



VIVIAM DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITO DA INGESTÃO DE β -GLUCANOS EM
RATOS DIABÉTICOS COM DOENÇA
PERIODONTAL**

LAVRAS - MG

2015

VIVIAM DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITO DA INGESTÃO DE β -GLUCANOS EM RATOS DIABÉTICOS COM
DOENÇA PERIODONTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luciano José Pereira

Coorientadores

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

LAVRAS - MG

2014

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

Silva, Viviam de Oliveira.

Efeito da ingestão de β -glucanos em ratos diabéticos com
doença periodontal / Viviam de Oliveira Silva. – Lavras :
UFLA, 2015.

87 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador(a): Luciano José Pereira.

Bibliografia.

1. Inflamação. 2. Prebióticos. 3. Diabetes *mellitus*. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

VIVIAM DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITO DA INGESTÃO DE β -GLUCANOS EM RATOS DIABÉTICOS COM
DOENÇA PERIODONTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 09 de dezembro de 2014.

Dr. Raimundo Vicente de Sousa	UFLA
Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo	UFLA
Dra. Maria Cristina Mendes Costa	UNILAVRAS
Dr. Douglas Campideli Fonseca	UNILAVRAS

Dr. Luciano José Pereira
Orientador

LAVRAS - MG

2014

*A minha mãe Ana “In Memoriam”,
a dedicação a mim dispensada não terá sido em vão, você me cobriu de carinho
e me supriu de alimento e, principalmente, me ensinou a honestidade e a força
para o trabalho.*

e

*Aos meus irmãos Maraísa, Mario, Márcio e Marivaldo,
não encontro adjetivos para descrevê-los e nem tão pouco palavras para
agradecer tudo o que fazem por mim. Maiores exemplos. Meu coração é
incondicionalmente de vocês.*

DEDICO

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), na pessoa de seu Reitor Prof. Dr. José Roberto Soares Scolforo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade oferecida de realização do doutorado.

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), pelo apoio financeiro sem o qual não poderia ter concluído o doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano José Pereira, por ter me aceitado como orientanda. Agradeço pelo crescimento intelectual, profissional e pessoal. Obrigada por ter despertado em mim, através de seu exemplo, o prazer pela docência. Muito obrigada por me ajudar a realizar um sonho.

Ao coorientador Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, coordenador do curso de Pós-Graduação de Medicina Veterinária da UFLA, pela colaboração, conhecimentos transmitidos e amizade.

Ao coorientador Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa, Chefe do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, pela colaboração, amizade e por todos os ensinamentos desde o início da minha jornada na pós-graduação.

Ao coorientador estrangeiro Prof. Dr. Ramiro Mendonça Murata, da University of Southern California, por ter me aceitado no doutorado-sanduíche. Obrigada pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos e pela confiança. Agradeço muito a você e sua família por terem me acolhido nos EUA. Esse estágio foi de fundamental importância para a minha formação.

Às amigas queridas que me ajudaram a desenvolver esse trabalho, Edna Lopes, Raquel Vieira, Debora Orlando, Renata Foureaux, Karen Lisenko,

Raquel Pereira, Ticiane Vasques, Andressa Pereira, Ingrid Nunes, Isabela Peixoto e Nubia Ferreira.

Ao meu querido amigo Eric, pelo auxílio na execução dos experimentos, pela colaboração, amizade e pela convivência mais que divertida.

Aos amigos Willian, técnico do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia; Marcos, do Laboratório de Anatomia e Fidelis do Biotério Central da UFLA.

Aos professores, técnicos e alunos de todos os Programas de Pós-Graduação, Departamentos e Setores da UFLA que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA que contribuíram para minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga e às Pós-graduandas Cristina Macedo e Fabiana Furtado, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pela colaboração, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga e à técnica de laboratório Jeruza Bossonaro, da Faculdade São Leopoldo Mandic, pelo apoio e colaboração.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Maria Cristina Mendes Costa e Prof. Dr. Douglas Campideli Fonseca por terem aceitado o convite e por colaborarem com o aprimoramento desse trabalho.

A minha mãe Ana “*In Memoriam*”, por ter me ensinado a seguir em frente nos momentos de dificuldade. Por seu exemplo de dedicação, força e fé. Por ter me ensinado o que é mais precioso na pessoa humana: a educação.

