ST, Bailey KR, Mosley Jr TH, Kardia SL, Wiste HJ, et al. Hypertension in pregnancy is associated with elevated C-reactive protein levels later in life. *Journal of hypertension* 2013;**31**(11):2213-19.
40. Johnson JD, Zimomra ZR, Stewart LT. Beta-adrenergic receptor activation primes microglia cytokine production. *Journal of neuroimmunology* 2013;**254**(1):161-64.
41. Saffi MAL, Furtado MV, Montenegro MM, Ribeiro IWJ, Kampits C, Rabelo-Silva ER, et al. The effect of periodontal therapy on C-reactive protein, endothelial function, lipids and proinflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2013;**14**(1):283.
42. Léauté-Labrèze C, de la Roque ED, Hubiche T, Boralevi F, Thambo J-B, Taïeb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *New England Journal of Medicine* 2008;**358**(24):2649-51.
43. Rodríguez-Ruiz M, Tellado M, del Pozo Losada J. Combinación de propranolol oral y láser de colorante pulsado en el tratamiento de los hemangiomas infantiles ulcerados. In: *Anales de Pediatría*; 2015: Elsevier; 2015.
44. Vogelpoel H, Welink J, Amidon G, Junginger H, Midha K, Möller H, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: Verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004;**93**(8):1945-56.
45. Stephen SA. Unwanted effects of propranolol. *The American journal of cardiology* 1966;**18**(3):463-72.
46. Van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006;**26**(4):716-28.
47. Annabi B, Lachambre M-P, Plouffe K, Mouldjian R, Béliveau R. Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacological Research* 2009;**60**(5):438-45.
48. Storch C, Hoeger P. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *British journal of dermatology* 2010;**163**(2):269-74.
49. Zhang D, Ma QY, Hu H-T, Zhang M. β 2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NF- κ B and AP-1. *Cancer biology & therapy* 2010;**10**(1):19-29.
50. Thaivalappil S, Bauman N, Saieg A, Movius E, Brown KJ, Preciado D. Propranolol-Mediated Attenuation of MMP-9 Excretion in Infants With Hemangiomas. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 2013;**139**(10):1026-31.

CAPÍTULO 3 AVALIAÇÃO METABOLÔMICA DA DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA NA TERCEIRA IDADE

Wellington Francisco Rodrigues^{1,2#}, Camila Botelho Miguel^{2#}, Gabriela Venturini da Silva^{3#}, Alexandre da Costa Pereira³, Javier Emilio Lazo-Chica², Carlo José Freire de Oliveira², Marcelo Henrique Napimoga⁴, Carlos Ueira-Vieira^{*1}

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil

²Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 38015-050 Uberaba, MG, Brasil

³Instituto do Coração – INCOR, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, SP, Brasil

⁴Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic, Faculdade São Leopoldo Mandic – SLMANDIC, 13045-755 Campinas, SP, Brasil

Contribuíram igualmente para este trabalho.

* Autor correspondente: Carlos Ueira-Vieira

e-mail: ueira@ingeb.ufu.br

1. Resumo

A doença periodontal é uma doença infecciosa relacionada à destruição dos tecidos de suporte, levando a perda funcional dos dentes. Está associada a maiores índices em grupos com maior vulnerabilidade, dentre eles os idosos. A senescência é um estágio da vida que tem se ampliado cada vez mais devido a melhoria da qualidade de vida, no entanto esta fase traz severas modificações biológicas principalmente relacionadas ao sistema imune. Nosso estudo objetivou avaliar possíveis biomarcadores da doença periodontal em idosos. Foram selecionados 20 indivíduos com idade superior a 60 anos e não fumantes. Os mesmos foram separados em grupos: doença periodontal crônica (N=10), e saudáveis (N=10). Amostras do fluido crevicular foram coletadas e avaliadas a partir de espectrometria de massas acoplada à cromatografia e metabólitos foram encontrados em ambas as amostras. Nossos dados possibilitaram identificar 969 metabólitos, correlacionados em indivíduos idosos com e sem doença periodontal, destes identificamos 15 metabólitos com VIP acima de 1, quando se observa a relação entre grupos com e sem doença periodontal. Após avaliações, 2 metabólitos identificados em maiores concentrações (ácido 5-aminovalérico e serina 3TMS) no fluido crevicular poderão predizer a doença periodontal crônica em idosos. Contudo nossos achados permitem concluir que alguns metabólitos são mais presentes no fluido crevicular de indivíduos idosos e estes podem ser utilizados como biomarcadores da doença.

Palavras-chave: Doença periodontal, Metaboloma, Idosos

2. Abstract

Periodontal disease is an infectious disease related to the destruction of the supporting tissues, leading to functional loss of teeth. It is associated with higher rates in the most vulnerable groups, including the elderly. Senescence is a life stage that has been increasingly expanded due to improved quality of life, however this stage brings severe biological modifications mainly related to the immune system. Our study aimed to evaluate potential biomarkers of periodontal disease in the elderly. We selected 20 individuals aged over 60 years and non-smokers. They were divided into groups: chronic periodontal disease (N = 10) and healthy subjects (N = 10). Samples of crevicular fluid were collected and evaluated from mass spectrometry coupled with chromatography and metabolites were found in both samples. Our data allowed us to identify 969 metabolites correlated in elderly subjects with and without periodontal disease, these identified 15 metabolites with VIP above 1, when observing the relationship between groups with and without periodontal disease. After reviews, 2 metabolites identified in higher concentrations in crevicular fluid may predict chronic periodontal disease in the elderly. However, our findings show that some metabolites are present in the crevicular fluid of elderly individuals and these can be used as biomarkers of disease.

Keywords: Periodontal disease, Metabolome Seniors

3. Introdução

A periodontite é uma doença infecciosa que destrói os tecidos que suportam os dentes (tecido periodontal) e afeta de forma significativa a saúde bucal, sendo a causa mais comum da perda de dentes. Além disso, estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram que a periodontite está claramente associada com uma variedade de condições e doenças sistêmicas (Mcbean *et al.*, 2004; Boehm e Scannapieco, 2007; Ostchega *et al.*, 2007; Tutuncu e Kavanaugh, 2007).

A relação da microbiota e o sistema imune são importantes para a manutenção da saúde clínica do periodonto, portanto alguns grupos são fragilizados ao desenvolvimento da doença periodontal crônica, como o idoso (Mcbean *et al.*, 2004).

A senescência apresenta diversos eventos que os predis põem a infecções, condições que aumentam a morbidade e mortalidade (Bôas *et al.*, 2007). Essa alta suscetibilidade apresentada nos idosos está associada à diminuição das funções normais do sistema imunológico. A população de linfócitos T é alterada com o avanço da idade, portanto a eficiência dos monócitos/macrófagos em destruir invasores fica prejudicada (Albright e Albright, 1994; Wu e Meydani, 2008), favorecendo, portanto a instalação da doença no periodonto.

Dado as características heterogêneas, advindas da diversidade de repostas imunes frente à agressão infecciosa, esforços têm sido feitos para eleger marcadores no fluido crevicular que possibilitam a predição da doença periodontal bem como o seu estado (Kuboniwa *et al.*, 2016). Pelas divergências de participação do sistema imune em diferentes faixas etárias, incluindo a senescência, o nosso estudo objetivou prever possíveis marcadores biológicos para diagnóstico da doença periodontal crônica no idoso.

4. Material e Métodos

4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos já foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob número: 017430/2014, assim como devidamente cadastrado na Plataforma Brasil, e seguem a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

4.2. Critérios de inclusão

Neste item foram considerados indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos, não fumantes, com e sem doença periodontal crônica.

4.3. Critérios de exclusão

Indivíduos que não conseguiram realizar pelo menos 3 coletas dos cones e indivíduos edentados.

4.4. Coleta de Material Biológico

Os grupos foram separados em doença periodontal crônica e sem doença periodontal. Os indivíduos doentes foram selecionados após avaliação clínica e apresentar a profundidade de sondagem igual ou maior a 3 mm, além de pelo menos em um local a presença de sangramento marginal. Já para os indivíduos saudáveis foram considerados todos que estiveram fora dos parâmetros citados anteriormente. Os cones foram coletados e levados a microtubos com 500 µL de inibidor de protease. Imediatamente após a coleta o material foi inserido em nitrogênio líquido e mantido em refrigeração a -80°C.

4.5. Metaboloma

O fluido foi mantido em gelo até completo descongelamento. Foram adicionados 100 µL de fluido crevicular a 300µL de tampão de extração de

metabólitos (gelado) contendo Acetonitrila, Isopropanol e água ultra pura (H₂O MilliQ) na proporção 3:3:2. Em seguida o material foi centrifugado a 15800g, a 0°C por 15 minutos para precipitação de proteínas. Posteriormente 350µL do sobrenadante foi passado para um novo tubo e adicionado 5µL de ácido mirístico (Sigma #366889) na concentração de 3 mg/mL utilizado como padrão interno. Os metabólitos foram secos em speedvac por 18 horas e mantido em dessecador a 4°C até o próximo passo. As amostras foram retiradas do dessecador e iniciados os processos de derivações. Primeiramente foi adicionado 3 µL de FAME (Fatty Acid Methyl Ester) que foi utilizado como controle de alinhamento de tempo de retenção durante o processamento das amostras. Em seguida foi adicionado 30µL de uma solução de Metoxiamina (Sigma #226904) 40mg/mL diluído em Piridina (Sigma #270407); o pellet contendo os metabólitos foi homogeneizado e permaneceu em reação por 16 horas à 25°C em agitação à 650rpm. Após a metoxaminação, foram adicionados 90µL de uma solução contendo MSTFA (Sigma #69479) com 1% de TMCS (Sigma #89595) e incubado por 90 minutos à 25°C em agitação à 650rpm. Os metabólitos foram então centrifugados a 15800g por 5 minutos à temperatura ambiente e 100µL do sobrenadante foi transferido para um vial âmbar de 2mL contendo um insert inerte. As amostras foram analisadas em até 24 horas após derivação.

4.5.1. Análises do Metaboloma

As análises foram realizadas em triplicata em um equipamento GC/MS Agilent (7890B GC; 5977A MS). 1µL do derivado foi injetado no sistema GC Agilent 7890B operando no modo splitless. Uma coluna DB5-MS + 10m Duragard capillary (Agilent 122-5532G) por onde o gás hélio flui em uma pressão de 1,1mL min⁻¹ foi utilizada para a separação dos metabólitos. A temperatura do injetor foi setada em 250°C e a temperatura da coluna em 60°C durante 1 min e então elevada à 310°C em um fluxo de 10°C/min. O efluente da coluna foi automaticamente inserido no MS (Agilent 5977A). O detector operando no modo de ionização por impacto de elétrons (70eV) e o espectro de massa foi registrado após solvent delay de 6,5min. A temperatura do MS quadrupolo foi setada em 180°C e a fonte de íons em 280°C.

4.6. Controle de Qualidade

Realizou-se o Controle de Qualidade Interno para todas as análises, onde os parâmetros necessários foram seguidos: definição clara dos objetivos, procedimentos, normas e critérios para os limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades, bem como o uso de controles para avaliar a imprecisão analítica (Rodrigues *et al.*, 2014).

4.7. Análise estatística

As filtragens iniciais foram realizadas em programa Excel. As normalizações e análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Foram realizadas as análises de *Fold Change* e test T. Para avaliações multivariadas foi realizada a análise de componentes PLS-DA para discriminar os dois grupos. PLS é um método supervisionado que utiliza técnicas de regressão multivariada para extrair via combinação linear de variáveis originais (X) as informações que podem prever a classe de um membro (Y). Para avaliar a significância da discriminação de classe, foi realizado um teste de permutação. Em cada permutação, um modelo PLS-DA foi construído entre os dados (X) e as classe permutadas (Y) usando o número ideal de componentes determinados pela validação cruzada para o modelo baseado na classe original.

5. Resultados

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão foram selecionados 20 indivíduos (N = 10 com doença periodontal crônica e N = 10 sem doença), com idade média de 70 anos, não fumantes. No total foram identificados 969 metabólitos. Foram considerados para análises estatísticas aqueles que foram identificados em pelo menos 2 das 3 replicatas técnicas e que estavam em pelo menos 50% de um dos grupos (Saudável ou Periodontite), totalizando em 64

metabólitos. As intensidades dos metabólitos foram normalizadas por auto-escalamento como mostrado na Figura 1.

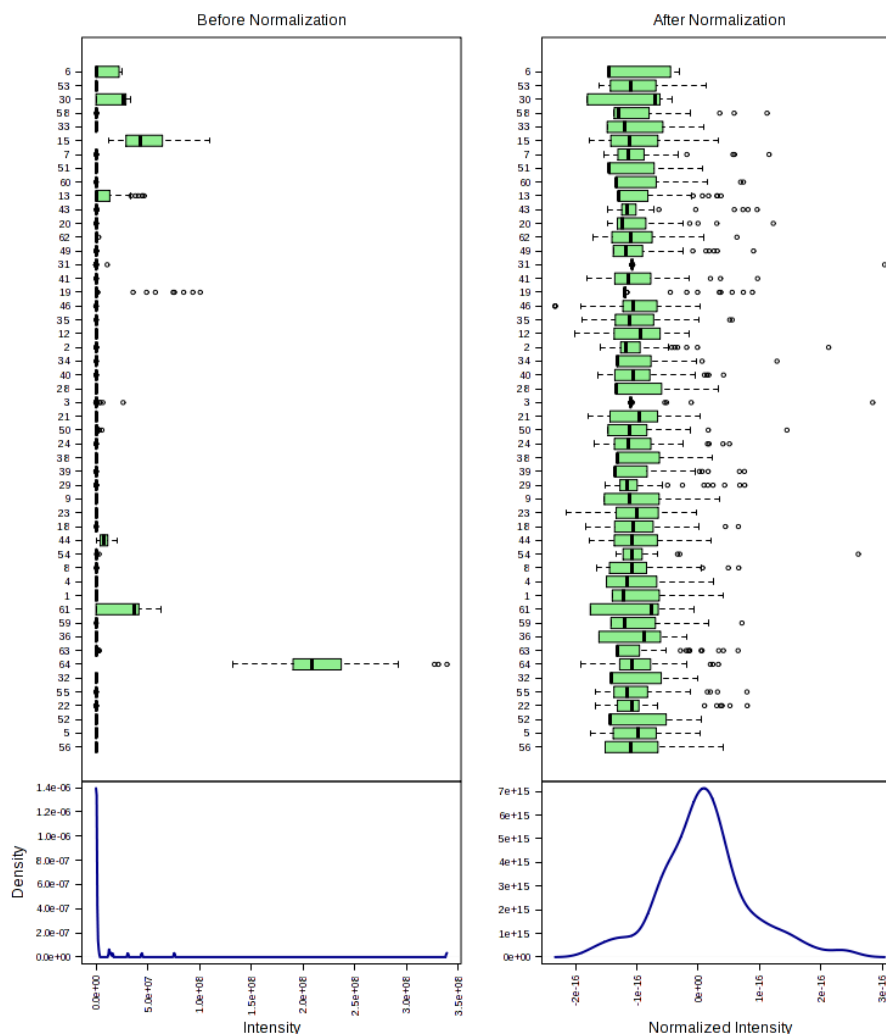


Figura 1 - Resultado da normalização por auto-escalamento. Box plots e plots de densidade de kernel antes e depois da normalização por auto-escalamento. Os boxes mostram os 50 principais metabólitos devido o limite de espaço. A densidade dos plots são baseadas em todas as amostras.

