



ANDRESSA NAIRA DE JESUS PEREIRA

**NÍVEIS DE β -GLUCANAS NO CONTROLE DA DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS**

**LAVRAS-MG
2018**

ANDRESSA NAIRA DE JESUS PEREIRA

**NÍVEIS DE β -GLUCANAS NO CONTROLE DA DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Luciano José Pereira

Co-orientadora

Dra. Viviam de Oliveira Silva

**LAVRAS-MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pereira, Andressa Naira de Jesus.

Níveis de β -glucanas no controle da doença periodontal
induzida em ratos / Andressa Naira de Jesus Pereira. - 2018.

45 p. : il.

Orientador(a): Luciano José Pereira.

Coorientador(a): Viviam de Oliveira Silva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Periodontite. 2. Prebióticos. 3. Reabsorção óssea. I. Pereira,
Luciano José. II. Silva, Viviam de Oliveira. III. Título.

ANDRESSA NAIRA DE JESUS PEREIRA

**NÍVEIS DE β -GLUCANAS NO CONTROLE DA DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS**

**LEVELS OF β -GLUCANS FOR THE CONTROL OF INDUCED PERIODONTAL
DISEASE IN RATS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de abril de 2018.

Prof^o. Dr^o. Raimundo Vicente Sousa UFLA

Prof^a. Dr^a. Renata de Carvalho Foureaux UNILAVRAS

Dr^a. Viviam de Oliveira Silva UFLA

Prof^o. Dr^o. Luciano José Pereira UFLA

Prof^o. Dr^o. Luciano José Pereira
Orientador

**LAVRAS-MG
2018**

Aos meus amados sobrinhos Melissa e Josué, que acalmam meu coração com seus sorrisos sinceros e alegram minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por todas as bênçãos recebidas. À minha mãe pelo amor, paciência e carinho imensuráveis. Aos meus irmãos pelo apoio e por cuidarem tão bem de mim. Aos meus avós Lia e Luiz, obrigada pela educação, amor e por não medirem esforços para que eu pudesse ter uma vida melhor e com mais oportunidades.

Agradeço aos amigos do Dança Compasso UFLA pelos momentos de descontração, alegria e paz que só a dança é capaz de proporcionar.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia Veterinária: Diana Azzi, Matheus Brito, Janina Guilarducci, Andressa Veiga, Marina Apocalypse e Nathália Oliveira. Obrigada por toda a ajuda, apoio e amizade.

Ao técnico do laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária, Willian Cortez. Agradeço pela amizade, pelo auxílio no desenvolvimento prático das atividades e por exercer sua profissão com tanta dedicação e cuidado. À técnica do Departamento de Ciências da Saúde Vanessa Campos e à técnica do Biotério Central Erika Oliveira, obrigada pela ajuda, simpatia e amizade. Ao Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura e Prof^a. Dra. Grazziele Caroline da Silva, obrigada pelos ensinamentos e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agradeço à Prof^a. Dra. Renata de Carvalho Foureaux pelo auxílio na indução da doença periodontal, por ter aceitado o convite de participação da banca e por ser essa amiga simpática e sempre de bem com a vida.

Agradeço ao professor Prof. Dr. Flademir Wouters e toda equipe da patologia veterinária, especialmente Matheus Reis e Adriana Albuquerque, pela ajuda na realização dos procedimentos de histologia.

Ao Prof. Dr. Márcio Zangerônimo pela paciência e pelo auxílio com as análises estatísticas, muito obrigada! Agradeço também ao Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa por estar sempre disposto a ajudar e por ter aceitado o convite de participação na minha banca.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano José Pereira pela confiança, por me estimular sempre e pela paciência e compreensão nos momentos difíceis. Da mesma forma agradeço à minha coorientadora Dra. Viviam Oliveira, que além de amiga sempre foi uma inspiração. Obrigada por compartilhar comigo seus conhecimentos e por me ajudar na execução das análises.

Agradeço ao excelentíssimo Reitor da Universidade Federal de Lavras, José Roberto Soares Scolforo, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio

financeiro e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação representada pela Profa. Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha. Agradeço à Sra. Maria Fátima Ferreira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela simpatia e empenho em nos auxiliar sempre que preciso e aos docentes do Programa de Pós-Graduação e do Departamento de Medicina Veterinária por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos animais participantes do experimento, todo meu respeito e gratidão. À todos os amigos que contribuíram de alguma forma nesta etapa tão importante da minha vida, meu muito obrigada!

RESUMO GERAL

As β -glucanas (BGs) são polissacarídeos unidos por ligações do tipo β -(1,3) e β -(1,6) ou por ligações β -(1,3) e β -(1,4) dependendo de sua origem, como a parede celular de fungos, algas, bactérias e plantas. Sabidamente, as BGs de plantas apresentam efeitos metabólicos como redução da glicemia e dos níveis plasmáticos de colesterol, enquanto aquelas derivadas de fungos e bactérias modulam o sistema imune sendo inclusive utilizadas como adjuvantes em algumas vacinas. Estudo prévio do nosso grupo mostrou que a ingestão de BGs isolados de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg de peso vivo promoveu benefícios no controle da reabsorção óssea alveolar e parâmetros metabólicos simultaneamente em ratos diabéticos com doença periodontal (DP) induzida por ligadura. Este projeto teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com diferentes níveis de BGs isoladas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a reabsorção óssea alveolar (ROA) e parâmetros bioquímicos de ratos com DP. Foram utilizados 30 animais (N=6 por grupo) distribuídos aleatoriamente em cinco grupos que receberam diferentes doses de BGs (0mg/Kg; 10mg/Kg; 20mg/Kg; 40mg/Kg ou 80mg/Kg) por gavagem durante 28 dias. A DP foi induzida por ligadura nos primeiros molares mandibulares direitos e esquerdos com fio de algodão no 14º dia, permanecendo até o 28º dia, momento da eutanásia dos animais. A avaliação da progressão da DP (reabsorção óssea alveolar - ROA) foi realizada através de análise morfométrica (direta utilizando lupa), histométrica (coloração com hematoxilina/eosina), perda de junção epitelial (PJE) através de histometria. Também foram avaliados os níveis séricos de colesterol total (CT), triacilglicerois (TAG) e colesterol de Lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) utilizando-se kits enzimáticos colorimétricos. Os valores de colesterol de Lipoproteínas de baixa e muito baixa-densidade (LDL-c+VLDL-c) foram calculados utilizando-se fórmula específica. As médias obtidas com cada dose suplementar de BG foram submetidas à análise de regressão e, posteriormente, comparadas ao controle (0mg/Kg) pelo teste Dunnett a 5%. A BG foi eficiente em reduzir a ROA nos animais tratados com 20mg/Kg, 40mg/Kg e 80mg/Kg quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). A dose de 54mg/Kg foi identificada como ótima. Não foram observadas alterações significativas na PJE, níveis de CT, TAG, HDL-c e LDL-c +VLDL-c. Concluiu-se que as doses acima de 20mg/Kg de BG foram efetivas na prevenção da progressão da DP sem efeitos significativos sobre os parâmetros metabólicos.

Palavras-chave: Periodontite. Prebióticos. Reabsorção óssea.

GENERAL ABSTRACT

β -glucans (BGs) are polysaccharides linked by β - (1,3) and β - (1,6) or β - (1,3) and β - (1,4) bonds depending on their origin, such as the cell wall of fungi, algae, bacteria and plants. Plants BGs are known to have metabolic effects such as lowering blood glucose and plasma cholesterol levels, while those derived from fungi and bacteria modulate the immune system and even are used as adjuvants in some vaccines. A previous study of our group showed that the ingestion of BGs isolated from *Saccharomices cerevisiae* at a dose of 30mg/kg of body weight promoted benefits in the control of alveolar bone resorption (ROA) and metabolic parameters simultaneously in diabetic rats with periodontal disease (DP) induced by ligature. This project aimed to evaluate the effects of treatment with different levels of BGs isolated from *Saccharomyces cerevisiae* on alveolar bone resorption and biochemical parameters in rats with DP. A total of 30 animals (N = 6 per group) were randomly distributed in five groups that received different doses of BGs (0mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg, 40mg/kg or 80mg/kg) by gavage for 28 days. DP was induced by ligature on the right and left first mandibular molars with cotton thread on the 14th day, remaining until the 28th, when the animals were euthanized. The evaluation of the progression of DP (alveolar bone resorption - ROA) was performed through morphometric analysis (direct using a magnifying glass), histometric (hematoxylin /eosin staining), loss of epithelial junction (PJE) through histometry. Serum levels of total cholesterol (CT), triacylglycerols (TAG) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-c) were also evaluated using colorimetric enzyme kits. Low and very low-density lipoprotein cholesterol values (LDL-c + VLDL-c) were calculated using the specific formula. The means obtained with each additional dose of BG were submitted to regression analysis and, later, compared to the control (0mg/kg) by Dunnett test at 5%. BG was efficient in reducing ROA in animals treated with 20mg/kg, 40mg/kg and 80mg/kg when compared to the control group ($p < 0.05$). The dose of 54mg/kg was identified as optimal. No significant changes were observed in PJE, levels of CT, TAG, HDL-c, and LDL-c + VLDL-c. It was concluded that doses above 20 mg/kg BG were effective in preventing the progression of PD without significant effects on metabolic parameters.