Aos meus irmãos, Maraísa, Mário, Márcio e Marivaldo, pelo grande exemplo de retidão e honestidade. Obrigada pela compreensão, incentivo e apoio

incondicional em todos os momentos da minha vida, sem vocês eu nunca teria chegado até aqui.

Aos meus sobrinhos, Danubia, Susana e Pedro, ter vocês por perto faz minha vida mais feliz. Amo vocês profundamente.

Aos meus cunhados, Antônio, Agda e Rosi, pela amizade e por saber que posso contar com vocês.

À Biga e Lex pelos momentos de descontração, pelo companheirismo e por nunca reclamarem pelas inúmeras vezes que, pela correria, esqueci de colocar a ração na hora certa.

Ao meu grande amigo e compadre Nelson, obrigada pelo carinho, amizade e conselhos. Você é um dos meus exemplos de dedicação à profissão.

A minha querida amiga Rojana, você sempre será parte das minhas conquistas. Muito obrigada por tudo que você fez por mim.

As minhas queridas amigas Ariane, Debora e Maiara por deixarem minha caminhada mais leve e divertida. Mesmo muitas vezes ausente nunca deixo de pensar em vocês.

E SOBRETUDO, agradeço a Deus por me conceder esperança, saúde e perseverança para empreender este trabalho. Agradeço por todos os obstáculos, dificuldades e até as grandes dores que colocaste em meu caminho, pois logo em seguida me deste força e coragem para superá-los. Agradeço a Deus pelas atribulações que foram reservadas para minha vida, delas vieram o verdadeiro crescimento.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que encontra o conhecimento” (Provérbios 3.13)

RESUMO GERAL

A presente tese foi dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo, objetivou-se avaliar os efeitos do tratamento com β -glucanos de *Sacharomyces cerevisiae* sobre o perfil metabólico e parâmetros de perda óssea alveolar em ratos diabéticos com doença periodontal. Foram utilizados 48 ratos *Wistar*, induzidos a diabetes *mellitus* (estreptozotocina 80 mg/kg via intraperitoneal) e doença periodontal induzida por ligadura. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x2, com seis repetições por tratamento. Os animais foram tratados com β -glucanos, durante 28 dias. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (ANOVA - $p < 0,05$). O β -glucano reduziu a perda óssea alveolar em animais com doença periodontal tanto diabéticos quanto não diabéticos ($p < 0,05$). O β -glucano reduziu a glicemia, colesterol e os triacilgliceróis em animais diabéticos, tanto com doença periodontal como sem doença periodontal ($p < 0,05$). Em geral, o tratamento com β -glucanos reduziu a expressão de genes ciclooxigenase 2 e ligante do receptor do fator nuclear kappa β e aumentou a expressão gênica de osteoprotegerina nos animais com diabetes e doença periodontal. Concluiu-se que o tratamento com β -glucano promoveu efeitos metabólicos e periodontais benéficos em ratos diabéticos com doença periodontal. No segundo artigo, foi avaliada a perda óssea alveolar e a morfologia da mucosa intestinal por meio de avaliação histológica em ratos *Wistar* com doença periodontal induzida por ligadura, tratados com β -glucanos provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*. Foram utilizados 24 ratos *Wistar*, induzidos à doença periodontal através de protocolo de ligadura. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, com seis repetições por tratamento. Os animais foram tratados com 30 mg/kg/dia de β -glucanos, durante 28 dias. Foram coletados as mandíbulas e os fragmentos de cada segmento intestinal. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (ANOVA - $p < 0,05$). O β -glucano foi eficiente em reduzir a perda óssea nos animais com doença periodontal quando esses foram comparados aos que não receberam tratamento ($p < 0,05$). Os animais tratados com β -glucanos apresentaram maior altura de vilosidades no duodeno tanto em grupos com doença periodontal quanto em grupos sem a doença ($p < 0,05$). Profundidade de cripta foi menor no jejuno de animais com doença periodontal tratados com β -glucanos quando comparados aos animais não tratados ($p < 0,05$). A relação profundidade de criptas/altura de vilosidades foi maior no duodeno de animais com doença periodontal tratados com β -glucanos em relação aos não tratados ($p < 0,05$). Concluiu-se que o tratamento com β -glucanos reduziu a perda óssea alveolar em ratos com doença periodontal e aumentou a área de absorção no duodeno desses animais.

Palavras-chave: Inflamação. Prebióticos. Diabetes *mellitus*. Imunidade. *Sacharomyces cerevisiae*. Ratos.