A análise de *Fold* foi baseada na razão da média das intensidades dos metabólitos do grupo Periodontite pelo grupo Saudável. Foram considerados aqueles que tiveram intensidade pelo menos duas vezes maior em um dos grupos em relação ao outro. Foram identificados 9 metabólitos com FC maior que 2, sendo 5 maiores no grupo Periodontite e 4 maiores no grupo Saudável. Para fins ilustrativos, os dados foram logaritimizados (Figura 2).

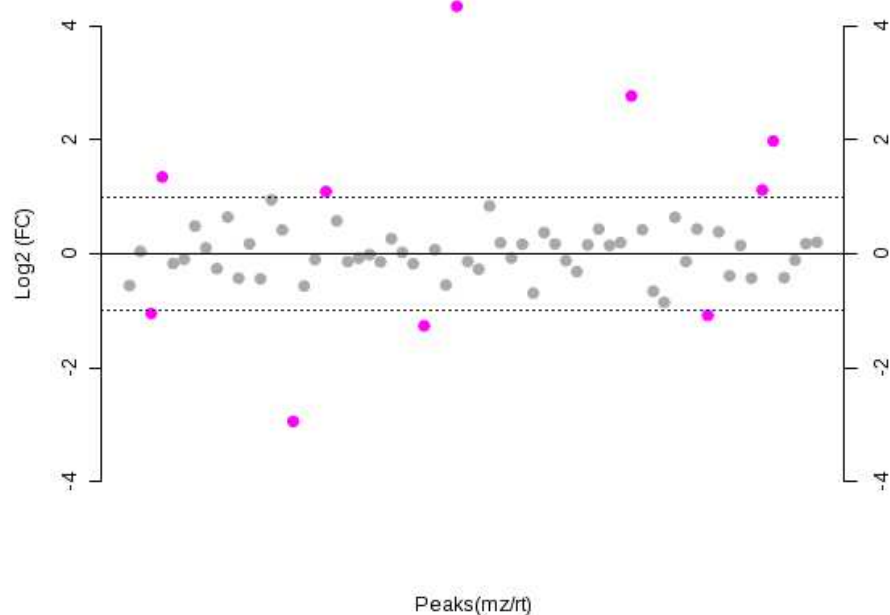


Figura 2. Resultado do *Fold Change*. Em rosa os metabólitos com intensidade pelo menos duas vezes maior no grupo Periodontite (acima) em relação ao grupo Saudável (abaixo).

Tabela 1: Metabólitos com *Fold Change* acima de 2 em um dos grupos, resultado da razão entre o grupo Periodontite e Saudável.

Metabólito	Fold Change	log2(FC)	HMDB ID
2,3-Dihydroxypropyl icosanoate	20,2250	43.381	HMDB11572
Glycerol	6,7943	27.643	HMDB00131
Serine	3,9278	19.737	HMDB00187
5-aminovaleric acid	2,5388	13.442	HMDB03355
Putrescine	2,1664	11.153	HMDB01414
Lactulose	0,4830	-10.499	HMDB00740
Oxalic acid	0,4721	-10.828	HMDB02329
1-Benzoyl-2-t-butyl-5-ethyl-3-methyl-5-vinyl-imidazolidin-4-one	0,4159	-12.655	
Maltose	0,1300	-29.432	HMDB00163

Além da análise de FC, foi realizada a análise de Teste T. Foram identificados 10 metabólitos diferentes entre os dois grupos (Figura 3 e Tabela 2).

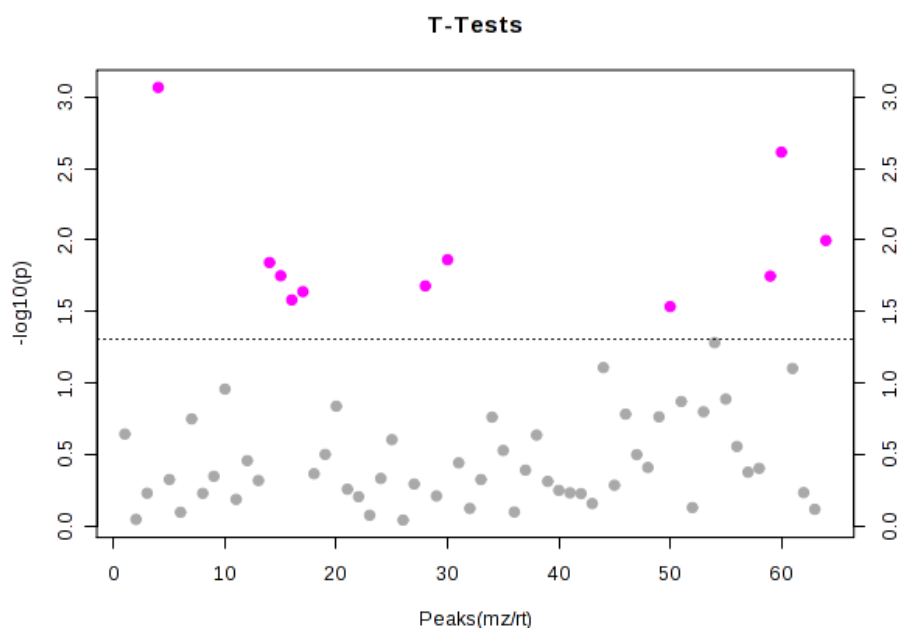


Figura 3. Resultado do Teste T. Em rosa os metabólitos estatisticamente diferentes (p valor <0,05).

Tabela 2: Metabólitos estatisticamente diferentes (p valor <0,05) de acordo com o teste T.

ID	Metabólito	p value	HMDB
4	5-aminovaleric acid	0.00085959	HMDB03355
60	Serine	0.0024367	HMDB00187
30	1-Monopalmitin	0.013765	HMDB31074
14	Aspartic acid	0.014401	HMDB00191
15	D-mannitol	0.017827	HMDB00765
59	Putrescine	0.017922	HMDB01414
28	1-Benzoyl-2-t-butyl-5-ethyl-3-methyl-5-vinyl-imidazolidin-4-one	0.020991	
17	Palmitoleate	0.023021	HMDB03229
16	Maltose	0.026306	HMDB00163
50	Lactic Acid	0.029267	HMDB00190

De acordo com a análise de PLS-DA foi possível separar os dois grupos baseado no perfil metabólico (Figura 4) baseado em duas componentes principais; e essa separação não foi ao acaso, segundo os dados de validação cruzada (Figura 5).

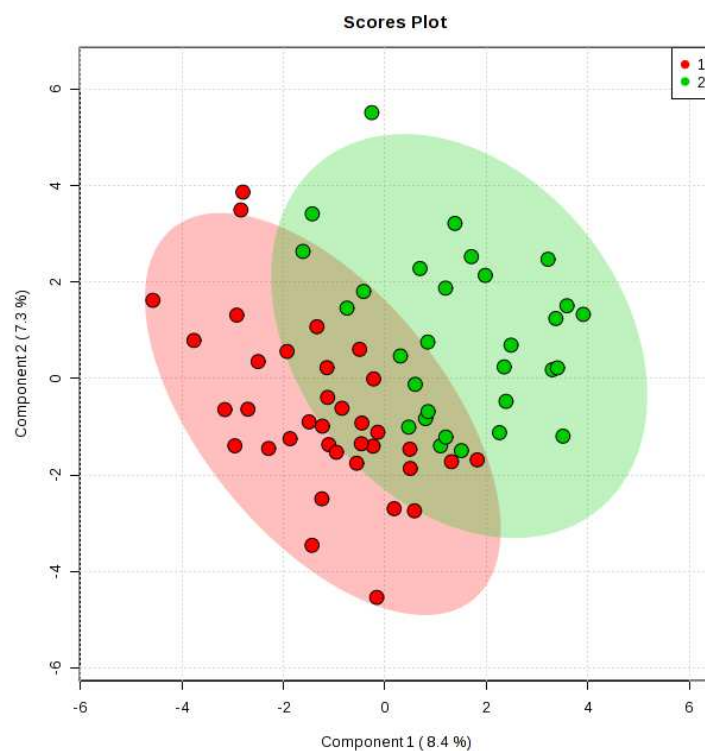


Figura 4. Separação dos grupos Periodontite (1 – vermelho) e Saudável (2 – verde) de acordo com o perfil de metabólitos.

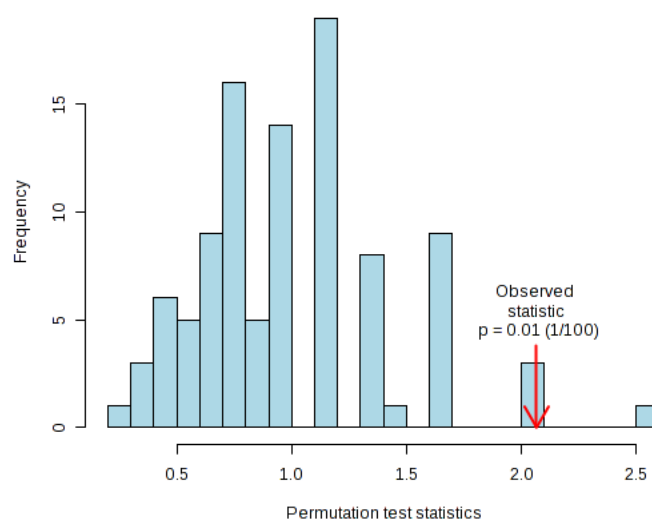


Figura 5. Teste de Permutação mostrando que a separação não foi ao acaso (p valor <0,05).

O índice VIP ordena os metabólitos de acordo com a ordem e importância para separação dos grupos (Figura 6 e Tabela 3).

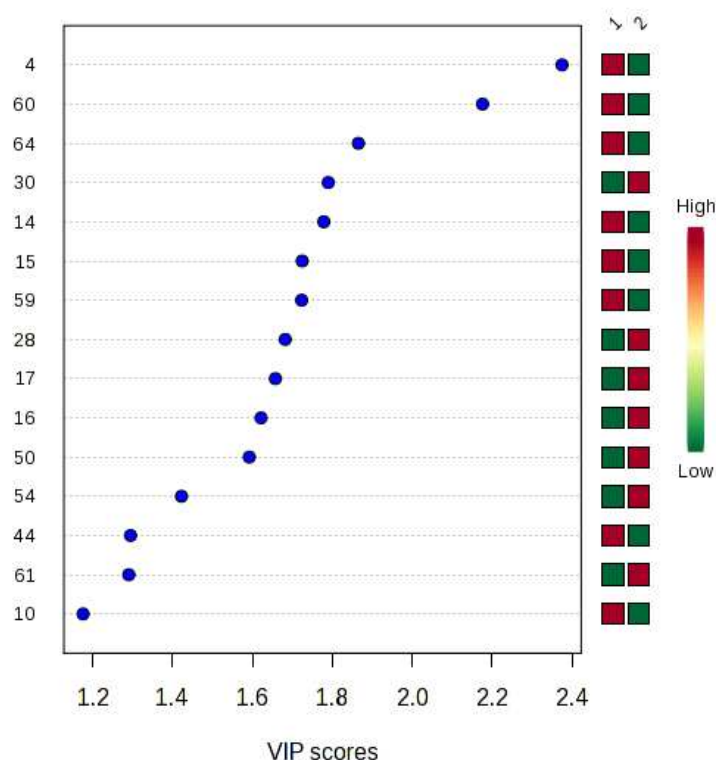


Figura 6. Metabólitos ordenados de acordo com a ordem e importância para separação dos grupos pela análise de PLS-DA. Grupo Periodontite é representado pelo 1 e o Grupo Saudável pelo 2. A concentração dos metabólitos é representada pelo gradiente de cor entre verde (menos concentrado) e vermelho (mais concentrado). A esquerda da tabela estão os IDs dos metabólitos, identificados na tabela 3, abaixo.

Tabela 3. Metabólitos importantes para separação dos grupos de acordo com a análise de PLS-DA e seus valores de VIP.