Keywords: Bone resorption. Periodontitis. Prebiotics.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

- Figura 1** Representação esquemática do modelo experimental..... 33
- Figura 2** Análise morfométrica da reabsorção óssea alveolar de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias. A- JCE (Junção cimento esmalte), COA (Crista óssea alveolar); controle (0mg/Kg); B-(10mg/Kg); C- (20mg/Kg); D- (40mg/Kg); E- (80mg/Kg)..... 35
- Figura 3** Análise histométrica da reabsorção óssea alveolar de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias. A- JCE (Junção cimento esmalte), JE (Junção epitelial), COA (Crista óssea alveolar); controle (0mg/Kg); B-(10mg/Kg); C- (20mg/Kg); D- (40mg/Kg); E- (80mg/Kg). 36
- Figura 4** Curva dose-resposta da variação morfométrica de reabsorção óssea alveolar média de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias..... 37
- Figura 5** Parâmetros histométricos e morfométricos de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias. A- Histometria; Reabsorção óssea alveolar; B- Morfometria; Reabsorção óssea alveolar; C- Histometria; Perda de junção epitelial * Difere do controle (0mg/Kg) pelo teste Dunnett (P<0,05)..... 37
- Figura 6** Parâmetros bioquímicos de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias. D- Triacilgliceróis; E- Colesterol total; F- Lipoproteína de alta densidade (HDL-c); G- Lipoproteína de baixa densidade (LDL-c)+ Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c)..... 38

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

Tabela 1	Distribuição dos grupos experimentais.....	32
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BG	β -glucana
BGs	β -glucanas
COA	Crista óssea alveolar
CT	Colesterol total
DP	Doença periodontal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HDL-c	<i>High Density Lipoprotein cholesterol</i> - colesterol de Lipoproteína de alta densidade
JCE	Junção cimento esmalte
LDL-c	<i>Low Density Lipoprotein cholesterol</i> - colesterol de Lipoproteína de baixa densidade
NK	<i>Natural killers</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PJE	Perda da junção epitelial
ROA	Reabsorção óssea alveolar
TAG	Triacilglicerois
TNF	Fator de necrose tumoral
VLDL-c	<i>Very Low Density Lipoprotein cholesterol</i> - colesterol de Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 β-glucanas.....	15
2.2 Doença periodontal.....	17
2.3 β-glucanas e doença periodontal.....	18
2.4 Modelos de indução.....	19
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
SEGUNDA PARTE- ARTIGO.....	28
ARTIGO 1- NÍVEIS DE β -GLUCANAS NO CONTROLE DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS.....	28
ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS.....	44

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As β -glucanas (BGs) são polissacarídeos constituídos de monômeros de D-glicose, unidos por ligações que podem variar de acordo com a sua fonte. Estes compostos correspondem a um grupo diversificado de moléculas cuja massa molecular, solubilidade, viscosidade e configuração tridimensional são distintas, atribuindo características biológicas diversas (BALDASSANO; ACCARDI; VASTO, 2017). As principais fontes de BGs são as paredes celulares de fungos filamentosos e leveduras, algas, bactérias e plantas, diferenciando-se em sua estrutura (BREIVIK et al., 2005; MIURA et al., 2003). Aquelas encontradas em leveduras apresentam ligações do tipo β - (1,3) e β - (1,6) (DIJKGRAAF; LI; BUSSEY, 2002; SAMUELSEN; SCHREZENMEIR ; KNUTSEN, 2014) enquanto aquelas constituintes da parede celular de plantas apresentam ligações β - (1,3) e β - (1,4) (DAOU; ZHANG, 2012; MIRA; GRAF; CANDIDO, 2009).

BGs derivadas de plantas são conhecidas por apresentarem efeitos metabólicos. Esses efeitos são geralmente atribuídos à sua capacidade de agir diretamente no trato gastrointestinal, formando uma camada protetora, que reduz a absorção de carboidratos e lipídios (BALDASSANO; ACCARDI; VASTO, 2017; LOBATO et al., 2015). Em contraste, as fibras isoladas de leveduras parecem ser mais relacionadas à modulação da resposta imune. Aparentemente, elas podem modular o sistema imunológico estimulando a fagocitose e a produção de citocinas pró-inflamatórias (RUBIN-BEJERANO et al., 2007; VETVICKA, 2011). Uma vez que estimulam os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a doença em vez de atacar o agente infeccioso, estudos com BGs não apresentam relatos de efeitos tóxicos para as células do organismo hospedeiro (CHEN et al., 2011; TURMINA; CARRARO; CUNHA, 2012; ZEKOVIĆ et al., 2005).

Entre as doenças inflamatórias de potencial efeito das BG está a doença periodontal (DP), que é definida como processo inflamatório que ocorre ao longo da margem gengival e demais tecidos de suporte dos dentes, em resposta a presença de antígenos bacterianos do biofilme oral (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY- AAP, 2015; PARK et al., 2016). A DP é a principal causa de perda dentária em adultos, sendo considerada um problema mundial de saúde pública (MORO et al., 2018), acometendo tanto humanos como animais (ADLER et al., 2016; BUTKOVIĆ et al., 2001; KORTEGAARD; ERIKSEN; BAEUM, 2014). Dentre os tratamentos convencionais preconizados estão a instrução de higiene oral com remoção mecânica de biofilmes, raspagem e alisamento radicular. No

entanto, alguns pacientes não respondem de maneira satisfatória e agentes terapêuticos adicionais como antibióticos (MORO et al. 2018; WANG et al., 2012), laser (ALMEIDA et al., 2007) e probióticos (FOUREAUX et al., 2014) tem sido investigados com efeitos promissores.

Em virtude do quadro inflamatório crônico comum, estudos têm demonstrado uma relação entre a DP e doenças como diabetes, artrite reumatoide, osteoporose (CHEN et al., 2013; LEE et al., 2015) e doenças cardiovasculares (FIGUERO et al., 2011; RATH et al., 2014; VELSKO et al., 2014). A DP é uma das complicações mais importantes do diabetes (KAWAMURA; MAGALHÃES, 2002), podendo ocasionar o agravamento do controle metabólico quando não tratada (WEHBA; RODRIGUES; SOARES, 2004). Além disso, apresenta-se como um potencial fator de risco para doenças coronarianas devido à influência direta de microorganismos ou de suas toxinas na formação de placas ateromatosas (BRODALA et al. 2005). Níveis séricos elevados de LDL-c também são um fator de risco para o desenvolvimento de placas ateromatosas. Neste contexto, as BGs possuem ação reconhecida na literatura por redução do colesterol total (CT) e triacilgliceróis (TAG) (ARAÚJO et al., 2017; DAOU; ZHANG, 2012). Adicionalmente, tem sido demonstrados efeitos benéficos na prevenção da reabsorção óssea alveolar em modelos animais (SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2015) através de ação antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante (PARK et al., 2016).

Em estudo prévio do nosso grupo, foi observado que a dose de 30mg/kg de produto comercial contendo BG foi capaz de reduzir significativamente a ROA em ratos (SILVA et al., 2015). Porém, até o presente momento é desconhecida a dosagem ideal para promover e/ou estimular maiores efeitos benéficos. Portanto, é imprescindível verificar como o uso da BG em diferentes concentrações pode afetar a progressão da DP a fim de relacionar seus mecanismos de ação frente à modulação do sistema imune e verificar a dose ideal capaz de promover maiores benefícios.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 β -glucanas

As BGs são polissacarídeos lineares, compostos por unidades de D-glicose, unidas por ligações do tipo β -(1,3) e β -(1,6) ou β -(1,3) e β -(1,4). Encontradas na composição estrutural das paredes celulares de fungos filamentosos e leveduras, algas, bactérias e plantas, diferenciam-se apenas em sua estrutura (MIURA et al., 2003). De acordo com o tipo de ligação molecular, sua capacidade de adsorção de água pode variar, influenciando na sua viscosidade (MIRA; GRAF; CANDIDO, 2009). Atribui-se à BG uma atividade prebiótica devido a sua capacidade de resistência à digestão, fermentabilidade e favorecimento do crescimento e atividade de bactérias benéficas como *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp* (YANG et al., 2015). Neste contexto, são importantes fontes de BG as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (DIJKGRAAF; LI; BUSSEY, 2002).

Em estudo realizado por Andrade e colaboradores (2016) foram encontradas evidências que a associação da BG e exercício físico reduz a predisposição à aterosclerose, além de melhorar os níveis de lipoproteínas circulantes como colesterol (CT), *Low Density Lipoprotein cholesterol* (LDL-c) e *High Density Lipoprotein cholesterol* (HDL-c) através da diminuição da absorção de lipídeos (REYNA et al., 2003). Lobato et al. (2015) administraram doses de 30 mg/kg em animais com diabetes induzida por estreptozotocina e encontraram uma redução de 32% de TAG. A redução dos níveis de colesterol pelas BGs é explicada devido à sua viscosidade, que diminui a superfície de contato do conteúdo intestinal com os transportadores de membrana. Consequentemente há uma diminuição da absorção e reabsorção de gorduras, incluindo colesterol e ácidos biliares, aumentando a excreção desses componentes. Ocorre então um aumento da conversão hepática de colesterol em ácidos biliares, bem como o aumento dos receptores de LDL-c para restabelecer as concentrações de colesterol hepático, levando a uma diminuição dos níveis séricos de LDL-c (DAOU; ZHANG, 2012; OTHMAN; MOGHADASIAN; JONES, 2011).

Níveis séricos elevados de LDL-c também são um risco para desenvolvimento da placa aterosclerótica (VELSKO et al., 2014), sendo demonstrado que doses diárias de pelo menos 3 g de BG podem reduzir o CT e LDL-c tanto em indivíduos normocolesterolêmicos quanto hipercolesterolêmicos (OTHMAN; MOGHADASIAN; JONES, 2011). Recomenda-se então, o consumo dessas fibras solúveis para a redução do colesterol e consequentemente,

diminuição do risco de doença coronariana (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA, 1997).

Silva et al. (2017) em uma revisão, reportaram que BGs de levedura possuem maior atividade imunomodulatória, enquanto as presentes na estrutura de plantas e bactérias apresentam melhores efeitos sobre o metabolismo. Por se tratar de um polímero caracterizado como fibra solúvel, a BG é utilizada como tratamento alternativo no auxílio do controle glicêmico (ANDRADE et al., 2015; LOBATO et al., 2015; MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; SILVA et al., 2017), bem como na melhora da resposta insulínica (TOSH, 2013). Além disso, possui efeitos na atividade imunomodulatória (CHEN; ZHANG; JIANG, 2013; SILVA et al., 2017), antitumoral (MASUDA et al., 2015), hipocolesterolêmica (ANDRADE et al., 2015; ARAÚJO et al., 2017; CHOI et al., 2010) e como adjuvante de vacinas. Neste último caso, a combinação do antígeno e adjuvante pode auxiliar tanto na melhoria da resposta imunológica inata quanto na resposta imune adaptativa (CORDEIRO; ALONSO; DE LA FUENTE, 2015; WANG et al., 2016). Assim, o efeito imunomodulador das BGs está relacionado tanto à imunidade humoral, quanto imunidade celular (KUBALA et al., 2003; TOKUNAKA et al., 2002).