GENERAL ABSTRACT

The present dissertation was divided into two chapters. In the first chapter, we aimed at evaluating the effects of the treatment with *Saccharomyces cerevisiae* β -glucans over the metabolic profile and alveolar bone loss parameters on diabetic rats with periodontal disease. We used 48 *Wistar* rats, induced to *mellitus* diabetes (streptozotocin 80 mg/kg via intraperitoneal) and periodontal disease induced by ligature. The design used was completely randomized in a 2x2x2 factorial scheme, with six replicates per treatment. The animals were treated with β -glucans during 28 days. The data obtained were submitted to statistical analysis (ANOVA - $p < 0.05$). The β -glucan reduced alveolar bone loss in animals with periodontal disease wither diabetic or not ($p < 0.05$). The β -glucan reduced blood glucose, cholesterol and triacylglycerols in diabetic animals, wither with periodontal disease or not ($p < 0.05$). In general, the treatment with β -glucans reduced the expression of cyclooxygenase 2 genes and ligands of the kappa β nuclear factor receptor and increased the gene expression of osteoprotegerin in the animals with diabetes and periodontal disease. We conclude that the treatment with β -glucan promoted beneficial metabolic and periodontal effects in diabetic rats with periodontal disease. In the second article, we evaluated alveolar bone loss and the morphology of the intestinal mucosa by means of histological evaluation on *Wistar* rats with periodontal disease induced by ligature, treated with β -glucans derived from *Saccharomyces cerevisiae*. We used 24 *Wistar* rats, induced to periodontal disease by means of ligature protocol. The design used was completely randomized in a 2x2 factorial scheme, with six replicates per treatment. The animals were treated with 30 mg/kg/day of β -glucans, during 28 days. We collected the jawbones and the fragments of each intestinal segment. The data obtained were submitted to statistical analysis (ANOVA - $p < 0.05$). The β -glucan was efficient in reducing bone loss in animals with periodontal disease when compared to those that did not receive the treatment ($p < 0.05$). The animals treated with β -glucans presented higher villus in the duodenum whither in groups with periodontal disease or in groups without the disease ($p < 0.05$). Crypt depth was smaller in the jejunum of animals with periodontal disease treated with β -glucans when compared to those not treated ($p < 0.05$). The crypt depth/villus height relation was larger in the duodenum of animals with periodontal disease treated with β -glucans in relation to those not treated ($p < 0.05$). We concluded that the treatment with β -glucans reduced alveolar bone loss in rats with periodontal disease and increased the area of absorption in the duodenum of these animals.

Keywords: Inflammation. Prebiotics. *mellitus* diabetes. Immunity. *Saccharomyces cerevisiae*. rats.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	1) Estrutura química de β -glucanos isolados de plantas com ramificações β (1- 4); 2) estrutura química de β -glucanos isolados de fungos com ramificações β (1- 6)	20
----------	---	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1:	Representação esquemática do delineamento experimental ao longo do tempo; ¹ Todos os animais foram acomodados em gaiolas metabólicas individuais e passaram por um período de aclimação de sete dias; ² Para os animais dos grupos diabetes, diabetes + doença periodontal, diabetes + β -glucano, diabetes + doença periodontal + β -glucano; ³ Para os animais dos grupos β -glucano, diabetes + β -glucano, doença periodontal + β -glucano, diabetes + doença periodontal + β -glucano; ⁴ Para os animais dos grupos doença periodontal, diabetes + doença periodontal, doença periodontal + β -glucano, diabetes + doença periodontal + β -glucano; ⁵ Coleta de amostras sanguíneas e remoção das mandíbulas.	64
------------------	--	----

Figura 2:	Perda óssea alveolar de animais tratados com β -glucanos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias; A - controle; B - diabetes; C - doença periodontal; D - β -glucano; E - diabetes + doença periodontal; F – diabetes + β -glucano; G - doença periodontal + β -glucano, H - diabetes + doença periodontal + β -glucano.....	65
------------------	--	----

ARTIGO 2

Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental ao longo do tempo; ¹Todos os animais serão acomodados em gaiolas metabólicas individuais e passarão por um período de aclimação de 7 dias; ²Para os animais dos grupos 2 e 4; ³Para os animais dos grupos 3 e 4; ⁴Remoção das mandíbulas e coleta de fragmentos do intestino - todos os grupos80