ID	Metabólito	VIP Score
4	Ácido 5-aminovalérico	2,3753
60	Serina 3TMS	2,1762
64	*Contaminante	1,8653
30	1-Monopalmitina	1,7900
14	Ácido aspartico	1,7788
15	D-manitol	1,7247
59	Putrescina	1,7233
28	1-Benzoil-2-t-butil-5-etil-3-metil-5-vinil-imidazolidina-4-one	1,6821
17	Palmitoleato	1,6576
16	Maltose	1,6215
50	Ácido láctico	1,5922
54	Ácido oxálico	1,4224
44	Ácido etético	1,2949
61	Contaminante	1,2905
10	D-glicose-6-fosfato	1,1759

6. Discussão

A doença periodontal é uma doença infecciosa e relacionada à destruição dos tecidos de suporte, levando à perda funcional dos dentes, estando associada em maiores índices a grupos com maior vulnerabilidade, como os idosos. A senescência é um estágio da vida que tem se ampliado cada vez mais, pela melhoria da qualidade de vida, no entanto esta fase traz severas modificações biológicas, tais como modificações do sistema imune. Nosso estudo, possibilitou identificar 969 metabólitos, correlacionados em indivíduos idosos com e sem doença periodontal, destes identificamos 15 metabólitos com VIP acima de 1, quando se observa a relação entre grupos com doença periodontal e sem doença periodontal. Após avaliações 2 metabólitos identificados (ácido 5-aminovalérico e serina 3TMS), em maiores concentrações no fluido crevicular poderão prever a doença periodontal crônica em idosos.

A utilização da espectrometria de massas associada à cromatografia já foi identificada como uma técnica promissora para prognosticar a doença periodontal em diferentes estágios de progressão (Ozeki *et al.*, 2016). Da mesma forma nosso estudo corrobora em este dado, levando em consideração a alta sensibilidade para identificação e quantificação dos metabolitos avaliados.

Nossa abordagem foi a primeira em que avaliou possíveis moléculas que poderão ser associadas com a predição da doença periodontal no idoso. Em outras avaliações foram identificados diferentes tipos de metabólitos vinculados ao desenvolvimento da doença periodontal crônica, tais como: Ornitina (VIP = 2,57), 5-oxoprolina (VIP = 1,99), Valina (VIP = 1,99), Prolina (1,35), cadaverina, histidina (Kuboniwa *et al.*, 2016). Diferentemente, nossa avaliação apontou que em amostras de pacientes com doença periodontal crônica idosos, sobressaem os seguintes metabolitos: ácido 5-aminovalérico (VIP = 2,37), Serina (VIP = 2,18), 1-monopalmitino, ácido aspártico, D-manitol, putrescine, 1-Benzoyl-2-t-butyl-5-ethyl-3-methyl-5-vinyl-imidazolidin-4-one, Palmitoleato, Maltose, ácido láctico, ácido oxálico, ácido edético, contaminantes e D-glucose-6-phosphate, entre estes os dois primeiros se destacam. Outro estudo já observou o aumento de ácido aminovalérico relacionado à periodontite, além do ácido láctico, alguns açúcares e um componente associado com deterioração tecidual, a putrescina (Ozeki *et al.*,

2016). Acreditamos que as diferenças observadas estão atreladas a distintas características observadas na do desenvolvimento da doença periodontal crônica, bem como na própria resposta do hospedeiro frente a agressores.

Contudo nossos achados permitem concluir que alguns metabólitos são mais presentes no fluido crevicular de indivíduos idosos, e estes podem ser utilizados como biomarcadores da doença.

7. Referências Bibliográficas

1. McBean AM, Li S, Gilbertson DT, Collins AJ. Differences in diabetes prevalence, incidence, and mortality among the elderly of four racial/ethnic groups: whites, blacks, Hispanics, and Asians. *Diabetes care*. 2004;27(10):2317-24.
2. Ostchega Y, Dillon CF, Hughes JP, Carroll M, Yoon S. Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control in older US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1988 to 2004. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2007;55(7):1056-65.
3. Tutuncu Z, Kavanaugh A. Rheumatic disease in the elderly: rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2007;33(1):57-70.
4. Boehm TK, Scannapieco FA. The epidemiology, consequences and management of periodontal disease in older adults. *The Journal of the American Dental Association*. 2007;138:S26-S33.
5. BÔAS PJFV, LÚCIA A, FERREIRA A. Infecção em idosos internados em instituição de longa permanência. *Cep*. 2007;18600:005.
6. Wu D, Meydani SN. Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. *Journal of leukocyte biology*. 2008;84(4):900-14.
7. Albright JW, Albright JF. Ageing alters the competence of the immune system to control parasitic infection. *Immunology letters*. 1994;40(3):279-85.
8. Kuboniwa M, Sakanaka A, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. *Journal of Dental Research*. 2016:0022034516661142.
9. Rodrigues WF, Miguel CB, Napimoga MH, Oliveira CJF, Lazo-Chica JE. Establishing Standards for Studying Renal Function in Mice through Measurements of Body Size-Adjusted Creatinine and Urea Levels. *BioMed research international*. 2014;2014.
10. Ozeki M, Nozaki T, Aoki J, Bamba T, Jensen KR, Murakami S, et al. Metabolomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry*. 2016;5(1):A0047-A.

CAPÍTULO 4 ESTUDO RETROSPECTIVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E PROTEÍNA PRÓ-INFLAMATÓRIA NA SENESCÊNCIA

Wellington Francisco Rodrigues^{1,3,4**}, Camila Botelho Miguel^{2*}, Niege Silva Mendes², Viviane Oliveira Severino², Márcia Fernandes de Araújo², Stella Borges da Silva², Carlos Ueira-Vieira¹.

¹Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia/MG, Brasil.

²Universidade de São Paulo – USP. Ribeirão Preto/SP, Brasil

³Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM. Uberaba/MG, Brasil.

⁴Faculdade Morgana Potrich - FAMP - Mineiros, GO, Brasil.

* Contribuíram igualmente para este trabalho.

Autor correspondente: Wellington Francisco Rodrigues

e-mail: wellington.frodrigues@hotmail.com

1. Resumo

O desequilíbrio entre a microbiota da cavidade oral e o sistema imune resulta na possibilidade do desenvolvimento de doenças periodontais. A senescência é acompanhada de diversos mecanismos que possibilitam no desequilíbrio do sistema imune na cavidade oral. Além disso, a doença periodontal tem sido associada a ser um fator de risco para desenvolvimento de doenças crônicas, algo frequente em idosos. Assim, relacionar e/ou compreender mecanismos e as principais moléculas possibilitam não somente a compreensão da fisiopatogeneze da doença, mas também um direcionamento a novos alvos terapêuticos. Dado a importância em se abordar a temática nesta população visando a uma melhor compreensão da interação molecular da doença periodontal crônica no idoso, o presente estudo objetivou relatar estudos que abordam proteínas relacionadas ao desenvolvimento da doença, bem como possibilitar indicar uma possível via terapêutica. Realizamos uma abordagem retrospectiva a partir de uma revisão sistemática. Utilizamos 3 distintas buscas em base de dados, com descritores associados (proteína pró-inflamatória, doença periodontal, idoso e IL-33). Para as buscas utilizamos o banco de dados do Norte-Americano, Pubmed. Os dados permitiram apontar para necessidade de novas abordagens relacionadas à moléculas vinculadas à doença periodontal crônica no idosos. Além disso, sugere a participação efetiva da IL-33 na patogênese da doença periodontal crônica, dependente de fatores genéticos, ambientais e tipo de agente relacionado. Assim é possível apontar o eixo associado com a participação da IL-33 na doença periodontal como possível alvo terapêutico.

Palavras-chave: Doença Periodontal, Idosos, IL-33

2. Abstract

The imbalance between the microbiota of the oral cavity and the immune system results in the possibility of developing periodontal diseases. Senescence is accompanied by several mechanisms that allow the immune system imbalance in the oral cavity. Furthermore, periodontal disease has been linked to being a risk factor for development of chronic diseases, something common in the elderly. Thus, relate to and / or comprise the major mechanisms and molecules not only enable fisiopatogenege understanding of the disease, but also a direction to novel therapeutic targets. Given the importance of addressing the issue in this population with a view to a better understanding of the molecular interaction of chronic periodontal disease in the elderly, this study aimed to report studies that address proteins related to disease development, as well as possible to indicate a possible therapeutic route. We conducted a retrospective approach from a systematic review. We used three different searches in the database with associated descriptors (pro-inflammatory protein, periodontal disease, elderly and IL-33). For searches use the North American database, Pubmed. The data allowed to point to the need for new approaches related molecules linked to chronic periodontal disease in the elderly. It also suggests the effective participation of IL-33 in the pathogenesis of chronic periodontal disease, dependent on genetic factors, environmental and related type of agent. So you can point the axis associated with the participation of IL-33 in periodontal disease as a possible therapeutic target.

Keywords: Periodontal Disease, Elderly, IL-33

3. Introdução

A senescência celular associada ao tempo, trás ao individuo uma série de vulnerabilidades que até então não havia passado, onde está associada ao desenvolvimento e índices maiores com doenças crônicas, tais como: diabetes, hipertensão arterial, artrite reumatoide e doença periodontal (Mcbean *et al.*, 2004; Boehm e Scannapieco, 2007; Ostchega *et al.*, 2007; Tutuncu e Kavanaugh, 2007). O idoso é associado a uma menor saúde do periodonto, bem como uma maior prevalência de doenças periodontais e gravidade. A condição de doença periodontal afeta em sua maioria a população adulta, com uma estimativa de 10 a 15% do desenvolvimento de periodontite severa (Velden, 1991; Pihlstrom *et al.*, 2005). As doenças periodontais incluem diversas alterações dos tecidos de proteção e sustentação dos órgãos dentais, cuja etiologia está relacionada à placa dental bacteriana (Loesche, 1993; Franceschi *et al.*, 2000).

A interação entre o sistema imune e os agentes bacterianos, está relacionado ao fator que irá determinar o estado de doença ou a manutenção do tecido saudável, onde na velhice há uma nítida alteração entre os padrões da resposta imune inata e adaptativa, das quais podem favorecer ao desenvolvimento e manifestações de doenças, incluindo a doença periodontal (Ebersole *et al.*, 2016). De forma geral os fatores bacterianos induzem uma reação inflamatória local, da qual é capaz de ativar o sistema de imunidade inata, através da ativação dos receptores do tipo Toll (TLR), localizadas na superfície de células residentes e leucócitos. A ativação destas células resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de fagócitos e linfócitos para a zona de inflamação (Gankovskaya *et al.*, 2015).

Além disso, mediadores das resposta Th1 e Th2 estão presentes no tecido periodontal, e o balanço dessa resposta imune adaptativa mista poderia estar relacionado ao grau de severidade da doença (Gemmell e Seymour, 2004). A doença crônica é relacionada com ativação de diversas proteínas que participam de mecanismos sinalizadores e permitem um processo de reabsorção óssea, com perda de matriz e suporte, somado a isto, o processo inflamatório e as proteínas liberadas, estão relacionados com desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e diabetes (Accarini e Godoy, 2006; Alves *et*

al., 2007; Cochran, 2008). Dado a importância em se abordar a temática, nesta população, visando a uma melhor compreensão da interação molecular da doença periodontal crônica no idoso, o presente estudo objetivou relatar estudos que abordam proteínas relacionadas ao desenvolvimento da doença, bem como possibilitar indicar uma possível via terapêutica.

4. Métodos

4.1. Tipo de Estudo

Abordagem retrospectiva a partir de uma revisão sistemática com metanálise. Para a condução da seleção, avaliação, exposição e conclusões dos dados foram conduzidas em concordância com o *Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses-PRISMA* (Moher *et al.*, 2009).

4.2. Extração dos Dados e Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram utilizadas 3 distintas buscas em base de dados, com descritores associados. Primeira: “proinflammatory”, “protein”, “periodontal”, “disease” e “elderly”. Segunda: “IL-33”, “periodontal”, “disease” e “elderly”. Terceira: “IL-33”, “periodontal” e “disease”. Para as buscas utilizamos o banco de dados do Norte-Americano Pubmed, onde para os primeiros e terceiros descritores a busca se compreendeu no período dos últimos cinco anos. A abordagem compreendeu desde autores, objetivos, tipo de modelo e as conclusões dos artigos selecionados. Para os estudos de revisões e/ou que não apresentaram correlações com os descritores não foram considerados para este estudo. Da mesma forma, para os descritores 3, não foram consideradas obras que associaram a doença periodontal com outras doenças.

4.3. Análise Estatística

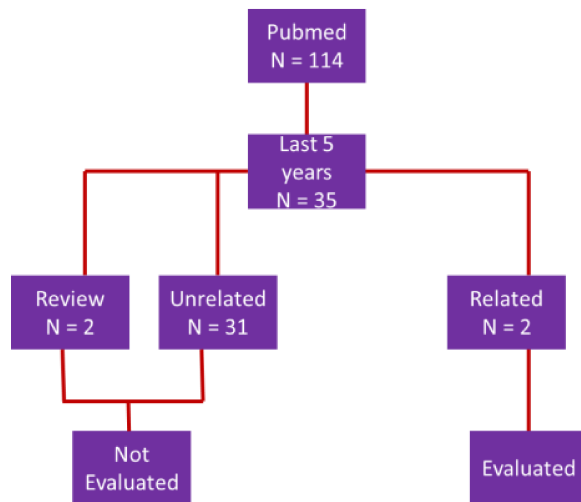
A análise estatística foi realizada através do programa graphpad prism (Graphpad Software. San Diego, CA). Os dados foram relatados de forma

descritiva em porcentagem. Análise univariada não-paramétrica (teste de Kruskalwallis) foi utilizada para grupos independentes e com distribuição não gaussiana. A associação de dados foi realizada através de regressão linear, e para correlação teste de Spearman. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

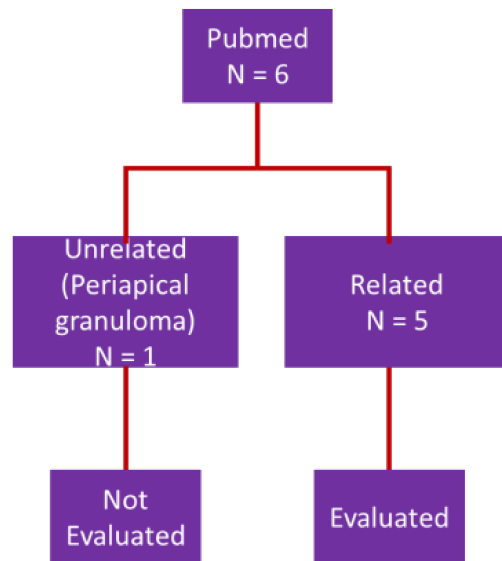
5. Resultados

As interações moleculares orquestram o desencadeamento da doença periodontal crônica, incluindo em indivíduos idosos. Assim, inicialmente avaliamos as obras relacionadas com atividades de proteínas pró-inflamatórias na doença periodontal em idosos. Curiosamente das 35 obras nos últimos 5 anos apenas 2 associaram tipos de proteínas pró-inflamatórias da doença periodontal no idoso (Fluxograma 1A). Após descrições relacionadas com sinalizações moleculares por proteínas inflamatórias verificamos um maior destaque a família IL-1, e em evidencia a Interleucina-33. Assim utilizamos nova busca, de forma mais direcionada à doença periodontal no idoso (IL-33, periodontal disease, elderly), onde encontramos 5 trabalhos relacionando estudos em humanos, doença periodontal e IL-33, dos quais foram relatados (Fluxograma 1B). Na escassez de obras associando diretamente os idosos, nosso estudo realizou levantamento mais amplo, com os descritores: IL-33, periodontal disease, desta forma evidenciamos 14 trabalhos nos últimos 5 anos; destes obtivemos 5 obras que foram relacionadas (Fluxograma 1C).