A capacidade do sistema imunológico de identificar e responder a uma infecção depende do reconhecimento de estruturas microbianas altamente conservadas, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores da família *toll* localizados principalmente na superfície de macrófagos e células dendríticas. Em geral, PAMPs são componentes microbianos não mutáveis essenciais, encontrados em grupos de organismos relacionados, como o lipopolissacarídeo em bactérias Gram-negativas e BGs em fungos (TSONI; BROWN, 2008). Segundo Magnani e Castro-Gomes (2008), inúmeros receptores estão relacionados ao reconhecimento da BG em vertebrados, incluindo Dectina-1, Receptor do Sistema Complemento 3 (CR3), lactosilceramida e *scavenger*. Aparentemente, as respostas são mediadas pela combinação destes receptores (BATTLE et al., 1998), porém, o papel melhor esclarecido é o da Dectina-1.

A BG atua nos mecanismos de defesa do organismo (KIM et al., 2006) através da ativação da resposta imune via sistema complemento, diretamente, ou através de anticorpos que produzem substâncias químicas induzindo a migração de leucócitos para o local da infecção (NICHOLAS; SHAUN, 2001). Os mecanismos de ação da resposta desencadeada pela BG englobam ainda o estímulo da hematopoiese (HOFER; POSPISIL, 1997), ativação de macrófagos, neutrófilos (LEE et al., 2001) e de células *natural killers* (NK) (XIAO; TRINCADO; MURTAUGH, 2004). A ação imunomodulatória das BGs parece estar

relacionada ao tipo de ligação intermolecular, solubilidade em água e peso molecular (FREIMUND et al., 2003; KUBALA et al., 2003; MAGNANI; CASTRO-GOMES, 2008).

Ademais, não foram identificadas manifestações de toxicidade em decorrência da administração da fibra mesmo quando em grandes quantidades (CHEN et al., 2011; LOBATO et al., 2015; TURMINA; CARRARO; CUNHA, 2012), o que confere maior segurança na realização de estudos avaliando doses *versus* benefícios.

2.2 Doença periodontal

A DP é considerada uma inflamação crônica que afeta os tecidos de proteção e sustentação dos dentes como: gengiva, osso, cemento e ligamento periodontal (MICHAUD et al., 2007). Inicia-se o seu desenvolvimento com uma resposta inflamatória gengival frente à presença de microrganismos que formam o biofilme oral, evoluindo para a destruição de fibras de colágeno do ligamento periodontal. Ocorre então a formação de uma bolsa entre a gengiva e o dente, fato associado com perda de junção epitelial (PRESHAW et al., 2012). Se perpetuado, este processo inflamatório pode se estender profundamente nos tecidos, provocando a perda de suporte do tecido conjuntivo e osso alveolar, podendo eventualmente ocasionar perdas dentárias (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY- AAP, 2015; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

Classifica-se a periodontite como crônica geralmente quando sua progressão é lenta e acomete indivíduos adultos. Já a classificação como periodontite agressiva caracteriza evolução mais rápida, envolvendo geralmente pacientes jovens (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY- AAP, 2015). Segundo a Academia Americana de Periodontia (2015), na periodontite crônica, observa-se um ambiente complexo com maior diversidade de colônias bacterianas. Sua etiologia está relacionada à presença de biofilme microbiano variável na superfície dentária (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Campylobacter spp* entre outros) e a evolução clínica da doença está intimamente relacionada à resposta imunológica do hospedeiro (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY- AAP, 2015; KINANE; LAPIN, 2001). Na periodontite agressiva, a principal característica é uma rápida destruição óssea alveolar, envolvendo um número limitado de espécies de microrganismos, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e algumas populações de *Porphyromonas gingivalis*, havendo uma inconsistência entre a

quantidade do biofilme com a gravidade da destruição tecidual (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY- AAP, 2015).

Assim, a presença do biofilme é essencial para o início da doença, mas sua evolução clínica depende de interações patógeno-hospedeiro (RETTORI et al., 2012). Além disso, associa-se a forma grave da doença a fatores genéticos, idade avançada, tabagismo, diabetes mal controlada e alterações psicológicas tais como estresse e depressão (BREIVIK et al., 2005).

Os produtos bacterianos iniciam uma resposta localizada no tecido gengival, que envolve a ativação de células inflamatórias, liberação de prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e ativação de osteoclastos (BREIVIK et al., 1996), levando a reabsorção do osso de suporte alveolar, mobilidade e consequente perda dentária (SAVAGE et al., 2009).

De acordo com Silva et al. (2007), a resposta imunológica do hospedeiro à DP é frequentemente mediada por linfócitos T e B, macrófagos e neutrófilos. Estes são acionados a fim de produzir mediadores inflamatórios, incorporando citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas, metabólitos derivados do ácido araquidônico, além da ativação de osteoclastos, que contribuem para a ativação de diversas vias de degradação tecidual (MOUTSOPOULOS; MADIANOS, 2006).

Dentre as principais doenças crônicas sistêmicas, a DP apresenta-se como um potencial fator de risco para doenças coronarianas. Atribui-se este fato a influência da periodontite na formação de placas ateromatosas, explicada por algumas linhas investigativas como a indução da resposta inflamatória crônica provocada pela liberação de endotoxinas e/ou ação direta dos microorganismos (BRODALA et al. 2005).

Estudos confirmaram a presença de DNA de bactérias periodontais em placas ateromatosas coronarianas (SZULK et al., 2015), estabelecendo uma correlação entre o desenvolvimento desta doença à DP (FIGUERO et al., 2011; RATH et al., 2014; VELSKO et al., 2014). Porém há controvérsias (CAIRO et al., 2014; CHUKKAPALLI et al., 2017), sendo necessários mais estudos com metodologias de detecção padronizadas para estabelecer as relações de causa e efeito dessas doenças.

2.3 β -glucanas e doença periodontal

Na DP, as injúrias teciduais ocorrem tanto de maneira direta, pela ação de endotoxinas bacterianas, quanto indiretamente, através da ativação de células inflamatórias do hospedeiro (AKRAMAS et al., 2012). Busca-se então através de pesquisas, substâncias que modulem a

resposta imune, atenuando ou até mesmo prevenindo os danos causados pelos periodontopatógenos (BREIVIK et al., 2005).

A BG possui um efeito de modulação inflamatória, regulando a liberação de IL-10 e TNF- α de leucócitos, gerando um padrão que é mais protetor dos tecidos que suportam os dentes (AKRAMAS et al., 2012; BREIVIK et al., 2005; SILVA et al., 2017). O TNF- α pode agravar a periodontite em decorrência do estímulo a liberação de eicosanoides e citocinas como a IL-1 que ativa neutrófilos e macrófagos. Após esta ativação, ocorre maior síntese e liberação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, relacionados aos danos teciduais (KIM et al., 2012). Segundo Park et al. (2016), a BG foi capaz de reduzir a ROA em ratos através de ação antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidativa.

Akramas et al. (2012) realizaram um estudo *in vitro* utilizando leucócitos de pacientes com DP e mostraram que a BG influenciou de maneira dose dependente a secreção de citocinas. Neste estudo, os autores sugerem que a BG pode modular a inflamação pela capacidade de redução da produção de TNF- α induzida por bactérias periodontopatogênicas e suas toxinas, bem como pelo aumento da liberação de IL-10, que regula o processo inflamatório. A diminuição dos níveis séricos de TNF- α também foi observada em estudo realizado por Silva et al. (2017) utilizando ratos diabéticos e com DP. Kim et al. (2012) induziram DP através de ligadura em ratos e encontraram diminuição da ROA, TNF- α e IL-1 β nos grupos tratados com BG.

A descoberta de produtos alternativos naturais para modulação imunológica com o objetivo de minimizar a progressão da DP sem produção de efeitos indesejáveis são de interesse da saúde pública (ANDRADE et al., 2017; MESSORA et al., 2013; SILVA et al., 2015). Sendo assim, os estudos de alimentos com função prebiótica são altamente relevantes e apresentam grande potencial na aplicação como adjuvantes nos tratamentos clínicos de doenças crônicas e suas comorbidades.

2.4 Modelos de indução

Os modelos animais são uma alternativa para avaliação da progressão da DP, bem como dos efeitos decorrentes dos tratamentos de interesse, devido à semelhança na patogênese da doença observada em humanos (MOLON et al., 2014). Ademais, os ratos possuem características morfológicas periodontais e aspectos imunológicos similares entre mamíferos (CHANG et al., 2014), o que possibilita posterior extrapolação dos dados para outras espécies (MOLON et al., 2014).

Apesar das respostas observadas nos animais não serem idênticas às observadas no periodonto humano, estudos *in vivo* estão mais próximos de fornecer uma avaliação precisa do comportamento celular em comparação com modelos *in vitro*. Além disso, modelos utilizando roedores fornecem uma grande quantidade de informações sobre o processo de progressão da DP (GRAVES et al., 2008).

Estudos utilizando ratos e camundongos evidenciam a eficácia de vários modelos de indução da DP, destacando-se a injeção de patógenos locais (MOLON et al., 2014) ou de suas toxinas como lipopolissacarídeos (GUGLIANDOLO et al., 2017) e uso de ligadura por fio de algodão (BREIVIK et al., 2005; FOUREAUX et al., 2014; PARK et al., 2016). Segundo estudo realizado por Rogers et al. (2007), a injeção de LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans* induziu ROA e produção de citocinas pró-inflamatórias em ratos por oito semanas. Porém, em modelos de injeção de patógenos ou toxinas é necessária a reaplicação semanal para manutenção do estímulo. Já no modelo de indução por ligadura, o estímulo é constante, ocorrendo perda óssea a partir de sete dias (MOLON et al., 2014) sem necessidade de submeter os animais várias vezes a anestesia (GRAVES et al., 2008).

Caracteriza-se a DP induzida por ligadura pelo acúmulo de biofilme, deslocamento da crista gengival, aumento da proliferação epitelial subjacente ao tecido conjuntivo e infiltrado mononuclear inflamatório (ALMEIDA et al., 2007). Molon et al. (2014) verificaram em estudo realizado com camundongos que o modelo de ligadura induziu uma resposta inflamatória consistente com a doença observada em humanos nos períodos de 7, 15, e 30 dias. Adicionalmente, este modelo tem sido utilizado com sucesso em diversos estudos (BREIVIK et al., 2005; HOLZHAUSEN et al. 2002; KIM et al., 2012; SILVA et al., 2015).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a associação da DP a várias doenças inflamatórias crônicas, tornam-se necessários estudos com alternativas terapêuticas que promovam efeitos benéficos sem promover efeitos indesejáveis.

As BGs são consideradas substâncias funcionais na modulação imunológica e metabólica. Porém, até o presente momento é desconhecida a dosagem ideal para promover e/ou estimular maiores efeitos benéficos. Além disso, o efeito dessas diferentes doses torna-se interessante, uma vez que a DP representa um problema de saúde pública gerando muitos gastos para o sistema.

REFERÊNCIAS

- ADLER, C. J. et al. Diet may influence the oral microbiome composition in cats. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 23, 2016.
- AKRAMAS, L. et al. Effect of (1→3),(1→6)- β -glucan on in vitro production of cytokines by leukocytes of patients with periodontitis. **Medicina**, v. 48, n. 4, p. 186-191, 2012.
- ALMEIDA, J. M. et al. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 78, n. 3, p. 566-575, Mar. 2007.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Task Force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. **Journal Periodontology**, 2015.
- ANDRADE, E. F. et al. Exercise Attenuates Alveolar Bone Loss and Anxiety-Like Behaviour in Rats with Periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. 1153-1163, 2017.
- ANDRADE, E. F. et al. Exercise and Beta-Glucan Consumption (*Saccharomyces cerevisiae*) Improve the Metabolic Profile and Reduce the Atherogenic Index in Type 2 Diabetic Rats (HFD/STZ). **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 792, 2016.
- ANDRADE, E.F. et al. Effect of beta-glucans in the control of blood glucose levels of diabetic patients: a systematic review. **Nutricion Hospitalaria**, v. 31, n. 1, p. 170-7, 2015.
- ARAÚJO, T. V. et al. Effects of beta-glucans ingestion (*Saccharomyces cerevisiae*) on metabolism of rats receiving high-fat diet. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 101, n. 2, p. 349-358, 2017.
- BALDASSANO, S.; ACCARDI, G.; VASTO, S. Beta-glucans and cancer: the influence of inflammation and gut peptide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.
- BATTLE, J. et al. Ligand binding to the (1-3)- β -D-glucan receptor stimulates NF κ B activation, but not apoptosis in U937 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 249, n. 2, p. 499-504, 1998.
- BREIVIK, T. et al. Soluble β -1, 3/1, 6-glucan from yeast inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 4, p. 347-352, 2005.
- BREIVIK, T. et al. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. **European Journal of Oral Sciences**, v. 104, n. 4, p. 327-334, 1996.
- BRODALA, N. et al. Porphyromonas gingivalis bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 7, p. 1446-1451, 2005.
- BUTKOVIĆ, V. et al. Dental Diseases in Dogs: A Retrospective Study of Radiological Data. **Acta Veterinaria Brno**, v. 70, n. 2, p. 203-208, 2001.

- CAIRO, F. et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 6, p. 442-446, 2004.
- CHANG, C.Y. et al. Effect of paeonol on tissue destruction in experimental periodontitis of rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, Hackensack, v. 42, n. 2, p. 361–374, 2014.
- CHEN, J.; ZHANG, X. D.; JIANG, Z. The application of fungal beta-glucans for the treatment of colon cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 725-730, 2013.
- CHEN, H. H. et al. Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case–control study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 7, p. 1206-1211, 2013.
- CHEN S. N. et al. Safety assessment of mushroom β -glucan: Subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2890-2898, 2011.
- CHOI, J.S. et al. Consumption of barley β -glucan ameliorates fatty liver and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 7, p. 1004-1013, 2010.
- CHUKKAPALLI, S. S. et al. Sequential colonization of periodontal pathogens in induction of periodontal disease and atherosclerosis in LDLRnull mice. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 1, 2017.
- CORDEIRO, A.S.; ALONSO, M.J.; DE LA FUENTE, M. Nanoengineering of vaccines using natural polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1279-1293, 2015.
- DAOU, C.; ZHANG, H. Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 4, p. 355-365, 2012.
- DIJKGRAAF, G.J.P; LI, H.; BUSSEY, H. Cell-Wall Beta-Glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biopolymers Online**, 2002.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, HHS et al. Food labeling: health claims; soluble fiber from certain foods and risk of coronary heart disease. Interim final rule. **Federal Register**, v. 73, n. 37, p. 9938, 2008.
- FIGUERO, E. et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 10, p. 1469-1477, 2011.
- FOUREAUX, R. D. C. et al. Effects of Probiotic Therapy on Metabolic and Inflammatory Parameters of Rats With Ligature-Induced Periodontitis Associated With Restraint Stress. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 7, p. 975-983, 2014.
- FREIMUND, S. et al. A new non-degrading isolation process for 1, 3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 2, p. 159-171, 2003.

GRAVES, D. T. et al. The use of rodent models to investigate host–bacteria interactions related to periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 2, p. 89-105, 2008.

GUGLIANDOLO, E. et al. Anti-inflammatory effect of ATB-352, a H₂S– releasing ketoprofen derivative, on lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. **Pharmacological Research**, 2017.

HOFER, M.; POSPÍŠIL, M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors' results. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, n. 9-10, p. 607-609, 1997.

HOLZHAUSEN, M. et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 9, p. 1030-1036, 2002.

KAWAMURA J.Y.; MAGALHÃES M.H.C.G. Avaliação clínica, radiográfica e imunohistoquímica da doença periodontal em pacientes portadores de diabetes mellitus do tipo 1. **RPG revista pós-graduação**, v. 12, n. 3, p. 301-307, 2005.

KIM, Y. S. et al. Effects of Polycan, a β -glucan, on experimental periodontitis and alveolar bone loss in Sprague-Dawley rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 6, p. 800-810, 2012.

KIM, S. Y. et al. Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. **Journal Korean of Medical Science**, v. 21, n. 10, p. 781-789, 2006.

KINANE, D. F., STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Panos N. Authors' reply: Predictive diagnostic tests in periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17070, 2017.

KINANE D. F.; LAPPIN D. F. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 59, n. 3, p. 154-160, 2001.

KORTEGAARD, H. E.; ERIKSEN, T.; BAELUM, V. Screening for periodontal disease in research dogs-a methodology study. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 77, 2014.

KUBALA, L. et al. The effect of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 24, p. 2835-2840, 2003.

LEE, J. H. et al. Association of lifestyle-related comorbidities with periodontitis: a nationwide cohort study in Korea. **Medicine Baltimore**, v. 94, n. 37, p. e1567, Sept. 2015.

LEE, J. et al. Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 4, p. 837-841, 2001.

LOBATO, R. V. et al. Metabolic effects of β -glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) per os administration in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Nutricion Hospitalaria**, v. 32, p. 256-264, 2015.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. Beta-glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MASUDA, Y. et al. Soluble β -glucan from *Grifola frondosa* induces tumor regression in synergy with TLR9 agonist via dendritic cell-mediated immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. 6, p. 1015-1025, 2015.

MESSORA, M. R. et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 12, p. 1818-1826, 2013.

MICHAUD, D.S. et al. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 2, p. 171-175, 2007.

MIRA, G.S.; GRAF, H.; CANDIDO, L.M.B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 11-20, Mar. 2009

MIURA, N. N. et al. Structure and Biological Activities of β -Glucans from Yeast and Mycelial Forms of *Candida albicans*. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 3, p. 173-182, 2003.

MOLON, R. S. et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 3, p. 465-477, 2014.

MORO, M. G. et al. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. **Journal of Periodontal Research**, 2018.

MOUTSOPOULOS, N. M.; MADIANOS, P. N. Phoebus N. Low-Grade Inflammation in Chronic Infectious Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1088, n. 1, p. 251-264, 2006.

NICHOLAS, J. C.; SHAUN, R. M. C. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, n. 8, p. 5176-5182, 2001.

OTHMAN, R. A.; MOGHADASIAN, M. H.; JONES, P. J. Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 6, p. 299-309, 2011.

PARK, S.-I. et al. The effects of topical application of polycal (a 2: 98 (g/g) mixture of polycan and calcium gluconate) on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 527, 2016.

PRESHAW, P. M. et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. **Diabetologia**, New York, v. 55, n. 1, p. 21-31, Jan. 2012.

- RATH, S. K. et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaque. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 259, 2014.
- REYNA, N.Y. et al. Sweeteners and beta-glucans improve metabolic and anthropometrics variables in well controlled type 2 diabetic patients. **American Journal of Therapeutics**, v. 10, n. 6, p. 438-443, 2003.
- RETTORI, E. et al. Anti-inflammatory effect of the endocannabinoid anandamide in experimental periodontitis and stress in the rat. **Neuroimmunomodulation**; v. 19, n.5, p.293-303, 2012.
- ROGERS, J.E. et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 3, p. 550-558, 2007.
- RUBIN-BEJERANO, I. et al. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. **Cell Host Microbe**, v.2, n.1, p.55-67, 2007.
- SAMUELSEN, A. B. C.; SCHREZENMEIR, J.; KNUTSEN, S. H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 1, p. 183-193, 2014.
- SAVAGE, A. et al. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 36, n. 6, p. 458-467, 2009.
- SILVA, V. O. et al. Promising Effects of Beta-Glucans on Metabolism and on the Immune Responses: Review Article. **American Journal of Immunology**, v.13, n.1, p. 62.72, 2017.
- SILVA, V.d.O. et al. β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) reduce glucose levels and attenuate alveolar bone loss in diabetic rats with periodontal disease. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. e0134742, 2015.
- SILVA, T.A. et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 4, p. 306-319, 2007.
- TOKUNAKA, K. et al. Application of Candida solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 1, p. 59-67, 2002.
- TOSH, S. M. Review of human studies investigating the post-prandial blood-glucose lowering ability of oat and barley food products. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 4, p. 310-317, 2013.
- TSONI, S. V.; BROWN, G. D. β -Glucans and Dectin-1. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, n. 1, p. 45-60, 2008.

TURMINA, J.A.; CARRARO, E.; CUNHA, M.A.A. Toxicological Assessment of β -(1 \rightarrow 6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14298-14309, 2012.

VELSKO, I. M. et al. Active invasion of oral and aortic tissues by *Porphyromonas gingivalis* in mice causally links periodontitis and atherosclerosis. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97811, 2014.

VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 2, n. 2, p. 115-9, 2011.

WANG, Y. J. et al. Lipid oxidation induced oxidative degradation of cereal beta-glucan. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1324-1330, 2016.

WANG, A. et al. Application of electrospun Poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate]-Ecoflex mats in periodontal regeneration: a primary study. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMEDICAL ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY**, 2012, Macau.