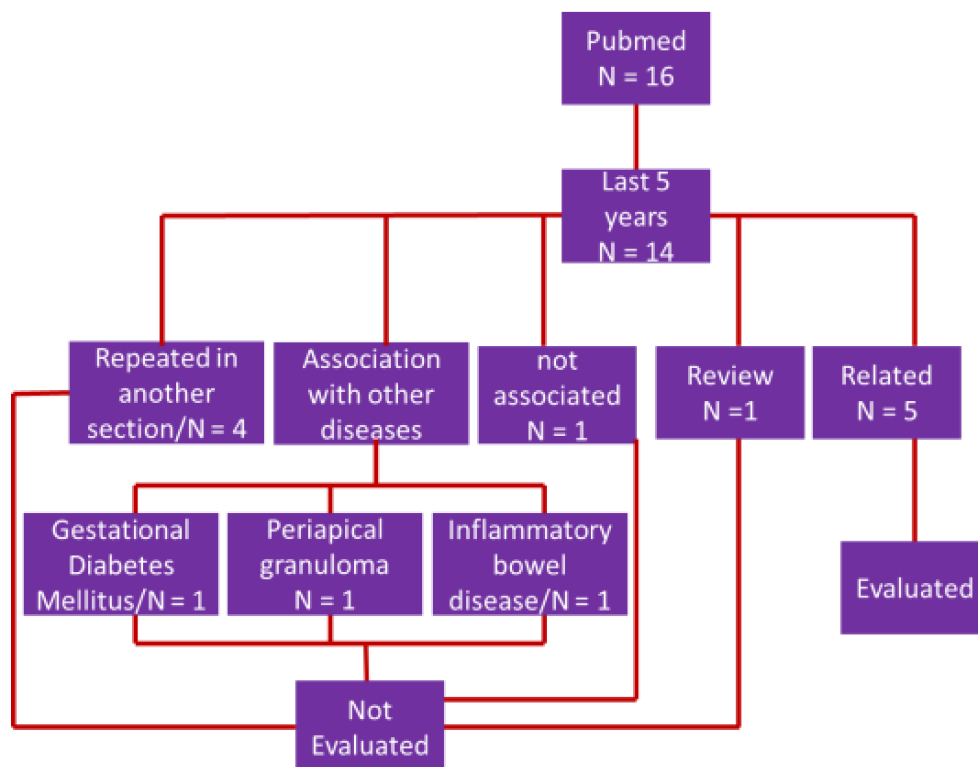
A



B



C



Fluxograma 1. Seleção dos artigos conforme os critérios de inclusão e exclusão. Em A, descritores: proinflammatory, protein, periodontal e disease elderly. Em B, descritores: IL-33, periodontal disease, elderly. Em C, descritores: IL-33 periodontal disease.

Após uma primeira avaliação, com os descritores: “proinflammatory”, “protein”, “periodontal”, “disease” e “elderly”, evidenciamos 2 obras, 1 de 2014 e outra de 2016. Ainda assim, 50% em estudo em humanos. A primeira abordagem embora seja uma avaliação *in vitro*, se utilizou uma comparação entre fibroblastos

jovens e senescentes humanos, demonstrando uma diferença entre eles quando se aumenta o processo de infecção, verificando um aumento da expressão de Caveolin-1, do qual o estudo relata que isto pode ser determinante na resposta do hospedeiro contra um microrganismo em específico, o *Fusobacterium nucleatum*. Já no segundo estudo, reporta a emissão de microondas influenciando a expressão de Ki67, favorecendo a diminuição de p53 e TNF- α no epitélio bucal de pessoas jovens, meia idade e idosos com Periodontitis crônica (Quadro 1).

Quadro 1. Relação entre proteínas pró-inflamatórias, doença periodontal e idoso, em banco de dados Norte-americano nos últimos 5 anos.

AUTOR	OBJETIVOS	TIPO DE MODELO	CONCLUSÃO
Ahn <i>et al.</i> , 2016 (Ahn <i>et al.</i> , 2016).	Investigar os mecanismos de infecção por <i>Fusobacterium nucleatum</i> em fibroblastos gengivais.	Infeção de fibroblastos gengivais jovens e senescentes humanos <i>in vitro</i> .	Aumento de infecção em fibroblastos senescentes. Aumento da expressão de Caveolin-1 pode ser crítico na resposta do hospedeiro contra a infecção por <i>F. nucleatum</i> .
Ianova <i>et al.</i> , 2014 (Ianova <i>et al.</i> , 2013).	Avaliar a influência de microondas por radiofrequência e infravermelha em marcadores moleculares de renovação celular (Ki67, p53) e na expressão de citocinas pró-inflamatórias.	Indivíduos (humanos) com <i>Parodontitis</i> crônica.	A emissão de microondas por radiofrequência e infravermelha aumenta a expressão de Ki67, e diminui p53, e TNF- α no epitélio bucal de pessoas jovens, meia idade e idosos com parodontitis crônica.

Na busca da relação de proteínas pró-inflamatórias, doença periodontal e idosos, encontramos um número baixo de obras das quais possibilitavam a relação desta temática. Após revisão, verificamos que algumas citocinas da família IL-1, estão associadas ao desenvolvimento da doença periodontal crônica, incluindo a IL-3. Assim, verificamos a associação da IL-33, doença periodontal e idosos (Quadro 2). Aqui já encontramos 5 obras, distribuídas em 3 anos, 2 em 2012, 2 em 2014 e 1 em 2015. Em 2012, a tentativa foi a busca por diagnóstico diferencial, entre indivíduos saudáveis e com doença periodontal crônica através da quantificação de IL-33, na ocasião os autores demonstraram que não foi possível essa diferenciação somente através das discrepâncias entre estas quantificações. Ainda em 2012, foi verificada a associação entre a colonização de patógenos

periodontais e o genoma do hospedeiro, os autores não evidenciaram diferenças significativas para esta associação. No entanto de forma curiosa, 13 loci apresentaram evidências sugestivas de associação, entre eles IL33. Posteriormente foram verificadas algumas proteínas inflamatórias no fluido crevicular em diferentes estágios da doença e características clínicas, onde foi verificado que apenas o IFN- γ depende de características clínicas. Ainda em 2014, outro estudo relaciona o aumento de IL-6 e IL-33 com a síndrome da apneia obstrutiva do sono, indicando que pode haver uma relação com a doença periodontal. Já em 2015, interessante estudo avaliou os níveis de citocinas da família IL-1 no fluído crevicular de pacientes com diferentes doenças periodontais, verificando níveis elevados de IL-36 β na periodontite agressiva (Quadro 2).

Quadro 2. Relação entre IL-33, doença periodontal e idosos, em banco de dados Norte-americano.

AUTOR	OBJETIVOS	TIPO DE MODELO	CONCLUSÃO
Kurşunlu <i>et al.</i> , 2015 (Kurşunlu <i>et al.</i> , 2015).	Avaliar os níveis de IL-36 β , IL-36 γ e IL-33 no fluído crevicular de pacientes com diferentes doenças periodontais.	Indivíduos (humanos) com periodontite agressiva generalizada, periodontite crônica, gengivite e saudáveis.	Níveis elevados de IL-36 β na periodontite agressiva sugere que a mesma pode estar relacionada com o aumento em IL-36 β no fluido crevicular.
Nizam <i>et al.</i> , 2014 (Nizam <i>et al.</i> , 2014).	Avaliar as concentrações das interleucinas salivares 1 β , 6, 21, 33, e a PTX3 em pacientes com e sem Síndrome da apneia obstrutiva do sono.	Indivíduos (humanos) com e sem síndrome da apneia obstrutiva do sono (moderado e severo).	Sugere que a síndrome da apneia obstrutiva do sono (moderado e/ou severo) pode aumentar as interleucinas IL-6 e IL-33, havendo a necessidade de investigações para verificar a relação da síndrome com doença periodontal.
Papathanasiou <i>et al.</i> , 2014 (Papathanasiou <i>et al.</i> , 2014).	Avaliar se há variações de concentrações de IFN- γ e IL-4, IL-33 e a Linfopoetina, no fluido crevicular em diferentes estágios e características clínicas da doença periodontal.	Indivíduos (humanos), saudáveis, com gengivite induzida por placas bacterianas, e periodontite crônica.	Sugere que o aumento de IFN- γ no fluido crevicular depende do estágio clínico.
Divaris <i>et al.</i> , 2012 (Divaris <i>et al.</i>	Verificar se há associação da	Indivíduos brancos (humanos) com risco de	Não foram detectados sinais significativos de

<i>al.</i> , 2012).	colonização de patógenos periodontais e do genoma do hospedeiro.	aterosclerose cujo diagnóstico de doença periodontal variou de saudável para doença periodontal crônica grave.	associação em todo genoma, no entanto 13 loci apresentaram evidências sugestivas de associação, entre eles IL33.
Buduneli <i>et al.</i> , 2012 (Buduneli <i>et al.</i> , 2012).	Investigar se os níveis de IL-33 na saliva, fluido crevicular ou plasmáticos podem diferenciar indivíduos com doença periodontal crônica de saudáveis.	Indivíduos (humanos) não fumantes com periodontite crônica e saudáveis.	Os níveis de IL-33 não podem diferenciar indivíduos com periodontite crônica de indivíduos saudáveis.

Após verificar uma interessante relação entre um dos membros da família IL-1, a IL-33 e doença periodontal (porém sem muitas descrições diretamente entre doença periodontal e idoso), verificamos desta forma a relação entre IL-33 e doença periodontal, sem relações com outras doenças (Quadro 3). Verificamos ainda, 5 estudos, destes 60% publicados em 2016, 20% em 2015 e 20% em 2014. Demonstrando assim uma ascensão e/ou tendência da importância em se abordar de forma associativa a doença periodontal crônica e IL-33. Em 2014, o aumento de IL-33 na doença periodontal foi associado pela indução de TNF- α , visando o estímulo de Th2, e respostas protetoras, anti-inflamatórias e de reparo. Em 2015, o aumento de IL-33, juntamente com RANKL foi relacionado com a patogênese da doença periodontal. Em 2016, foi verificado o papel da IL-33 na periodontite e observaram a elevação em pacientes com doença periodontal, e ainda que a administração de IL-33 foi capaz de promover a reabsorção óssea, podendo ser potencializada com a associação de *Porphyromonas gingivalis*, dependente de RANKL. Em continuidade, em 2016 foi determinado o papel da *P. gingivais* na indução da expressão de IL-33 na doença periodontal, onde foi correlacionada de uma forma positiva, a presença desta bactéria com o aumento citoplasmático de IL-33. Por fim, as concentrações de IL-33 foram verificadas de forma comparativa no fluido crevicular, saliva e plasma de pacientes com periodontite crônica e saudáveis, onde na ocasião os autores reportaram um possível papel do aumento de IL-33 na patogênese da doença periodontal (Quadro 3).

Quadro 3. Relação entre IL-33 e doença periodontal, em banco de dados Norte-americano.

AUTOR	OBJETIVOS	TIPO DE MODELO	CONCLUSÃO
Sağlam <i>et al.</i> , 2016 (Sağlam <i>et al.</i> , 2016).	Investigar comparativamente a concentração de IL-33 no fluido crevicular, saliva e plasma de pacientes com doença periodontal crônica e saudáveis.	Indivíduos não fumantes (humanos) com periodontite crônica, gengivite e saudáveis.	IL-33 pode ter um papel na patogênese da doença periodontal.
Tada <i>et al.</i> , 2016 (Tada <i>et al.</i> , 2016).	Determinar qual o papel do <i>Porphyromonas gingivalis</i> na indução do aumento da expressão de IL-33, na doença periodontal.	Tecidos gengivais extraídos de indivíduos com e sem periodontite crônica.	<i>P. gingivalis</i> aumenta a expressão de IL-33 no citoplasma em células epiteliais gengivais humanos <i>in vitro</i> .
Malcolm, <i>et al.</i> , 2016 (Malcolm <i>et al.</i> , 2015).	Verificar o papel da IL-33 na periodontite.	Tecidos de indivíduos (humanos) com periodontite crônica e saudáveis. Modelo experimental murino de periodontites (camundongos).	Expressão de IL-33 estava elevada em pacientes com doença periodontal. A administração de IL-33 induziu reabsorção óssea, da qual foi potencializada quando associada com infecção por <i>Porphyromonas gingivalis</i> , dependente de RANKL.
Köseoğlu <i>et al.</i> , 2015 (Köseoğlu <i>et al.</i> , 2015).	Investigar a expressão de IL-33 e sua associação com RANKL e osteoprotegerina (OPG) na saúde periodontal e periodontite experimental.	Ratos wistar – doença periodontal induzida por ligadura.	Aumento de IL-33 e RankL. A IL-33 pode estar associada com a patogênese da doença periodontal.
Beklen e Tsous, 2014 (Beklen e Tsous Memet, 2014).	Investigar a expressão de IL-33 estimulação por TNF- α .	Tecidos periodontais humanos, e Fibroblastos gengivais humanos.	O estímulo de IL-33 induzido por TNF- α , pode estar relacionado ao estímulo de Th2, visando o processo de respostas protetoras, anti-inflamatórias e de reparação.