WEHBA, C.; RODRIGUES, A. S.; SOARES, F. P. Diabetes e DP: uma relação bidirecional. Brunette CM. **Periodontia Médica: Uma abordagem integrada**. São Paulo: Senac, p. 172-95, 2004.

XIAO, Z.; TRINCADO, C.A.; MURTAUGH, M.P. β -Glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 102, n. 3, p. 315-320, 2004.

YANG, G. et al. Intestinal microbiota and immune related genes in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) response to dietary β -glucan supplementation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 1, p. 98-103, 2015.

ZEKOVIĆ, D. B. et al. Natural and modified (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans in health promotion and disease alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 205-230, 2005.

SZULC, M. et al. Presence of periodontopathic bacteria DNA in atheromatous plaques from coronary and carotid arteries. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

**ARTIGO - NÍVEIS DE β -GLUCANAS NO CONTROLE DA DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS**

Artigo redigido de acordo com as normas para submissão na revista
Journal of Periodontology.

(VERSÃO PRELIMINAR)

Resumo

Objetivo: Avaliar os efeitos do tratamento com diferentes níveis de β -glucanas (BGs) isoladas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a reabsorção óssea alveolar (ROA), perda de junção epitelial (PJE) e parâmetros bioquímicos de ratos com doença periodontal (DP) induzida por ligadura. **Métodos:** Foram utilizados 30 ratos Wistar, induzidos a DP através de protocolo de ligadura. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento. Os animais foram tratados com (0mg/Kg; 10mg/Kg; 20mg/Kg; 40mg/Kg ou 80mg/Kg) de BG, durante 28 dias. A avaliação da progressão da DP (ROA) foi realizada através de análise morfométrica e histométrica, sendo este último método também utilizado para avaliar a perda de junção epitelial (PJE). Os níveis séricos de colesterol total (CT), triacilgliceróis (TAG), *High Density Lipoprotein cholesterol* (HDL-c) foram mensurados por kits colorimétricos enzimáticos e os valores de *Low Density Lipoprotein cholesterol* + *Very Low Density Lipoprotein cholesterol* (LDL-c +VLDL-c) foram calculados. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade, homocedasticidade e independência dos erros. Em seguida, análise de variância foi realizada. As médias obtidas com cada dose suplementar de BG foram submetidas à análise de regressão e, posteriormente, comparadas ao controle (0mg/Kg) pelo teste Dunnett a 5%. **Resultados:** A β -glucana foi eficiente em reduzir a reabsorção óssea alveolar nos animais tratados com 20mg/Kg, 40mg/Kg e 80mg/Kg quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Foi estimada uma dose ótima de 54mg/Kg pelo modelo de regressão. Não foram observadas alterações significativas na PJE, níveis de CT, TAG, HDL-c e LDL-c +VLDL-c. **Conclusão:** O uso de β -glucanas de *Saccharomyces cerevisiae*, em doses superiores a 20mg/Kg reduziu a perda óssea alveolar em ratos Wistar com doença periodontal, sendo a dose ótima estimada em 54mg/Kg.

Palavras-chave: Periodontite. Prebióticos. Reabsorção óssea.

Introdução

A doença periodontal (DP) é definida como um processo inflamatório que ocorre ao longo da margem gengival e demais tecidos de suporte dos dentes em resposta a presença de antígenos bacterianos do biofilme oral^{1, 2}. Trata-se da principal causa de perda dentária em adultos, sendo considerada um problema mundial de saúde pública³. O desenvolvimento da DP ocorre através de uma resposta localizada no tecido gengival iniciada por produtos bacterianos, que envolve a ativação de células inflamatórias, liberação de prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e ativação de osteoclastos⁴, levando à reabsorção do osso de suporte alveolar, mobilidade e potencialmente à perda dentária⁵.

Tem sido demonstrado que a DP pode aumentar o risco de ocorrência de doenças inflamatórias crônicas como diabetes, artrite reumatoide, osteoporose^{6, 7} e doenças cardiovasculares⁸⁻¹⁰, sendo recomendado que medidas preventivas e tratamentos adequados sejam realizados. Dentre os tratamentos convencionais preconizados estão a instrução e higiene oral com remoção mecânica de biofilmes, raspagem e alisamento radicular. No entanto, alguns pacientes não respondem de maneira satisfatória e agentes terapêuticos como antibióticos^{3, 11}, laser^{12, 13} e probióticos¹⁴ tem sido investigados com resultados promissores.

Assim, a utilização de substâncias que atuam na modulação da resposta imune, atenuando ou até mesmo prevenindo os danos causados pelos periodontopatógenos tem sido investigada¹⁵⁻¹⁷. Neste contexto, as β -glucanas (BGs), que são polissacarídeos constituídos de monômeros de D-glicose, tem demonstrado efeitos benéficos na prevenção da reabsorção óssea alveolar (ROA) em animais com DP induzida^{2, 16, 18}.

As principais fontes de BGs são as paredes celulares de fungos, algas, bactérias e plantas, diferenciando-se em sua estrutura^{15, 19}. São encontradas principalmente na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, apresentando ligações do tipo β - (1,3) e β - (1,6)^{20, 21} e também são constituintes da parede celular de plantas, apresentando ligações β - (1,3) e β - (1,4)^{22, 23}.

Estudos sugerem que a BG possui um efeito de modulação inflamatória, regulando a liberação de IL-10 e TNF- α de leucócitos, levando a um padrão mais protetor dos tecidos que suportam os dentes^{15, 16, 24}. Além disso, as BGs possuem ação reconhecida na literatura por redução do colesterol total (CT), triacilglicerois (TAG)^{22, 25} e *Low Density Lipoprotein* (LDL)^{26, 27}, cujas alterações são consideradas fatores de risco para doenças cardiovasculares. Por ser uma alternativa no auxílio de tratamento da DP, com potencial de gerar benefícios simultâneos em parâmetros metabólicos, objetivou-se neste estudo avaliar os efeitos do tratamento com diferentes níveis de BGs isoladas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a ROA, PJE, CT, TAG, HDL-c e LDL-c +VLDL-c de ratos portadores de DP.

Material e métodos

Animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Lavras (UFLA, MG, Brasil) sob o protocolo n° 041/17. Um total de 30 ratos hígdidos, machos, adultos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, pesando de 260g a 320g, provenientes do Biotério Multiusuário da Universidade Federal de Lavras (UFLA) foi selecionado.

Os animais foram mantidos em caixas, sendo acondicionadas em sala climatizada, com temperatura constante de 23 ± 2 °C e ciclos claro-escuro de 12h. Ração comercial e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental. Os ratos foram divididos aleatoriamente, sendo acomodados três animais por caixa. Após um período de aclimação de sete dias, as caixas foram identificadas aleatoriamente, sendo definidos cinco grupos contendo seis animais em cada um (n=6) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais:

Grupos	N	Tratamento (dose única)
1	6	GCDP- Gavagem água filtrada
2	6	GDP- Gavagem 10mg/Kg/dia de BG
3	6	GDP- Gavagem 20mg/Kg/dia de BG
4	6	GDP- Gavagem 40mg/Kg/dia de BG
5	6	GDP- Gavagem 80mg/Kg/dia de BG

N= número de animais; GCDP = Grupo controle com doença periodontal; GDP= Grupo doença periodontal; BG= β -glucana

Administração da β -glucana

De acordo com o grupo experimental pertencente, os animais receberam diferentes doses de BG (0mg/Kg; 10mg/Kg; 20mg/Kg; 40mg/Kg ou 80mg/Kg) dissolvidas em 0,3 ml de água filtrada, através de gavagem uma vez ao dia, durante 28 dias seguidos (Tabela 1). Foi utilizada BG obtida da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, composta por: BG - min. 60,0%; Proteína bruta - máx. 8,0%; pH (solução 2%) 4,0-7,0; Cinza - Max.10.0g / 100g. Distribuição do tamanho de partícula: média - 41 μ m; <20 μ m 19%; 20 a 50 μ m 43%; 50 a 100 μ m 28%; 100–200 μ m 10%; > 200 μ m 0%.

Indução da doença periodontal

A DP foi induzida nos animais através de protocolo de ligadura com fio de algodão nos primeiros molares mandibulares direitos e esquerdos. Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (10mg/kg) e cetamina (80mg/kg) e após estabelecido o plano anestésico, receberam a ligadura de acordo com metodologia previamente descrita²⁸. Esta indução ocorreu no 14^o dia de experimento (t=14) (Figura1).

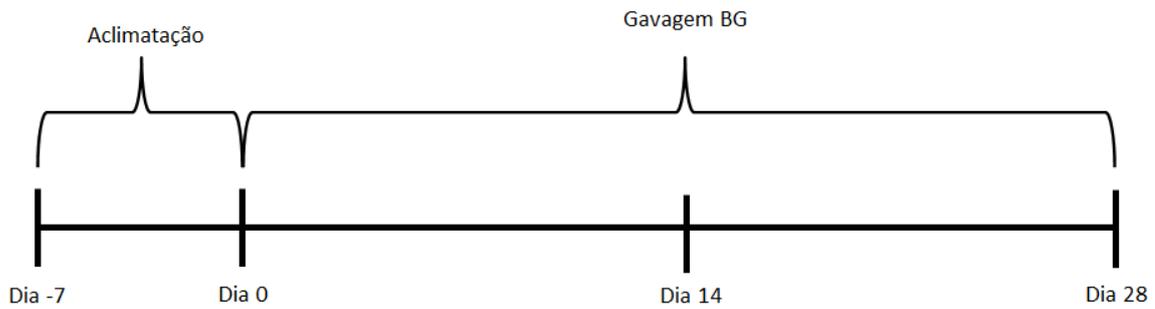


Figura 1. Representação esquemática do modelo experimental.

Coleta de material para análise

Ao final do experimento, os animais foram submetidos a jejum de oito horas e posteriormente, anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (10mg/kg) e cetamina (80 mg/kg). Após estabelecido o plano anestésico a eutanásia foi realizada através de punção cardíaca. Amostras de sangue foram coletadas para determinação das concentrações séricas de CT, HDL-c e TAG utilizando kits enzimáticos colorimétricos (Labtest®, Lagoa Santa-MG, Brasil). Os níveis de LDL-c +VLDL-c de cada animal foram obtidos através da seguinte equação: $CT - HDL-c = LDL-c + VLDL-c$ ²⁹. As hemimandíbulas direitas e esquerdas foram coletadas e armazenadas para realização de morfometria e histometria.

Análise morfométrica da reabsorção óssea alveolar

As hemi-mandíbulas direitas foram fixadas em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, foram imersas em peróxido de hidrogênio a 30% durante 2 horas para facilitar a remoção mecânica dos tecidos moles. Após a exposição óssea, realizou-se a coloração com Azul de metileno 1% durante um minuto para diferenciação óssea dos dentes e realce da junção cimento-esmalte (JCE). As mandíbulas foram observadas em lupa estereoscópica com uma câmera de vídeo acoplada a um computador e as imagens foram registradas com aumento de 20x e armazenadas. A distância entre a crista óssea alveolar (COA) e JCE (COA-JCE, mm) foi medida na face lingual segundo o método de Crawford³⁰ na metade de cada raiz do primeiro molar seguindo o eixo, utilizando o software de análise Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD,USA). As análises foram realizadas por um examinador treinado e desconhecedor dos grupos experimentais. A média das medidas foi utilizada para expressar a reabsorção óssea alveolar do animal.

Procedimentos histológicos e análise histométrica do tecido periodontal

As hemimandíbulas esquerdas foram coletadas e fixadas em formalina tamponada a 10% por 48 horas. As mesmas foram então dissecadas e lavadas em água, posteriormente foram colocadas em solução desmineralizante de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 18% até a completa descalcificação, processo que ocorreu após oito dias. Após a descalcificação, foi realizado o processamento conforme protocolo histológico e inclusão em parafina.

Foram realizados cortes seriados de aproximadamente cinco micrômetros de espessura. Posteriormente, foram corados com hematoxilina e eosina para análise por microscopia de luz. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera (SC30 CMOS Color Camera for Light Microscopy, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brazil) acoplada ao microscópio binocular Olympus CX31 (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brazil). As medidas foram realizadas utilizando software de análise de imagem Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). A perda da junção epitelial (PJE) foi calculada pela medida da distância em mm da JCE até a junção epitelial²⁸. Ademais, a ROA foi mensurada pela distância em mm entre a JCE até a COA entre o primeiro e o segundo molar mandibular³¹.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Anderson-Darling, homocedasticidade pelo teste de Breusch-Pagan e independência dos erros pelo teste de Durbin-Watson. Em seguida, análise de variância foi realizada. As médias obtidas com cada dose de BG foram submetidas à análise de regressão e, posteriormente, comparadas ao controle (0mg/Kg) pelo teste Dunnett a 5%. Todo procedimento estatístico foi realizado no programa estatístico Action versão 3.4.

RESULTADOS

Observou-se maior ROA nos animais não tratados (0mg/Kg) tanto na morfometria (Figura 2) quanto na histometria (Figura 3). O tratamento dos animais com doses de 40mg/Kg e 80mg/Kg reduziu a ROA significativamente em relação ao grupo sem ingestão de BG ($p < 0,05$) na análise morfométrica. Na análise histométrica, também foi encontrada menor ROA nos animais que receberam 20mg/Kg de BG quando comparados ao grupo controle (0mg/Kg) ($p < 0,05$). A partir dos valores obtidos na morfometria, foi realizada regressão com ajuste de dose ótima, cujo valor encontrado para prevenção da ROA foi de 54mg/Kg (Figura 4).

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de PJE (Figura 5), níveis de CT, TAG, HDL-c e LDL-c +VLDL-c (Figura 6).

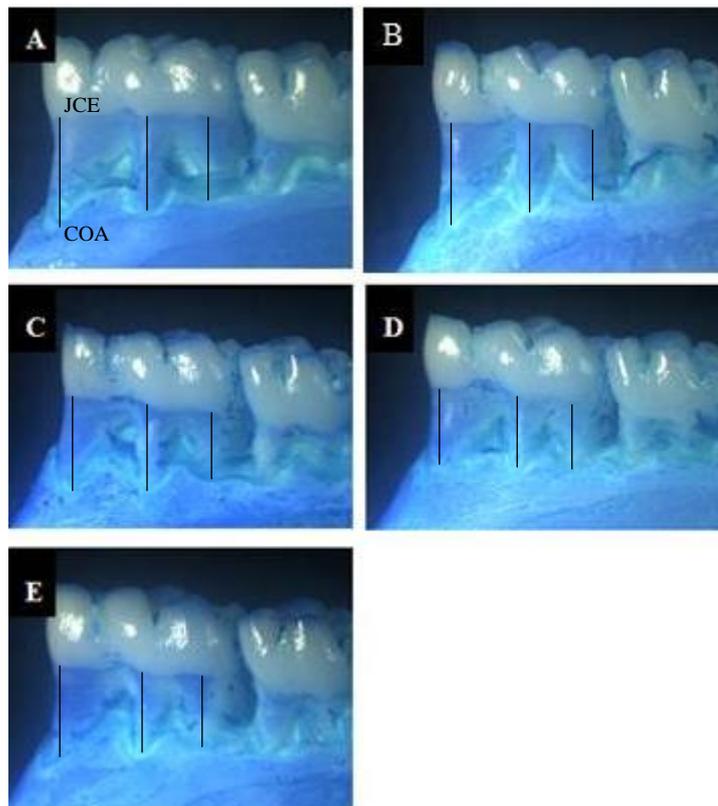


Figura 2: Análise morfométrica da reabsorção óssea alveolar de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias. A- JCE (Junção cimento esmalte), COA (Crista óssea alveolar); controle (0mg/Kg); B-(10mg/Kg); C- (20mg/Kg); D- (40mg/Kg); E- (80mg/Kg).

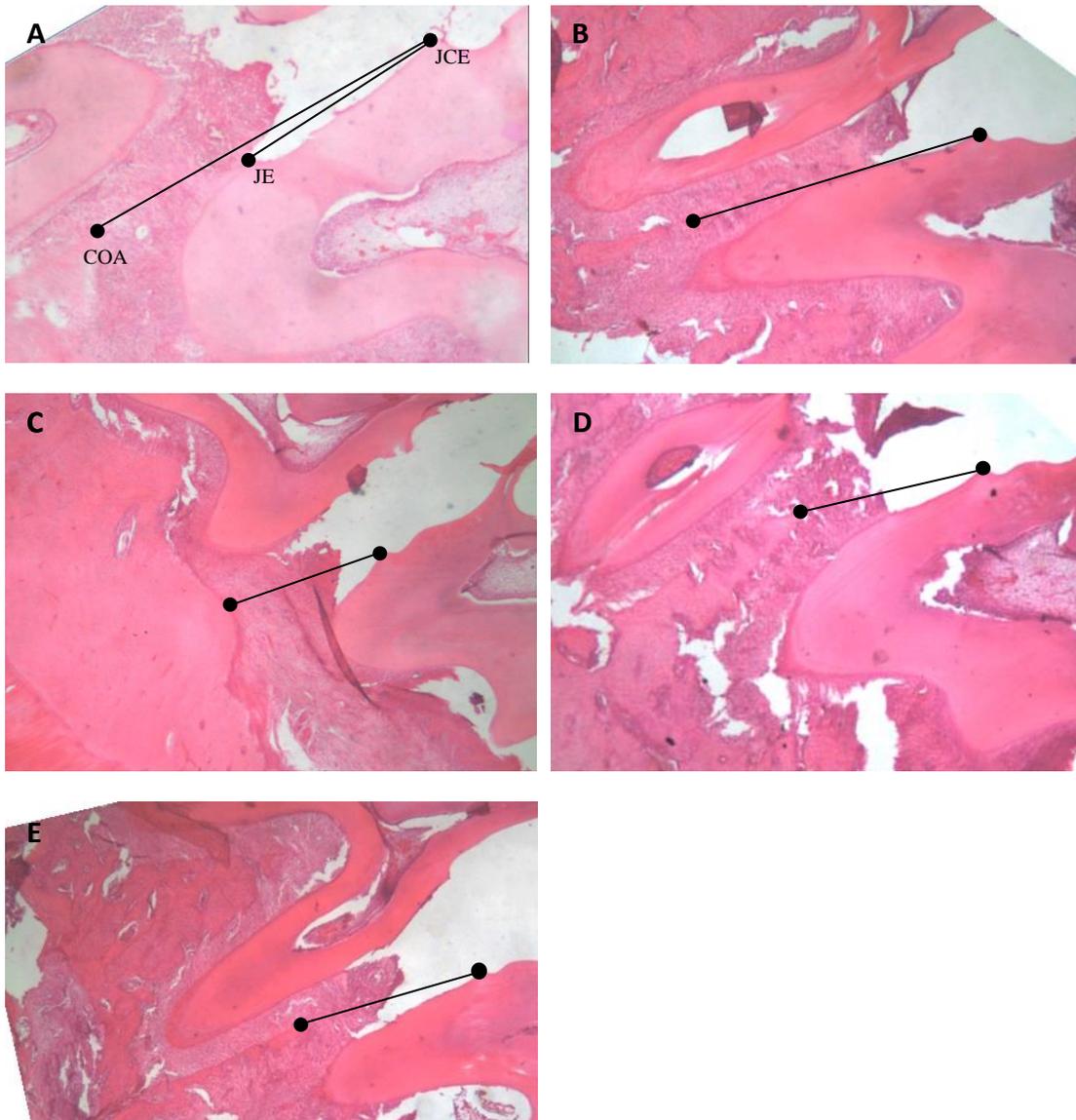


Figura 3: Análise histométrica da reabsorção óssea alveolar de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias. A- JCE (Junção cimento esmalte), JE (Junção epitelial), COA (Crista óssea alveolar); controle (0mg/Kg); B-(10mg/Kg); C- (20mg/Kg); D- (40mg/Kg); E- (80mg/Kg).