Nosso estudo permitiu também verificar que a média de estudos indexados em banco de dados norte-americano (Pubmed) relacionando os descritores aqui utilizados é de 2,4/ano. No entanto quanto a sua distribuição nos últimos 5 anos, não segue uma ascensão linear, o que implica em uma distribuição da frequência de produção anual não gaussiana.

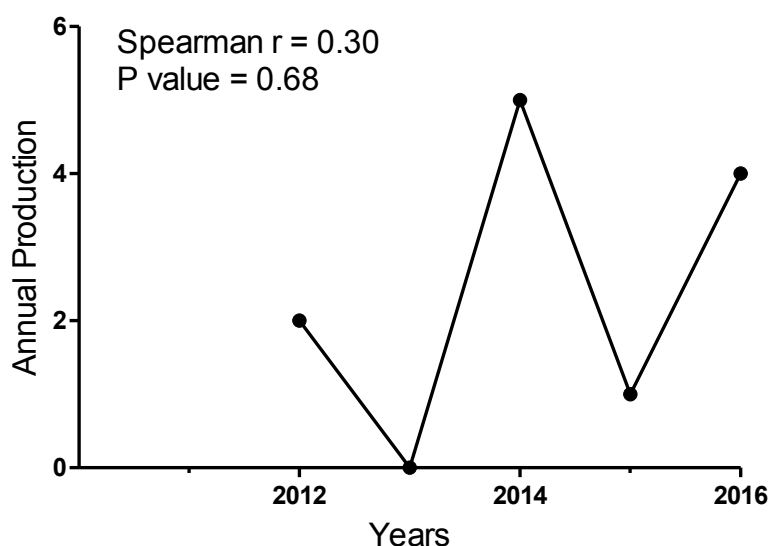


Figura 1. Produção anual de obras associadas com descritores: proinflammatory, protein, periodontal disease, elderly e IL-33. As buscas foram realizadas em base de dados norte-americana, Pubmed. Foram realizadas três associações: 1ª “proinflammatory”, “protein”, “periodontal”, “disease” e “elderly”; 2ª “IL-33”, “periodontal”, “disease” e “elderly”; 3ª “IL-33”, “periodontal” e “disease”. Os dados representam as obras dos últimos 5 anos. Foi utilizado o teste de Spearman para correlação, $p = 0,68$.

Levando em consideração as diferenças entre os sistemas e modelos de estudos, verificamos aqui um importante dado, a frequência de estudos que relacionaram diferentes modelos, assim como os estudos que associaram o aumento de IL-33, de acordo com o modelo utilizado, *in vitro*, murino e/ou humanos (Figura 2). Observamos um índice para 45% de avaliações com humanos, 33% em modelo murino, e 22% modelos *in vitro* (Figura 2A). Curiosamente, dos estudos que avaliaram a relação de doença periodontal crônica e aumento de IL-33, 100% de estudos com modelos *in vitro* e murino se relacionaram com o aumento, já em humanos, a relação da doença com o aumento de IL-33 foi observado em 50% dos casos.

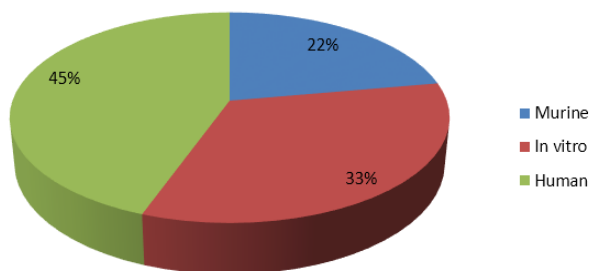
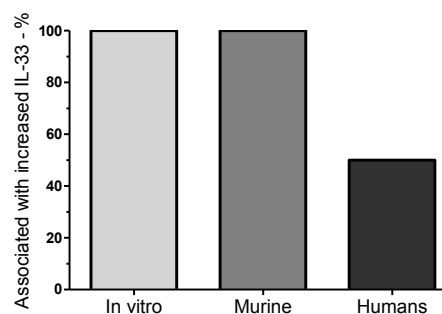
A**B**

Figura 2. Associação entre aplicação de diferentes modelos de estudos, doença periodontal e IL-33. As obras foram selecionadas após as associações com os descritores, os dados foram estratificados quanto a utilização de diferentes modelos. Em A, frequência da utilização de diferentes modelos com os descritores avaliados. Em B, associação das obras das quais houve aumento de IL-33 em doença periodontal com diferentes modelos. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações, $P > 0,05$.

6. Discussão

O desequilíbrio entre a microbiota da cavidade oral e o sistema imune resulta na possibilidade do desenvolvimento de doenças periodontais. A senescência é acompanhada de diversos mecanismos que possibilitam no desequilíbrio do sistema imune na cavidade oral, além disso, a doença periodontal tem sido associada a ser um fator de risco para desenvolvimento de doenças crônicas, algo frequente em idosos. Assim, relacionar e/ou compreender mecanismos e as principais moléculas possibilitam não somente a compreensão da fisiopatogeneze da doença, mas também um direcionamento a novos alvos terapêuticos. Nosso estudo possibilitou avaliar importantes obras que relacionaram com a temática. Curiosamente, embora se tenha diversas indicações para abordagens da doença periodontal crônica em idosos, evidenciamos um número baixo de obras, uma distribuição heterogênea do número de artigos nos últimos 5 anos. Além disso, os dados possibilitaram demonstrar uma maior frequência de estudos relacionados com o aumento de proteína pró-inflamatória, a IL-33, em doenças periodontais em modelos murinos e *in vitro*, em relação aos estudos diretamente em humanos.

Em estudo clínico após avaliação de 42 pacientes com diferentes características clínicas e diferentes doenças periodontais, se observou que houve um aumento de INF- γ no fluido crevicular dependente do estágio clínico, e ainda

não se encontrou níveis detectáveis de IL-33 (Papathanasiou *et al.*, 2014). Em outro estudo, com 1020 participantes, foram avaliadas as possíveis associações entre os genomas e a susceptibilidade de infecção por patógenos periodontais. No mesmo não houve associações significativas, entretanto encontraram evidências de associações de 13 loci, incluindo KCNK1, FBXO38, UHRF2, IL33, RUNX2, TRPS1, CAMTA1, e VAMP3, importantes loci que controlam a homeostase humana, incluindo processos de sinalização inflamatórios como associado com IL33 (Divaris *et al.*, 2012). Em contraste outra avaliação demonstrou que há um aumento crescente de fluido crevicular em indivíduos saudáveis, gengivite e periodontite crônica, e que a concentração de IL-33 no fluido crevicular de pacientes com periodontite crônica foi significativamente menor em relação a pacientes com gengivite e saudáveis (Sağlam *et al.*, 2016). Ainda em avaliação com humanos, abordagem relata a associação da potencialidade da atividade da IL-33 no processo de reabsorção óssea RANKL dependente, além disso, relatam níveis aumentados da IL-33 em pacientes com doença periodontal crônica (Köseoglu *et al.*, 2015). Acreditamos que a variabilidade de expressões genéticas, observada em humanos, bem como as possibilidades de uma diversidade de efeitos ambientais, podem dirigir diferentes vias de controle de infecção e processos de reparo. Além disso, estudos associam o aumento de expressão de IL-33 com o tipo de patógeno, como o *Porphyromonas gingivalis*, do qual foi associado em aumentar a expressão de IL-33 em citoplasma de células epiteliais gengivais humanas, ou ainda a observação do aumento do potencial de reabsorção óssea quando associado o mesmo patógeno (Malcolm *et al.*, 2015; Tada *et al.*, 2016). Nosso estudo corrobora com a literatura, demonstrando divergências entre a participação da IL-33 na patogênese da doença periodontal, mas que sobressai uma possível atividade desta proteína via ST2, o seu receptor, na doença periodontal crônica (Barksby *et al.*, 2007; Cordero Da Luz *et al.*, 2014).

Contudo o presente estudo permite apontar para necessidade de novas abordagens relacionadas a moléculas vinculadas à doença periodontal crônica no idoso. Além disso, sugere a participação efetiva da IL-33 na patogênese da doença periodontal crônica, dependente de fatores genéticos, ambientais e tipo de agente relacionado. Assim é possível apontar o eixo associado com a participação da IL-33 na doença periodontal como possível alvo terapêutico.

7. Referências Bibliográficas

1. McBean AM, Li S, Gilbertson DT, Collins AJ. Differences in diabetes prevalence, incidence, and mortality among the elderly of four racial/ethnic groups: whites, blacks, Hispanics, and Asians. *Diabetes care*. 2004;27(10):2317-24.
2. Ostchega Y, Dillon CF, Hughes JP, Carroll M, Yoon S. Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control in older US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1988 to 2004. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2007;55(7):1056-65.
3. Tutuncu Z, Kavanaugh A. Rheumatic disease in the elderly: rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2007;33(1):57-70.
4. Boehm TK, Scannapieco FA. The epidemiology, consequences and management of periodontal disease in older adults. *The Journal of the American Dental Association*. 2007;138:S26-S33.
5. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
6. Velden U. The onset age of periodontal destruction. *Journal of clinical periodontology*. 1991;18(6):380-3.
7. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, de Luca M, Ottaviani E, *et al*. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;908(1):244-54.
8. Loesche WJ. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clinical infectious diseases*. 1993;16(Supplement 4):S203-S10.
9. Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA, Dawson D, Morford LA, Huja PE, *et al*. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2016;72(1):54-75.
10. Gankovskaya L, Khelminskaya N, Molchanova E, Svitich O. [ROLE OF INNATE IMMUNITY FACTORS IN PERIODONTITIS PATHOGENESIS]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*. 2015(2):100-7.
11. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2004;35(1):21-41.
12. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2008;79(8S):1569-76.
13. Accarini R, Godoy MFd. Periodontal disease as a potential risk factor for acute coronary syndromes. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2006;87(5):592-6.
14. Alves CdAD, Andion J, Brandão M, Menezes R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. 2007.
15. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Annals of internal medicine*. 2009;151(4):264-9.
16. Ahn SH, Cho SH, Song JE, Kim S, Oh SS, Jung S, *et al*. Caveolin-1 serves as a negative effector in senescent human gingival fibroblasts during *Fusobacterium nucleatum* infection. *Molecular Oral Microbiology*. 2016.
17. Ianova O, Medvedev D, Lin'kova N, Trifonov N, D'iakonov M. [Molecular mechanisms of combined extremely radiofrequency and infrared therapy in various age patients with chronic parodontitis]. *Advances in gerontology= Uspekhi gerontologii/Rossiiskaia akademiia nauk, Gerontologicheskoe obshchestvo*. 2013;27(4):657-61.

18. Kurşunlu SF, Öztürk VÖ, Han B, Atmaca H, Emingil G. Gingival crevicular fluid interleukin-36 β (-1F8), interleukin-36 γ (-1F9) and interleukin-33 (-1F11) levels in different periodontal disease. *Archives of oral biology*. 2015;60(1):77-83.
19. Nizam N, Basoglu OK, Tasbakan MS, Nalbantsoy A, Buduneli N. Salivary cytokines and the association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2014;85(7):e251-e8.
20. Papathanasiou E, Teles F, Griffin T, Arguello E, Finkelman M, Hanley J, *et al*. Gingival crevicular fluid levels of interferon- γ , but not interleukin-4 or-33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 2014;49(1):55-61.
21. Divaris K, Monda K, North KE, Olshan AF, Lange EM, Moss K, *et al*. Genome-wide association study of periodontal pathogen colonization. *Journal of dental research*. 2012;91(7 suppl):S21-S8.
22. Buduneli N, Özçaka Ö, Nalbantsoy A. Interleukin-33 levels in gingival crevicular fluid, saliva, or plasma do not differentiate chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2012;83(3):362-8.
23. Sağlam M, Köseoğlu S, Aral CA, Savran L, Pekbağrıyanık T, Çetinkaya A. Increased levels of interleukin-33 in gingival crevicular fluids of patients with chronic periodontitis. *Odontology*. 2016:1-7.
24. Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, Hagiwara M, Kiyoura Y, Shimauchi H, *et al*. Porphyromonas gingivalis Gingipain-Dependently Enhances IL-33 Production in Human Gingival Epithelial Cells. *PloS one*. 2016;11(4):e0152794.
25. Malcolm J, Awang R, Oliver-Bell J, Butcher J, Campbell L, Planell AA, *et al*. IL-33 exacerbates periodontal disease through induction of RANKL. *Journal of dental research*. 2015:0022034515577815.
26. Köseoğlu S, Hatipoğlu M, Sağlam M, Enhoş Ş, Esen H. Interleukin-33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2015;50(4):525-34.
27. Beklen A, Tsaous Memet G. Interleukin-1 superfamily member, interleukin-33, in periodontal diseases. *Biotechnic & Histochemistry*. 2014;89(3):209-14.
28. Cordero da Luz FA, Lima Oliveira AP, Borges D, Cristina Brígido P, Barbosa Silva MJ. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediators of inflammation*. 2014;2014.
29. Barksby H, Lea S, Preshaw P, Taylor J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical & Experimental Immunology*. 2007;149(2):217-25.

CAPÍTULO 5. SELEÇÃO E PREDIÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS PARA RECEPTORES ST2

Wellington Francisco Rodrigues^{1,2,3*#}, Camila Botelho Miguel^{2*}, Carlos Antônio Trindade da Silva¹, Siomar de Castro Soares², Emília Rezende Vaz¹, Patrícia Terra Alves¹, Luiz Ricardo Goulart Filho¹, Carlos Ueira-Vieira¹.

¹Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia/MG, Brasil.

²Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM. Uberaba/MG, Brasil.

³Faculdade Morgana Potrich - FAMP - Mineiros, GO, Brasil.

* Contribuíram igualmente para este trabalho.

Autor correspondente: Wellington Francisco Rodrigues

e-mail: wellington.frodrigues@hotmail.com

1. Resumo

A IL-33 é uma citocina sinalizadora e mediadora de respostas inflamatórias. Tem sido associada com respostas com perfil Th2, e a fisiopatogênese de doenças inflamatórias, se tornando assim um alvo terapêutico. Desta forma, nosso estudo objetivou prever possíveis alvos terapêuticos que associam com o eixo IL-33/ST2, e possibilite o seu controle através da interação de peptídeos miméticos e bioativos. A partir de uma biblioteca de fagos randomizada selecionamos sequências que interagiram com PBMC humanos, mastócitos murino e diretamente com a IL-33. Alinhamento e predições por bioinformática foram realizadas. O estímulo de células KU812 foi monitorado após indução com os fagos selecionados, com ou sem IL-33. Nossa avaliação foi capaz, a partir de bibliotecas de fagos randomizada, indicar 2 alvos que se associaram a se relacionar com receptores ST2 presentes em PBMC humano, e mastócitos murino. Além disso, nosso estudo permitiu prever peptídeos que interagem diretamente com a interleucina-33, e induzem e/ou inibem a produção de citocina vinculada ao perfil Th2. Contudo nosso estudo pode concluir que as sequências aqui descritas são possíveis peptídeos ao uso terapêutico para diversas doenças associadas ao eixo IL-33/ST2.

Palavras-chave: IL-33, ST2, Phage display, Terapia

2. Abstract

IL-33 is a cytokine signaling and mediator of inflammatory responses. It has been associated with responses to Th2 and the pathophysiology of inflammatory diseases, thus becoming a therapeutic target. Thus, our study aimed to predict potential therapeutic targets associated with the IL-33 / ST2 axis, and allows its control through the interaction of mimetic and bioactive peptides. Starting from a random phage library selected sequences that interacted with human PBMC directly with murine mast cells and IL-33. Alignment and by bioinformatics predictions were performed. The KU812 cells was monitored after stimulation with the selected phage induction, with or without IL-33. Our evaluation was able from randomized phage libraries, indicate two targets which are associated to relate to ST2 receptors present in human PBMCs, and murine mast cells. Furthermore, our study possible to predict peptides that interact directly with interleukin-33 and induce and / or inhibit cytokine linked to Th2. However our study it can be concluded that the sequences described herein are possible peptides to therapeutic use for several diseases associated with IL-33 / ST2 axis.

Keywords: IL-33, ST2, Phage display, Therapy

3. Introdução

IL-33 (também chamado IL-1F11), pertence à família IL-1, é mais relacionada em estrutura com a IL-18 e IL-1 β (Schmitz *et al.*, 2005). A IL-33 induz as células T auxiliares, mastócitos, basófilos, eosinófilos, pela sinalização do receptor da IL-1 relacionada com a proteína ST2 (Schmitz *et al.*, 2005; Hayakawa *et al.*, 2007) e o receptor acessório da IL-1 (Palmer *et al.*, 2008), onde ativa NF-kB e quinases para induzir a produção de citocinas tipo 2 (Dinarello, 2005; Schmitz *et al.*, 2005; Komai-Koma *et al.*, 2007).

O gene da IL-33 humana está localizado no cromossomo 9p24.1, enquanto o seu homólogo do rato pode ser encontrado na região cromossômica 19qC1 (Schmitz *et al.*, 2005). As sequências de cDNA da IL-33 codificam 270 e 266 aminoácidos para homem e camundongo, respectivamente, correspondentes a todo o comprimento de proteínas com massas calculadas de 30 e 29,9 kDa (Schmitz *et al.*, 2005). A IL-33 estimula uma via pró-inflamatória e Th2 em mastócitos e linfócitos Th2 (Ali *et al.*, 2007; Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009), induz a quimiotaxia de células Th2, promove eosinófilos e basófilos de adesão, e aumenta a sobrevivência e migração de eosinófilos e basófilos (Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009).

A ativação da IL-33 via o seu receptor tem sido relacionada fazer parte do eixo de diversas doenças, principalmente associadas a processos alérgicos, como a asma (Préfontaine *et al.*, 2009), ou ainda diabetes, doenças cardíacas e periodontal. Tornando-se assim um importante alvo terapêutico (Liew *et al.*, 2010; Miller e Liew, 2011). Assim o nosso estudo objetivou prever possíveis alvos de interação com esta importante citocina, visando atividades antagonistas ou agonistas.

4. Métodos

4.1. Amostras biológicas

Foi coletado sangue periférico (15mL) humano, de quatro voluntários saudáveis, além de líquido peritoneal de ratos wistars. Todas as etapas foram previamente

aprovadas pelo Comitê de Ética e Pesquisas em Humanos (CEP 449/10) e pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA).

4.2. Células mononucleares humanas (PBMC) e mastócitos peritoneal de ratos

As PBMC foram isoladas a partir de 15 mL de sangue venoso periférico e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque, com densidade 1.077 g/L. Já as células mastocitárias foram isoladas de 20 mL de lavado peritoneal e separadas em gradiente de Percol, sendo posteriormente verificada a viabilidade celular com azul de tripan.

4.3. Isolamento de peptídeos ligantes a superfície de PBMC e da IL-33

Para selecionar peptídeos ligantes ao receptor da Interleucina-33 (IL-33) de PBMC e IL33, foi escolhida a biblioteca de peptídeos randômicos fusionados em fagos (Ph.D.c7c, NEW ENGLAND BioLabs®Inc). Foram realizados 3 ciclos de seleção, sendo que em cada tubo foi adicionado PBMC e/ou IL-33 recombinante (PeproTech). Para o primeiro ciclo de seleção, foi adicionado no mesmo microtubo 10 µL da biblioteca diluída em 500 µL de PBS 1X. Para seleção dos fagos ligantes de PBMC, os mesmos foram eluídos por competição incubando 20 ng de IL-33 recombinante humana com PBMC-fago por 1 hora a 4°C. Em seguida 10µL do eluato de fagos foram recolhidos e utilizados para titulação. Para a amplificação do eluato remanescente, e/ou dos fagos ligantes de IL-33 foi retirada uma colônia isolada de *Escherichia coli* (linhagem ER2738) previamente crescida em meio LB (0,2g LB + 20mL de água destilada e posterior esterilização) com tetraciclina, sob agitação a 37°C até a fase early-log (OD 600 ~ 0,3), o eluato foi adicionado e incubado a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. A cultura foi submetida à centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e recentrifugada para total separação das bactérias. Logo após, 80% do sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado onde foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril), incubou-se por 12-16 horas a 4°C. O precipitado foi suspenso em 1mL de PBS 1X e precipitado novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl incubado em gelo

por 1 hora. Foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C, descartado o sobrenadante e a centrifugação novamente realizada. O precipitado foi resuspenso em 200µL PBS 1X, obtendo-se então o eluato amplificado, que foi posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

4.4. Extração de DNA de fagos

Colônias isoladas dos fagos foram coletadas de uma placa de titulação provenientes do 3º ciclo de seleção do Biopanning e amplificadas em meio de cultura LB em placas deep well contendo 1,2 ml de cultura de ER2738 em fase early-log (OD 600 ~ 0,3), sendo que em cada poço foi adicionado somente uma colônia contendo o fago.

4.5. Sequenciamento

Foram utilizados para reação de sequenciamento 500 ng de DNA molde de 5pmol do primer -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham 36 Biosciences). Para a realização de reação de 35 ciclos foi utilizado um Termociclador de placas (MasterCycler – Eppendorf) nas seguintes condições: Desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do primer (a 58°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). A leitura do sequenciamento foi realizada em um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

4.6. Bioinformática

O programa DNA PRO (<http://relic.bio.anl.gov/>) foi utilizado para traduzir as sequências. Análise de similaridade dos peptídeos com outras proteínas foram realizadas pelo BLAST.

4.7. Elisa

Inicialmente foi realizada a técnica Elisa para a verificação da capacidade de ligação em PBMC humano e/ou Mastócitos extraído de lavado peritoneal de ratos Wistar. As células foram utilizadas para sensibilizar as placas, onde posteriormente se utilizou os fagos detectados, com a inserção do fago selvagem. As presenças dos fagos foram detectadas pela utilização do anti-M13. Além disso, após cultura com célula KU812 e estímulos com fago e/ou IL-33 (30 ng/mL), o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas (IL-4 e IL-5). A detecção e quantificação por ELISA foi realizada utilizando kits para detecção de citocinas R&D Systems (Quantikine), de acordo com as especificações do fabricante. Em resumo, placas de polipropileno de alta afinidade, com 96 poços de fundo chato (*NUNC* – Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais (50µl) contra cada uma das citocinas (IL-4 e IL-5) diluídos em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,2, e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS/Tween a 0,05%, bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente, em solução PBS-BSA (solução salina tamponada com fosfato - soro-albumina bovina) 2%, e lavadas novamente com PBS/Tween a 0,05%. Curvas padrões com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes foram utilizadas como padrão de referência. As amostras foram incubadas *overnight* a 4°C, lavadas novamente com PBS/Tween a 0,05% e foi adicionado anticorpo secundário anti-citocina conjugado com biotina por 2 horas a 37°C. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS/Tween a 0,05% e incubadas com estreptoavidina-peroxidase (2 horas a 37°C). Finalmente, após nova lavagem com solução de PBS/Tween a 0,05%, as placas foram incubadas com tetrametilbenzidina (TMB) e protegidas da luz para revelação das reações, que foram interrompidas com solução ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas em leitor de microplacas com o filtro de 450 nm (*Biorad 2550 Reader EIA, USA*).

4.8. Estatística

Para as avaliações foi utilizado o programa da Graphpad Prisma. O teste T não pareado foi utilizado para as comparações entre os grupos. Foi considerado diferenças estatísticas quando $p < 0,05$ (Mandarim-De-Lacerda, 2003).

5. Resultados

Após seleção de possíveis ligantes de ST2, selecionamos 11 peptídeos: SFLARSQ (A2), FASLLVI (A08), VRASGPS (B04), LHTSVAL (B07), LLPDATR (B08), HKSPALG (C01), PFVGHWF (C07), SLQLSSL (D01), AVSPSVC (E01), FPPPSRH (E08), LTSPSSL (G07). Estimulo com PBMC foi realizado, e após avaliação o E08 se destacou quanto a capacidade de ligação ($p < 0,05$) (Figura 1).

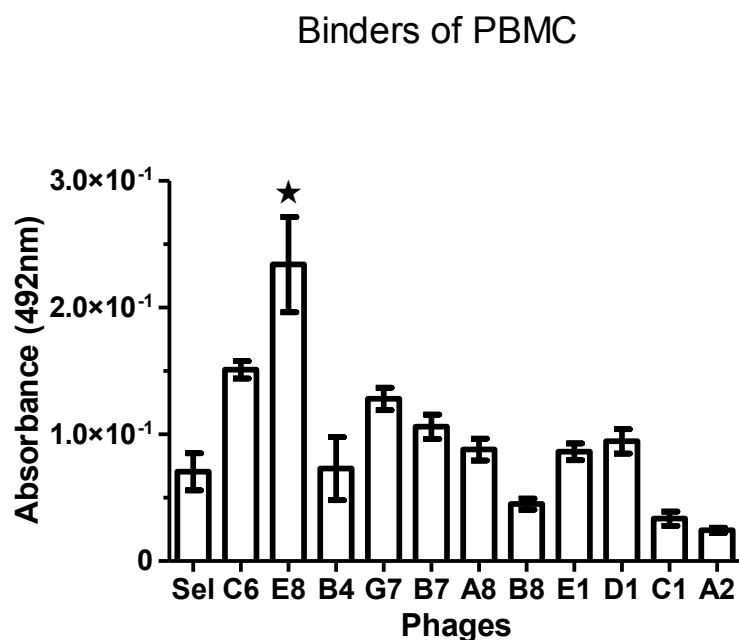


Figura 4. Capacitada de ligação em PBMC. Após separação de PBMC humano, foi realizado ELISA para verificar a afinidade de ligação dos fagos em PBMC. *indica diferença estatisticamente significativa.

Além disso, verificamos a afinidade de ligação em mastócitos, célula que expressa receptores ST2. Curiosamente alguns fagos apresentaram maiores afinidades de ligação em relação ao fago selvagem, incluindo o E8, somente que

se destacou de forma estatisticamente significativa o fago com a sequência B7 ($p < 0,05$) (Figura 2).

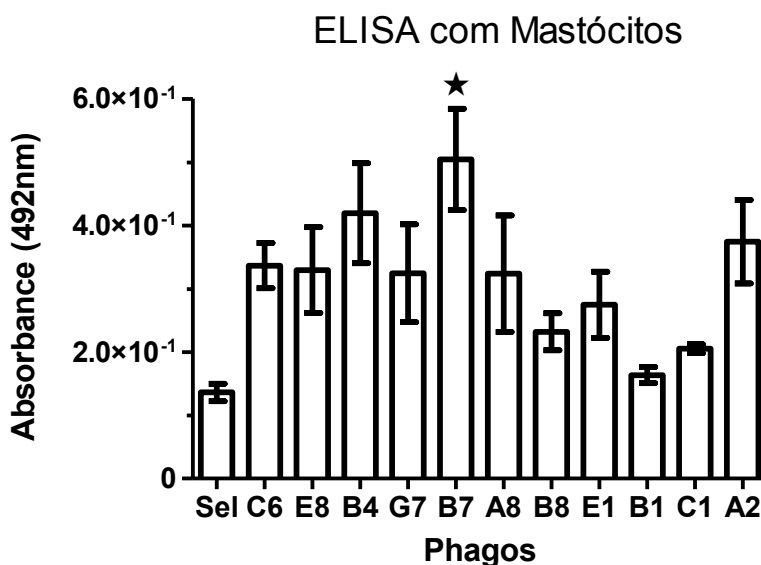


Figura 5. Capacidade de ligação em Mastócitos. Após separação de mastócitos obtidos em lavado peritoneal de ratos wistar, foi realizado ELISA para verificar a afinidade de ligação. *indica diferença estatisticamente significativa.