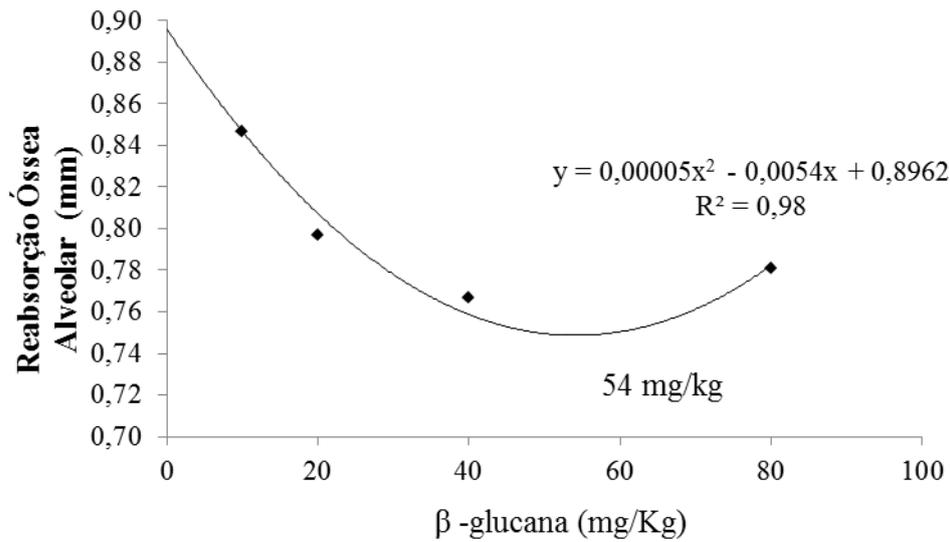


Figura 4. Curva dose-resposta da variação morfométrica de reabsorção óssea alveolar média de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias.

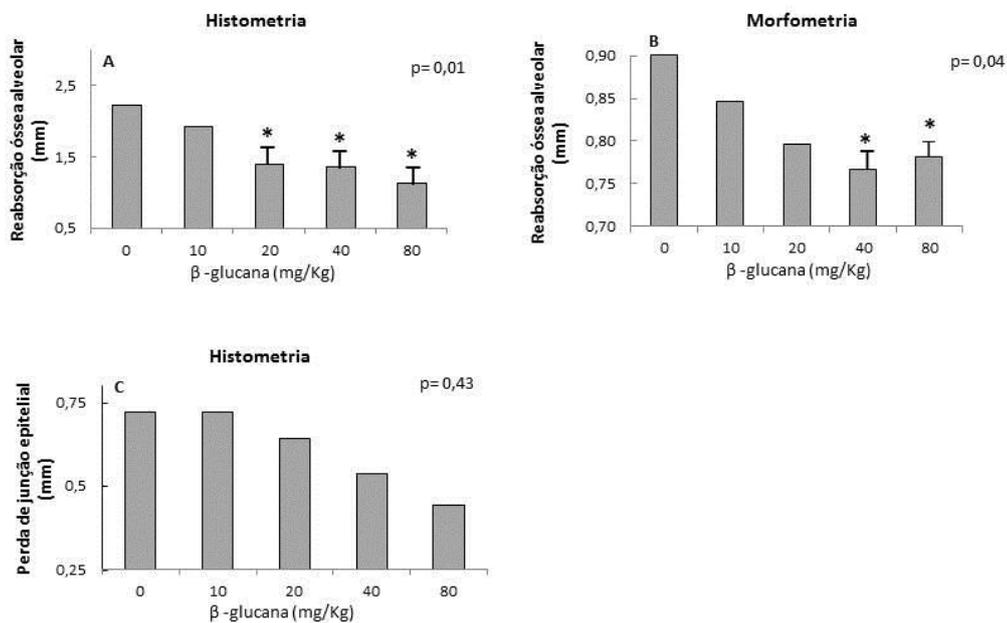


Figura 5. Parâmetros histométricos e morfométricos de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias. A- Histometria; Reabsorção óssea alveolar; B- Morfometria; Reabsorção óssea alveolar; C- Histometria; Perda de junção epitelial * Difere do controle (0mg/Kg) pelo teste Dunnnett ($P < 0,05$).

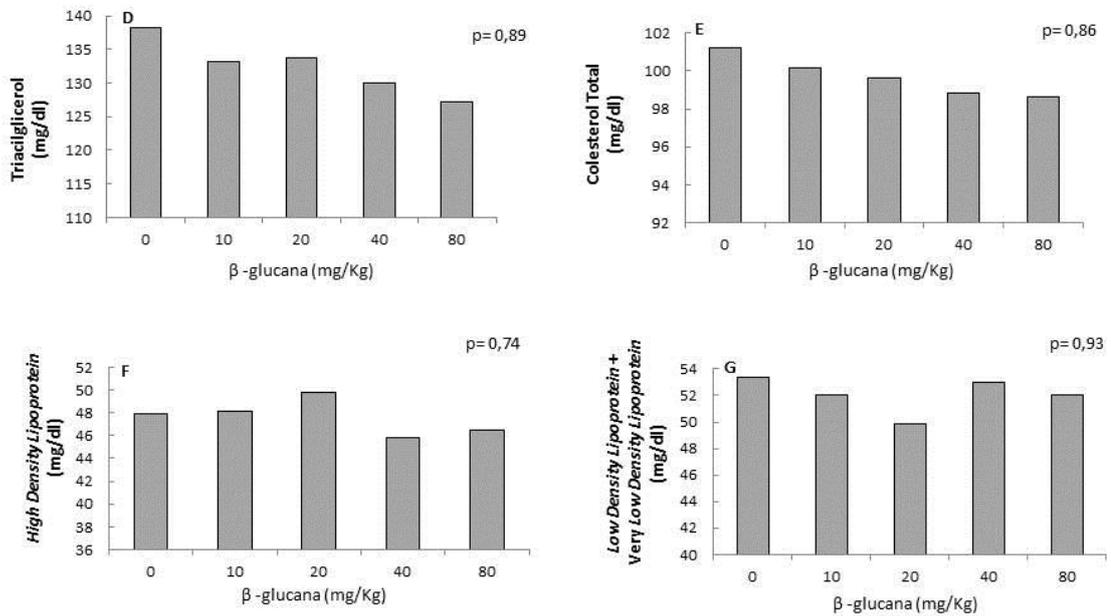


Figura 6. Parâmetros bioquímicos de animais com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com diferentes níveis de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 dias. D- Triacilgliceróis; E- Colesterol total; F- Lipoproteína de alta densidade (HDL-c); G- Lipoproteína de baixa densidade (LDL-c)+ Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c).

Discussão

Modelos de indução da DP utilizando ratos são bastante utilizados nas pesquisas, já que a morfologia periodontal desses animais é semelhante à observada em humanos. Um modelo experimental amplamente utilizado no estudo da DP é a ligadura ao redor dos dentes, pela sua praticidade, baixo custo e eficiência^{15, 18}.

Diversas metodologias têm sido utilizadas para avaliar a ROA em ratos. Dentre elas, as principais são a morfometria, histometria e radiometria^{32, 33}. Segundo Klausen³⁴, a morfometria apresenta-se como um excelente método para mensuração devido à possibilidade de avaliação direta dos tecidos. O método histométrico também é bastante utilizado, podendo fornecer informações associadas à perda de inserção epitelial causada pela DP, porém, apresenta desvantagens, porque o padrão de reabsorção óssea em periodontite não é uniforme.

Além disso, esta análise depende de um processamento criterioso, além de ser um processo mais caro e que demanda mais tempo³⁵.

De acordo com Fernandes e colaboradores³² e Foureaux e colaboradores³³, os resultados obtidos pela morfometria não diferiram daqueles obtidos pelo método histométrico. No presente estudo, observou-se maior ROA nos animais não tratados (0mg/Kg) quando comparados aos tratamentos com doses de 40mg/Kg e 80mg/Kg tanto na morfometria quanto na histometria. Todavia, contrastando com os estudos citados, na análise histométrica, também foi encontrada menor ROA dos animais que receberam 20mg/Kg de BG quando comparados ao grupo controle (0mg/Kg). Esta observação pode ser explicada pela diferença no padrão de progressão da doença encontrada na histometria^{35, 36}. Outra possibilidade seria uma possível variação, uma vez que as mandíbulas utilizadas para morfometria foram diferentes das utilizadas na análise histométrica. Para realização da morfometria é necessária a retirada dos tecidos moles, assim como a secagem e coloração das mandíbulas com azul de metileno, tornando inviável o seu uso para histometria, que possui um processamento diferente. Não foram encontrados estudos na literatura avaliando diferentes doses de BG e ROA através de dois métodos de mensuração. Com relação à PJE, foram observados menores valores nos animais que receberam tratamento com doses de 20mg/Kg, 40mg/Kg e 80mg/Kg, porém, não houve diferença significativa entre os grupos.

Devido a melhor visualização da ROA de maneira direta pela morfometria, estes resultados foram utilizados para o ajuste da regressão para determinação de dose ótima. O valor encontrado para prevenção da ROA foi de 54mg/Kg. Apesar de não serem encontrados estudos avaliando doses semelhantes às utilizadas na presente pesquisa, os resultados observados corroboram com os observados por Kim et al.¹⁷. Neste estudo, os autores avaliaram os efeitos da administração de 21,25; 42,5 e 85 mg/kg de Polycan (uma BG purificada de *Aureobasidium pullulans*) na ROA em ratos com DP induzida por ligadura, observando uma redução significativa nos animais tratados com as doses de 42,5 e 85 mg/kg de Polycan, porém sem estabelecer modelo de regressão ou dose ótima.

Com relação aos parâmetros metabólicos investigados, Wolever e colaboradores²⁷ em estudo realizado com humanos, observaram redução dos níveis séricos de LDL-c pela BG da aveia, tanto em indivíduos hipercolesterolêmicos quanto em normais. Porém, diversos estudos investigando o efeito de redução do colesterol pelas BG também não observam resultados significativos³⁷⁻³⁹. Possíveis justificativas envolvem o grau de solubilização das BG no intestino - relacionado ao seu peso molecular – além do tempo de administração necessário para observação de efeitos²⁷.

No presente estudo, não houve diferença significativa para os níveis de CT e LDL-c. Isto pode ser explicado de acordo com estudo de Vetvicka e Vetvickova⁴⁰, que avaliaram o efeito de diferentes fontes de BG nos níveis séricos de CT em cinco intervalos de tempo. Segundo os autores, foi observado efeito de redução do CT em camundongos normocolesterolêmicos somente a partir de cinquenta dias de administração de BG solúvel obtida de levedura. Não foram observadas alterações nos níveis de HDL-c, sendo este resultado desejável, uma vez que o HDL-c possui efeito de proteção contra doenças cardiovasculares regulando o efluxo de colesterol dos tecidos e modulando a inflamação⁴¹. Adicionalmente, não houve alteração nos níveis de TAG, corroborando com outras pesquisas realizadas em condições de normocolesterolemia^{27, 37, 38}.