Após a predição de 2 sequências potenciais em atividade biológica para ligação com ST2, avaliamos as sequências selecionadas para ligação da IL-33, ligante de ST2. As sequências selecionadas foram (N = 13): KNVQANQ (1), SPGYMWM (2), YEKPNHR (3), TGNSAIK (4), LSALPAL (5), QPRMLNN (6), NLETMKI (7), GPGSYAR (8), TVRTSAD (9), TGTDSAT (10), PLMVHGV (11), NHGILTT (12), NLTTLAQ (13). Desta forma realizamos uma avaliação *in situ*, das possibilidades de interação com a IL-33 das referidas sequências. De acordo a avaliação os números de peptídeos 1, 2, 5, 8, 9 e 11 pertencem a uma alta interação, e os 3, 6, 7 e 12 uma média interação em modelo de ligação (Quadro 1). Com base no resultado, podemos concluir que estes peptídeos possuem mais chances de interações com a IL-33.

Quadro 1 - Análise de ancoragem usando servidor dock CABS com estrutura de NMR de IL 33 (PDB ID: 4KC3)

Serial No	Peptide	Residues of IL33 interacting with peptide	Average rmsd of cluster 1
1	KNVQANQ	Ser54	0.737195
2	SPGYMWM	Ser54,Asn103,Asn99	4.49106
3	YEKPNHR	Ser79	8.1163
4	TGNSAIK	Ser137,Asn103,Tyr6	7.18946
5	LSALPAL	No interactions	0.854141
6	QPRMLNN	Asn55,Ser54	1.062
7	NLETMKI	Asp68,Lys143	6.35974
8	GPGSYAR	Ser64,Ser1,Leu89	3.9264
9	TVRTSAD	Leu97,Ser54,Asn55,Asn99	0.0367273
10	TGTDSAT	Asp91,Ser46,Thr62	0.887144
11	PLMVHGV	Thr4,Met58,Asn102	1.08461
12	NHGILTT	No interactions	5.07907
13	NLTTLAQ	Tyr48,asp91	5.55768

De acordo com a literatura e análise de acoplamento pode-se concluir que os peptídeos 1, 2, 8-11 se interagem com a proteína.

Figure 1: Pep1 image with IL33-4KC3

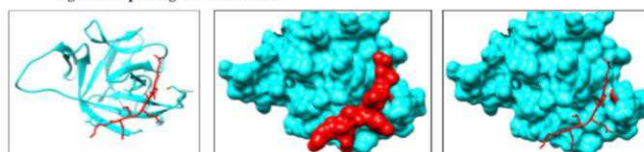


Figure 2: Pep2 image with IL33-4KC

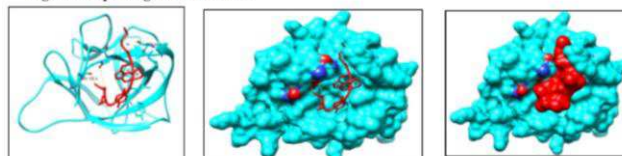


Figure 8: Pep8 image with IL33-4KC3

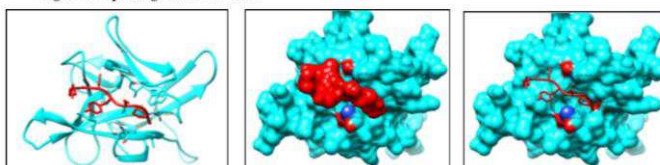
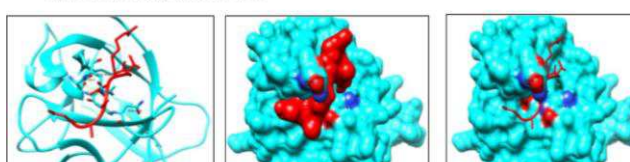


Figure 9: Pep9 image with IL33-4KC3



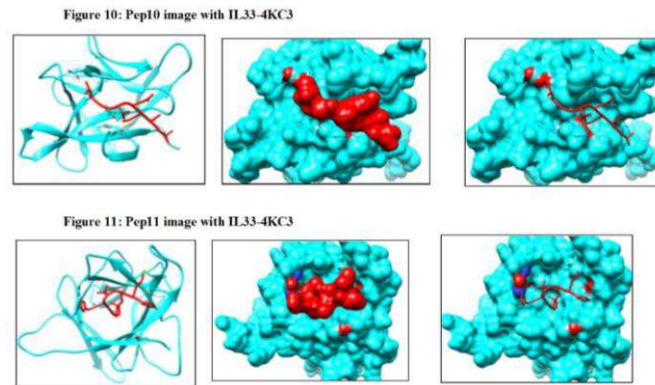


Figura 4. Ilustração da interação entre as sequências selecionadas e a proteína IL-33.

Após predição, avaliamos o comportamento dos diferentes fagos após estímulo em linhagem celular KU812. Os estímulos foram dados com e sem a IL-33. O fago 1 foi capaz de aumentar a produção de IL-5, os fagos 9 e 10 mesmo com a presença de IL-33 não estimulou as células. Houve aumento de IL-5 na presença de IL-33.

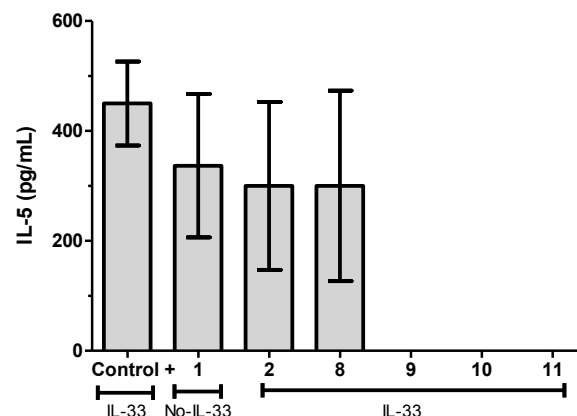


Figura 5. Concentração de IL-5 após estímulo de células KU812.

6. Discussão

A IL-33 é uma citocina sinalizadora e mediadora de respostas inflamatórias. Tem sido associado com respostas com perfil Th2, e a fisiopatogênese de doenças inflamatórias, se tornando assim um alvo terapêutico. Desta forma, nosso estudo objetivou prever possíveis alvos terapêuticos que associam com o eixo IL-33/ST2, e possibilite o seu controle através da interação de peptídeos miméticos e bioativos.

O nosso estudo, a partir de bibliotecas de fagos randomizada, possibilitou indicar 2 alvos que se associaram a se relacionar com receptores ST2 presentes em PBMC humano, e mastócitos murino. Além disso, nosso estudo permitiu prever peptídeos que interagem diretamente com a interleucina-33, e induzem e/ou inibem a produção de citocina vinculada ao perfil Th2.

Dado a importante em se interagir com a ativação desta citocina, outros autores realizaram um estudo aplicando phage display, visando a seleção de fragmentos de anticorpo humano de cadeia simples humanos contra a IL-33, onde 5 cadeias foram selecionadas e indicadas para posterior investigação do seu efeito sobre as doenças inflamatórias e alérgicas, tais como asma por bloqueio da IL-33 (Yuan *et al.*, 2012).

A partir de um delineamento diferente verificamos sequências com potencial de interação com receptor ST2, bem como com o seu ligante IL-33. A inibição de IL-5 demonstrou ser promissora uma vez que esta citocina desempenha um importante papel na ativação de eosinófilos e na indução da produção de imunoglobulinas por linfócitos B (Sanderson, 1992; King *et al.*, 1993). Por outro lado, o aumento de IL-5 é importante para orquestrar importantes atividades biológicas, relacionada ao controle de eosinófilos em agressões parasitárias, por exemplo (King *et al.*, 1993; Kopf *et al.*, 1996).

Contudo nosso estudo pode concluir que as sequências aqui descritas são possíveis peptídeos ao uso terapêutico para diversas doenças associadas ao eixo IL-33/ST2.

7. Referências Bibliográficas

ACCARINI, R.; GODOY, M. F. D. Periodontal disease as a potential risk factor for acute coronary syndromes. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 87, n. 5, p. 592-596, 2006. ISSN 0066-782X.

AHMED, M. A.; EL MORSY, E. M.; AHMED, A. A. Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats. **Life sciences**, v. 110, n. 2, p. 61-69, 2014. ISSN 0024-3205.

AHN, S. H. et al. Caveolin-1 serves as a negative effector in senescent human gingival fibroblasts during *Fusobacterium nucleatum* infection. **Molecular Oral Microbiology**, 2016. ISSN 2041-1014.

ALBRIGHT, J. W.; ALBRIGHT, J. F. Ageing alters the competence of the immune system to control parasitic infection. **Immunology letters**, v. 40, n. 3, p. 279-285, 1994. ISSN 0165-2478.

ALI, N. et al. Parasitocidal and brine shrimp cytotoxicity potential of crude methanolic extract of rind of *Punica granatum* Linn against round worms and tape worms. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 28, n. 3, p. 959-962, 2015. ISSN 1011-601X.

ALI, S. et al. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 47, p. 18660-18665, 2007. ISSN 0027-8424.

ALVES, C. D. A. D. et al. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. 2007. ISSN 0004-2730.

AMAL, B. et al. Preparation and characterisation of *Punica granatum* pericarp aqueous extract loaded chitosan-collagen-starch membrane: role in wound healing process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 5, p. 1-9, 2015. ISSN 0957-4530.

BAKER, P. J. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 10, p. 1181-1192, 2000. ISSN 1286-4579.

BARKSBY, H. et al. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 149, n. 2, p. 217-225, 2007. ISSN 1365-2249.

BEKLEN, A.; TSAOUS MEMET, G. Interleukin-1 superfamily member, interleukin-33, in periodontal diseases. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 89, n. 3, p. 209-214, 2014. ISSN 1052-0295.

BOEHM, T. K.; SCANNAPIECO, F. A. The epidemiology, consequences and management of periodontal disease in older adults. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, p. S26-S33, 2007. ISSN 0002-8177.

BONNET, N.; PIERROZ, D.; FERRARI, S. L. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 8, n. 2, p. 94-104, 2008.

BUDUNELI, N.; ÖZÇAKA, Ö.; NALBANTSOY, A. Interleukin-33 levels in gingival crevicular fluid, saliva, or plasma do not differentiate chronic periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 83, n. 3, p. 362-368, 2012. ISSN 0022-3492.

BÔAS, P. J. F. V.; LÚCIA, A.; FERREIRA, A. Infecção em idosos internados em instituição de longa permanência. **Cep**, v. 18600, p. 005, 2007.

CAVALLINI, G. et al. Use of red blood cell membranes to evaluate the antioxidant potential of plant extracts. **Plant foods for human nutrition**, v. 69, n. 2, p. 108-114, 2014. ISSN 0921-9668.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 8S, p. 1569-1576, 2008. ISSN 0022-3492.

CORDERO DA LUZ, F. A. et al. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014. ISSN 0962-9351.

DANG, X. et al. Cell-specific processing and release of the hormone-like precursor and candidate tumor suppressor gene product, Ecrg4. **Cell and tissue research**, v. 348, n. 3, p. 505-514, 2012. ISSN 0302-766X.

DINARELLO, C. A. An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 461-462, 2005. ISSN 1074-7613.

DIVARIS, K. et al. Genome-wide association study of periodontal pathogen colonization. **Journal of dental research**, v. 91, n. 7 suppl, p. S21-S28, 2012. ISSN 0022-0345.

DIWAKAR, G. et al. Inhibitory effect of a novel combination of Salvia hispanica (chia) seed and Punica granatum (pomegranate) fruit extracts on melanin production. **Fitoterapia**, v. 97, p. 164-171, 2014. ISSN 0367-326X.

DUSHKIN, M. et al. Effects of rhaponticum carthamoides versus glycyrrhiza glabra and punica granatum extracts on metabolic syndrome signs in rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014. ISSN 1472-6882.

EBERSOLE, J. L. et al. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 72, n. 1, p. 54-75, 2016. ISSN 1600-0757.

FENG, Y.; RENSHAW, S.; MARTIN, P. Live imaging of tumor initiation in zebrafish larvae reveals a trophic role for leukocyte-derived PGE 2. **Current Biology**, v. 22, n. 13, p. 1253-1259, 2012. ISSN 0960-9822.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirurgica Brasileira**, 2005. ISSN 0102-8650.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, n. 1, p. 244-254, 2000. ISSN 1749-6632.

GANKOVSKAYA, L. et al. [ROLE OF INNATE IMMUNITY FACTORS IN PERIODONTITIS PATHOGENESIS]. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, n. 2, p. 100-107, 2015. ISSN 0372-9311.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 35, n. 1, p. 21-41, 2004. ISSN 1600-0757.

GENRE, F. et al. Adipokines, biomarkers of endothelial activation, and metabolic syndrome in patients with ankylosing spondylitis. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. ISSN 2314-6133.

GLURICH, I. et al. Systemic inflammation in cardiovascular and periodontal disease: comparative study. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 2, p. 425-432, 2002. ISSN 1556-6811.

GOLDSMITH, J.; JOBIN, C. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012. ISSN 1110-7243.

GUIMARÃES, S.; MOURA, D. Vascular adrenoceptors: an update. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 2, p. 319-356, 2001. ISSN 1521-0081.

GUNEIDY, R. A. et al. Inhibition of the recombinant cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* glutathione S-transferase. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 5, p. 528-536, 2014. ISSN 1877-959X.

H AHMED, A. et al. Pomegranate extract modulates processing of amyloid- β precursor protein in an aged Alzheimer's disease animal model. **Current Alzheimer Research**, v. 11, n. 9, p. 834-843, 2014. ISSN 1567-2050.

HAJIPOUR, S. et al. Motor and cognitive deficits due to permanent cerebral hypoperfusion/ischemia improve by pomegranate seed extract in rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 8, p. 991, 2014. ISSN 1028-8880.

HAYAKAWA, H. et al. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 36, p. 26369-26380, 2007. ISSN 0021-9258.

HUSARI, A. et al. Antioxidant activity of pomegranate juice reduces acute lung injury secondary to hyperoxia in an animal model. **BMC research notes**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014. ISSN 1756-0500.

IANOVA, O. et al. [Molecular mechanisms of combined extremely radiofrequency and infrared therapy in various age patients with chronic parodontitis]. **Advances in gerontology= Uspekhi gerontologii/Rossiiskaia akademiia nauk, Gerontologicheskoe obshchestvo**, v. 27, n. 4, p. 657-661, 2013. ISSN 1561-9125.

JAIN, V. et al. Attenuating effect of standardized fruit extract of *punica granatum* L in rat model of tibial and sural nerve transection induced neuropathic pain. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013. ISSN 1472-6882.

KANG, S. J. et al. Dried pomegranate potentiates anti-osteoporotic and anti-obesity activities of red clover dry extracts in ovariectomized rats. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2622-2647, 2015.

KAYAL, R. A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. ISSN 2314-6133.

KING, C. L. et al. Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 4, p. 1667, 1993.

KOMAI-KOMA, M. et al. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. **European journal of immunology**, v. 37, n. 10, p. 2779-2786, 2007. ISSN 1521-4141.

KOPF, M. et al. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. **Immunity**, v. 4, n. 1, p. 15-24, 1996. ISSN 1074-7613.

KOPPOLU, P. et al. Estimate of CRP and TNF-alpha level before and after periodontal therapy in cardiovascular disease patients. **Pan African Medical Journal**, v. 15, n. 1, 2013. ISSN 1937-8688.

KUBONIWA, M. et al. Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. **Journal of Dental Research**, p. 0022034516661142, 2016. ISSN 0022-0345.

KURŞUNLU, S. F. et al. Gingival crevicular fluid interleukin-36 β (-1F8), interleukin-36 γ (-1F9) and interleukin-33 (-1F11) levels in different periodontal disease. **Archives of oral biology**, v. 60, n. 1, p. 77-83, 2015. ISSN 0003-9969.

KÖSEOĞLU, S. et al. Interleukin-33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. **Journal of periodontal research**, v. 50, n. 4, p. 525-534, 2015. ISSN 1600-0765.

LAI, S.-L. et al. In vitro and in vivo anti-angiogenic activities of Panduratin A. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e38103, 2012. ISSN 1932-6203.

LALLA, E.; PAPAPANOU, P. N. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 738-748, 2011. ISSN 1759-5029.

LAURENT, F. et al. [Relationship between coronary artery disease and periodontal disease. What the cardiologist must know]. *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 2007. p.297-302.

LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 103-110, 2010. ISSN 1474-1733.

LIN, Q. et al. [Relationship between obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome and high sensitivity C-reactive protein in non-obese subjects]. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 93, n. 30, p. 2355-2358, 2013. ISSN 0376-2491.

LISTGARTEN, M. A. Pathogenesis of periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 13, n. 5, p. 418-425, 1986. ISSN 1600-051X.

LOESCHE, W. J. Bacterial mediators in periodontal disease. **Clinical infectious diseases**, v. 16, n. Supplement 4, p. S203-S210, 1993. ISSN 1058-4838.

LUNDBERG, K. et al. Periodontitis in RA—the citrullinated enolase connection. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 12, p. 727-730, 2010. ISSN 1759-4790.

LÉAUTÉ-LABRÈZE, C. et al. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 24, p. 2649-2651, 2008. ISSN 0028-4793.

MALCOLM, J. et al. IL-33 exacerbates periodontal disease through induction of RANKL. **Journal of dental research**, p. 0022034515577815, 2015. ISSN 0022-0345.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003. ISSN 0001-3765.

MCBEAN, A. M. et al. Differences in diabetes prevalence, incidence, and mortality among the elderly of four racial/ethnic groups: whites, blacks, Hispanics, and Asians. **Diabetes care**, v. 27, n. 10, p. 2317-2324, 2004. ISSN 0149-5992.

MILLER, A. M.; LIEW, F. Y. The IL-33/ST2 pathway—a new therapeutic target in cardiovascular disease. **Pharmacology & therapeutics**, v. 131, n. 2, p. 179-186, 2011. ISSN 0163-7258.

MIONE, M.; ZON, L. I. Cancer and inflammation: an aspirin a day keeps the cancer at bay. **Current Biology**, v. 22, n. 13, p. R522-R525, 2012. ISSN 0960-9822.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **Annals of internal medicine**, v. 151, n. 4, p. 264-269, 2009. ISSN 0003-4819.

MONCLARO, A. V. MÃ© todos atuais nas pesquisas que utilizam peixe-zebra. **Materiais e Metodos**, 2013.

NAYAK, S. B. et al. Wound healing activity of the fruit skin of Punica granatum. **Journal of medicinal food**, v. 16, n. 9, p. 857-861, 2013. ISSN 1096-620X.

NIBALI, L. et al. Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 3, p. 913-920, 2013. ISSN 0021-972X.

NIZAM, N. et al. Salivary cytokines and the association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease. **Journal of periodontology**, v. 85, n. 7, p. e251-e258, 2014. ISSN 0022-3492.

OSTCHEGA, Y. et al. Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control in older US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1988 to 2004. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 55, n. 7, p. 1056-1065, 2007. ISSN 1532-5415.

OZEKI, M. et al. Metabolomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Mass Spectrometry**, v. 5, n. 1, p. A0047-A0047, 2016. ISSN 2187-137X.

PALMER, G. et al. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. **Cytokine**, v. 42, n. 3, p. 358-364, 2008. ISSN 1043-4666.

PAPATHANASIOU, E. et al. Gingival crevicular fluid levels of interferon- γ , but not interleukin-4 or-33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. **Journal of periodontal research**, v. 49, n. 1, p. 55-61, 2014. ISSN 1600-0765.

PARK, K.-H.; CHO, K.-H. A zebrafish model for the rapid evaluation of pro-oxidative and inflammatory death by lipopolysaccharide, oxidized low-density lipoproteins, and glycated high-density lipoproteins. **Fish & shellfish immunology**, v. 31, n. 6, p. 904-910, 2011. ISSN 1050-4648.

PARKER, A. N.; WARD, C. K.; ESTES, N. R. Effect of a Punica granatum enriched diet on immunocompetence in Rhinella marina. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 321, n. 6, p. 316-323, 2014. ISSN 1932-5231.

PECARIC-PETKOVIC, T. et al. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1526-1534, 2009. ISSN 0006-4971.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, 2005. ISSN 0140-6736.

PIHLSTROM, B. L.; TABAK, L. The National Institute of Dental and Craniofacial Research: research for the practicing dentist. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 136, n. 6, p. 728-737, 2005. ISSN 0002-8177.

PRÉFONTAINE, D. et al. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 8, p. 5094-5103, 2009. ISSN 0022-1767.

RANA, J. et al. Inhibition of melanin content by Punicalagins in the super fruit pomegranate (*Punica granatum*). **Journal of cosmetic science**, v. 64, n. 6, p. 445-453, 2012. ISSN 1525-7886.

RANJBAR, M.; ZIBAE, A.; SENDI, J. J. A TRYPSIN-LIKE PROTEINASE IN THE MIDGUT OF *Ectomyelois ceratoniae* ZELLER (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE): PURIFICATION, CHARACTERIZATION, AND HOST PLANT INHIBITORS. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 85, n. 1, p. 1-12, 2014. ISSN 1520-6327.

REDDY, B. U. et al. Small molecule inhibitors of HCV replication from Pomegranate. **Scientific reports**, v. 4, 2014. ISSN 2045-2322.

RODRIGUES, W. et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 7, p. 2140-2151, 2012. ISSN 1476-5381.

RODRIGUES, W. F. et al. Establishing Standards for Studying Renal Function in Mice through Measurements of Body Size-Adjusted Creatinine and Urea Levels. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. ISSN 2314-6133.

RODRÍGUEZ-RUIZ, M.; TELLADO, M.; DEL POZO LOSADA, J. Combinación de propranolol oral y láser de colorante pulsado en el tratamiento de los hemangiomas infantiles ulcerados. *Anales de Pediatría*, 2015, Elsevier.

SANDERSON, C. J. Interleukin-5, eosinophils, and disease. **Blood**, v. 79, n. 12, p. 3101-3109, 1992. ISSN 0006-4971.

SAĞLAM, M. et al. Increased levels of interleukin-33 in gingival crevicular fluids of patients with chronic periodontitis. **Odontology**, p. 1-7, 2016. ISSN 1618-1247.

SCHEVEY, C. T.; TOSHKOV, S.; BREWER, M. S. Effect of natural antioxidants, irradiation, and cooking on lipid oxidation in refrigerated, salted ground beef patties. **Journal of food science**, v. 78, n. 11, p. S1793-S1799, 2013. ISSN 1750-3841.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479-490, 2005. ISSN 1074-7613.

SILVA, M. T. A.; GUERRA, L. G. G.; ALVES, C. R. R. Modelos comportamentais em neurociências. **Revista Brasileira de Análise do Comportamento**, v. 1, n. 2, 2015. ISSN 1807-8338.

SILVEIRA, T. R. D.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012. ISSN 0009-6725.

SOULI, A. et al. Inhibitory effects of two varieties of Tunisian Pomegranate (*Punica granatum* L.) extracts on gastrointestinal transit in rat. **Journal of medicinal food**, v. 18, n. 9, p. 1007-1012, 2015. ISSN 1096-620X.

SPILMONT, M. et al. Pomegranate and its derivatives can improve bone health through decreased inflammation and oxidative stress in an animal model of postmenopausal osteoporosis. **European journal of nutrition**, v. 53, n. 5, p. 1155-1164, 2014. ISSN 1436-6207.

_____. Pomegranate Peel Extract Prevents Bone Loss in a Preclinical Model of Osteoporosis and Stimulates Osteoblastic Differentiation in Vitro. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9265-9284, 2015.

STEPHEN, S. A. Unwanted effects of propranolol. **The American journal of cardiology**, v. 18, n. 3, p. 463-472, 1966. ISSN 0002-9149.

TADA, H. et al. Porphyromonas gingivalis Gingipain-Dependently Enhances IL-33 Production in Human Gingival Epithelial Cells. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0152794, 2016. ISSN 1932-6203.

TAKEUCHI, T. et al. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. **Biochemical pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 579-586, 2001. ISSN 0006-2952.

TAPIAS, V.; CANNON, J. R.; GREENAMYRE, J. T. Pomegranate juice exacerbates oxidative stress and nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 5, p. 1162-1176, 2014. ISSN 0197-4580.

TEHRANI, D. M. et al. Impact of inflammatory biomarkers on relation of high density lipoprotein-cholesterol with incident coronary heart disease: cardiovascular Health Study. **Atherosclerosis**, v. 231, n. 2, p. 246-251, 2013. ISSN 0021-9150.

TONETTI, M. S.; DYKE, T. E. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of clinical periodontology**, v. 40, n. s14, 2013. ISSN 1600-051X.

TRIGUEROS, L.; WOJDYŁO, A.; SENDRA, E. Antioxidant activity and protein–polyphenol interactions in a pomegranate (*Punica granatum* L.) yogurt. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 27, p. 6417-6425, 2014. ISSN 0021-8561.

TUTUNCU, Z.; KAVANAUGH, A. Rheumatic disease in the elderly: rheumatoid arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 57-70, 2007. ISSN 0889-857X.

VELDEN, U. The onset age of periodontal destruction. **Journal of clinical periodontology**, v. 18, n. 6, p. 380-383, 1991. ISSN 1600-051X.

VOGELPOEL, H. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: Verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 8, p. 1945-1956, 2004. ISSN 1520-6017.

WANG, J. et al. β -adrenoceptor mediated surgery-induced production of pro-inflammatory cytokines in rat microglia cells. **Journal of neuroimmunology**, v. 223, n. 1, p. 77-83, 2010. ISSN 0165-5728.

WANG, T. et al. Identification of IL-34 in teleost fish: differential expression of rainbow trout IL-34, MCSF1 and MCSF2, ligands of the MCSF receptor. **Molecular immunology**, v. 53, n. 4, p. 398-409, 2013. ISSN 0161-5890.

WU, D.; MEYDANI, S. N. Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 4, p. 900-914, 2008. ISSN 0741-5400.

XU, L. et al. Impact of β -Adrenoceptor Blockade on Systemic Inflammation and Coagulation Disturbances in Rats with Acute Traumatic Coagulopathy. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 468, 2015.

YUAN, Q. et al. Construction of human nonimmune library and selection of scFvs against IL-33. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, n. 3, p. 498-509, 2012. ISSN 0273-2289.

ZAHIN, M. et al. Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo [a] pyrene induced DNA adducts. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. ISSN 2314-6133.

ZHANG, D. et al. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. **Journal of periodontal research**, v. 38, n. 3, p. 324-332, 2003. ISSN 1600-0765.

ZHAO, W. et al. Preparative isolation and purification of urolithins from the intestinal metabolites of pomegranate ellagitannins by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 990, p. 111-117, 2015. ISSN 1570-0232.

ZOU, X. et al. Mitochondrial dysfunction in obesity-associated nonalcoholic fatty liver disease: the protective effects of pomegranate with its active component punicalagin. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21, n. 11, p. 1557-1570, 2014. ISSN 1523-0864.

ÜLKER, S. et al. New lipase assay using Pomegranate oil coating in microtiter plates. **Biochimie**, v. 120, p. 110-118, 2016. ISSN 0300-9084.