As doses de BG utilizadas na literatura são muito variáveis. Em humanos, por exemplo, são encontrados valores de 0,1-20mg/Kg, enquanto em animais as doses podem variar de 10- 1250mg/Kg²¹. Portanto, a comparação de dosagens não é tão simples, uma vez que os efeitos das BGs variam de acordo com suas fontes, métodos de extração, peso molecular^{27, 42, 43} e até mesmo o tipo de cepa de *Saccharomyces cerevisiae* pode influenciar nos resultados²¹. Além disso, os parâmetros avaliados também diferem entre os estudos.

Não foram encontradas pesquisas na literatura avaliando diferentes doses de BGs obtidas de *Saccharomyces cerevisiae* e administradas via oral na progressão da DP em ratos ou camundongos. Os estudos encontrados utilizaram doses fixas^{16, 18}, outros tipos de BG^{2, 15, 17} ou outra via de administração². Sendo assim, tornam-se necessários mais estudos para determinação de níveis adequados específicos de acordo com a fonte de BG e efeitos desejados.

Conclusão

O uso de β -glucanas de *Saccharomyces cerevisiae*, em doses superiores a 20mg/Kg reduziu a perda óssea alveolar em ratos Wistar com doença periodontal, sendo a dose ótima estimada em 54mg/Kg.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *J Periodontol* 2015;86:835-838.
2. Park S-I, Kang S-J, Han C-H, et al. The effects of topical application of polycal (a 2: 98 (g/g) mixture of polycan and calcium gluconate) on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Molecules* 2016;21:527.
3. Moro M, Silveira Souto M, Franco G, Holzhausen M, Pannuti C. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. *Journal of periodontal research* 2018.
4. Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *European journal of oral sciences* 1996;104:327-334.
5. Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *Journal of clinical periodontology* 2009;36:458-467.
6. Chen H-H, Huang N, Chen Y-M, et al. Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case-control study. *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72:1206-1211.
7. Lee J-H, Lee J-S, Park J-Y, et al. Association of lifestyle-related comorbidities with periodontitis: a nationwide cohort study in Korea. *Medicine* 2015;94.
8. Figuero E, Sanchez-Beltran M, Cuesta-Frecho S, et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2011;82:1469-1477.
9. Rath SK, Mukherjee M, Kaushik R, Sen S, Kumar M. Periodontal pathogens in atheromatous plaque. *Indian journal of pathology & microbiology* 2014;57:259-264.
10. Velsko IM, Chukkapalli SS, Rivera MF, et al. Active invasion of oral and aortic tissues by Porphyromonas gingivalis in mice causally links periodontitis and atherosclerosis. *PLoS One* 2014;9:e97811.
11. Wang A, Gan Y, Qu J, Cheng B, Wang F, Yu H. Application of Electrospun poly [(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate]-Ecoflex Mats in periodontal regeneration: a primary study. In: *Biomedical Engineering and Biotechnology (iCBEB), 2012 International Conference on: IEEE, 2012:972-975.*
12. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of periodontology* 2007;78:566-575.
13. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Authors' reply: Predictive diagnostic tests in periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers* 2017;3:17070.
14. Foureaux RdC, Messora MR, Oliveira LFF, et al. Effects of Probiotic Therapy on Metabolic and Inflammatory Parameters of Rats With Ligature-Induced Periodontitis Associated With Restraint Stress. *Journal of periodontology* 2014;85:975-983.
15. Breivik T, Opstad PK, Engstad R, Gundersen G, Gjermo P, Preus H. Soluble β -1, 3/1, 6-glucan from yeast inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. *Journal of clinical periodontology* 2005;32:347-352.
16. de Oliveira Silva V, Oliveira de Moura N, Jahnel Rodrigues de Oliveira L, Paula Peconick A, Pereira L. *Promising Effects of Beta-Glucans on Metabolism and on the Immune Responses: Review Article*; 2017: 62-72.
17. Kim Y, Kang S, Kim J, et al. Effects of Polycan, a β -glucan, on experimental periodontitis and alveolar bone loss in Sprague-Dawley rats. *Journal of periodontal research* 2012;47:800-810.
18. de Oliveira Silva V, Lobato RV, Andrade EF, et al. β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) reduce glucose levels and attenuate alveolar bone loss in diabetic rats with periodontal disease. *PLoS one* 2015;10:e0134742.

19. Miura NN, Adachi Y, Yadomae T, Tamura H, Tanaka S, Ohno N. Structure and Biological Activities of β -Glucans from Yeast and Mycelial Forms of *Candida albicans*. *Microbiology and immunology* 2003;47:173-182.
20. Dijkgraaf GJ, Li H, Bussey H. Cell-Wall Beta-Glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biopolymers Online* 2002.
21. Samuelsen ABC, Schrezenmeir J, Knutsen SH. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review. *Molecular nutrition & food research* 2014;58:183-193.
22. Daou C, Zhang H. Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2012;11:355-365.
23. Mira GS, Graf H, Cândido LMB. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009;45:11-20.
24. Akramas L, Akramienė D, Sakalauskienė J, Kubilius R, Gleiznys A. Effect of (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)- β -glucan on in vitro production of cytokines by leukocytes of patients with periodontitis. *Medicina* 2012;48:186-191.
25. Araújo T, Andrade E, Lobato R, et al. Effects of beta-glucans ingestion (*Saccharomyces cerevisiae*) on metabolism of rats receiving high-fat diet. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 2017;101:349-358.
26. Othman RA, Moghadasian MH, Jones PJ. Cholesterol-lowering effects of oat beta-glucan. *Nutrition reviews* 2011;69:299-309.
27. Wolever TM, Tosh SM, Gibbs AL, et al. Physicochemical properties of oat β -glucan influence its ability to reduce serum LDL cholesterol in humans: a randomized clinical trial-. *The American journal of clinical nutrition* 2010;92:723-732.
28. Messori MR, Oliveira LF, Foureaux RC, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *Journal of periodontology* 2013;84:1818-1826.
29. Martinez-Flores HE, Chang YK, Martinez-Bustos F, Sgarbieri V. Effect of high fiber products on blood lipids and lipoproteins in hamsters. *Nutrition research* 2004;24:85-93.
30. Crawford JM, Taubman MA, Smith DJ. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *Journal of periodontal research* 1978;13:316-325.
31. Dai J, Ma Y, Shi M, Cao Z, Zhang Y, Miron RJ. Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. *Clinical oral investigations* 2016;20:581-588.
32. Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Brazilian oral research* 2007;21:216-221.
33. Foureaux RdC, Messori MR, Oliveira LFFd, et al. Comparação de métodos para mensuração da perda óssea alveolar periodontal em ratos submetidos a estresse. *Arquivos em Odontologia* 2014;50:185-192.
34. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *Journal of periodontology* 1991;62:59-73.
35. Semenoff TADV, Semenoff-Segundo A, Bosco ÁF, Nagata MJH, Garcia VG, Biasoli ER. Histometric analysis of ligature-induced periodontitis in rats: a comparison of histological section planes. *Journal of Applied Oral Science* 2008;16:251-256.
36. Klausen B, Evans RT, Sfintescu C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. *Scandinavian journal of dental research* 1989;97:494-499.
37. Chen J, He J, Wildman R, Reynolds K, Streiffer R, Whelton P. A randomized controlled trial of dietary fiber intake on serum lipids. *European journal of clinical nutrition* 2006;60:62.
38. Frank J, Sundberg B, Kamal-Eldin A, Vessby B, Åman P. Yeast-leavened oat breads with high or low molecular weight β -glucan do not differ in their effects on blood concentrations of lipids, insulin, or glucose in humans. *The Journal of nutrition* 2004;134:1384-1388.

39. Lobato RV, Silva VO, Andrade EF, et al. Metabolic effects of β -glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) per os administration in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nutricion hospitalaria* 2015;32:256-264.
40. Vetvicka V, Vetvickova J. PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF DIFFERENT TYPES OF β -GLUCAN. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc* 2007;151.
41. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nature Reviews Cardiology* 2011;8:222.
42. Kubala L, Ruzickova J, Nickova K, Sandula J, Ciz M, Lojek A. The effect of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. *Carbohydrate Research* 2003;338:2835-2840.
43. Magnani M, Castro-Gómez RJH. Beta-glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. *Semina: Ciências Agrárias* 2008;29:631-650.

ANEXOS

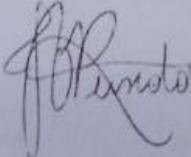
ANEXO A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Cx.P.3037 - Lavras – MG – 37200-000 – (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos dos níveis de β -glucana no controle do diabetes, doença periodontal e artrite reumatóide em ratos", protocolo nº 041/17, sob a responsabilidade de Luciano José Pereira, Andressa Naira de Jesus Pereira, Janina de Sales Guillarducci e Diana Vilela Azzi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 01/08/2017.

Vigência da autorização: de 01/09/2017 a 01/09/2019
 Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
 Espécie/linhagem/raça: Rato heterogênico / Wistar
 Número de animais aprovados: 140
 Peso/Idade: 100-150 g / 42 dias
 Sexo: macho
 Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA): Biotério Central Multiusuário da Universidade Federal de Lavras - Coordenadora: Prof^a. Christiane Malfitano.


 Prof. Juliano Vogas Peixoto
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
 Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
 Campus Universitário -
 Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 – Lavras, MG - Brasil
 Tel.: +55 (35) 3829 5182
 cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

ANEXO A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICATE

We certify that the proposal entitled "Effects of β -glucans levels in the control of diabetes, periodontal disease and rheumatoid arthritis in rats" Protocol No. 041/17, under the responsibility of Luciano José Pereira, Andressa Naira de Jesus Pereira, Janina de Sales Guillarducci and Diana Vilela Azzi, which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except man), for purposes of teaching and / or scientific research, is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8, 2008, Decree No. 6899 of July 15, 2009, and with the standards required by the National Council Animal Experimentation Control (CONCEA), the Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI), and was approved by ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE (CEUA) of the Dean of Research / UFLA in meeting 8/01/2017.

Authorization validity: 9/01/2017 to 9/01/2019

Finality: () Teaching (x) Scientific research

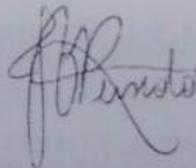
Species / strain / breed: Heterogenic rats / Wistar

Number of approved animals: 140

Weight / Age: 100-150 g / 42 days

Sex: male

Origin of animals (document presented by the responsible researcher and filed by CEUA): Biotério Central Multiusuário da Universidade Federal de Lavras - Coordenadora: Prof^a. Christiane Malfitano.



Prof. Juliano Vogas Peixoto
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prr.ufla.br