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Tabela 1:** Glicemia, colesterol total e triacilgliceróis (mg/dL / média $\pm$ desvio padrão) de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias51
- Tabela 2:** Expressão dos genes de COX-2, RANK-L e OPG (média $\pm$ desvio padrão) de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias52

ARTIGO 2

- Tabela 1 Avaliação histométrica da perda óssea (mm² - médias $\pm$ desvio padrão) de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias78
- Tabela 2 Altura de vilosidades (μ m - médias $\pm$ desvio padrão) do duodeno, jejuno e ílio de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias78
- Tabela 3 Profundidade de criptas (μ m - médias $\pm$ desvio padrão) do duodeno, jejuno e ílio de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias79

Tabela 4	Relação profundidade de criptas/altura de vilosidades (médias $\pm$ desvio padrão) do duodeno, jejuno e ílio de animais tratados com β -glucanos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias	79
----------	--	----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	β-glucanos	19
2.1.1	Atividade imunomodulatória dos β-glucanos	20
2.1.2	Atividade metabólica dos β-glucanos	21
2.2	Doença periodontal	22
2.2.1	Doença periodontal experimental	24
2.3	Diabetes <i>mellitus</i>	26
2.3.1	Modelo animal experimental de diabetes <i>mellitus</i> Tipo 1	28
2.4	Doença periodontal e diabetes <i>mellitus</i>	29
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
	REFERÊNCIAS	32
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	42
	ARTIGO 1 β-glucanos (<i>Sacharomyces cerevisiae</i>) reduzem níveis glicêmicos e atenuam a perda óssea alveolar em ratos <i>Wistar</i> diabéticos com doença periodontal	42
	ARTIGO 2 Efeito de β-glucanos sobre a perda óssea e morfologia intestinal de ratos submetidos à doença periodontal induzida por ligadura	66
	ANEXOS	81

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal e o diabetes *mellitus* são patologias que representam um dos principais problemas de saúde pública mundial e vem se agravando rapidamente especialmente nas nações em desenvolvimento. Ambas apresentam alta prevalência na população, são de etiologia multifatorial, apresentam características crônicas e evidências indicam uma relação bidirecional entre elas (CHAPPLE; GENCO, 2013; AL-KHABBAZ; AL-SHAMMARI, 2011; ISLAM, 2011).

No paciente diabético não compensado, a hiperglicemia resultante promove alterações vasculares (microangiopatias), fagocitose ineficaz pelos neutrófilos e macrófagos, além de lentificação da síntese de colágeno causando retardo na reparação tecidual (SILVA et al., 2012; DESHPANDE et al., 2010). Já nos pacientes com doença periodontal ativa, ocorre liberação crônica exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a ação da insulina e consequente agravamento das alterações metabólicas (KOROMANTZOS et al., 2011).

Desta forma, a investigação de novas formas de controle da doença periodontal para pacientes diabéticos é de interesse. O tratamento convencional da doença periodontal envolve a remoção do biofilme e diminuição do número de agentes bacterianos por meios físicos - raspagem e alisamento coronoradicular (CARVALHO et al., 2011; LOPES et al., 2010; ALMEIDA et al., 2007). Além disso, eventualmente podem ser empregados o uso de irradiação laser e fototerapia. Agentes químicos locais - clorexidina, óleos essenciais (KRAYER; LEITE; KIRKWOOD, 2010; HAFFAJEE et al., 2009) antibioticoterapia local ou sistêmica também têm sido empregadas de forma

complementar ao tratamento convencional. Entretanto, essas terapias apresentam efeitos indesejáveis como alteração do paladar e contribuem para a seleção de microrganismos resistentes (ALMEIDA et al., 2007; LÓPEZ; GAMONAL; MARTINEZ, 2000). Já o tratamento do diabetes *mellitus*, geralmente consiste de terapia médica nutricional, atividade física regular, insulino-terapia e/ou hipoglicemiantes orais - dependendo do tipo I ou II e do estágio da doença (PIRES; CHACRA, 2008; MALERBI et al., 2006).

Os β -glucanos têm sido empregados tanto como agentes moduladores da resposta imune como agentes anti-hiperglicemiantes. Estes são polissacarídeos provenientes da parede celular de uma variedade de plantas, fungos e algas que estimulam a fagocitose e a produção de citocinas pró-inflamatórias (VETVICKA, 2011; RUBIN-BEJERANO et al., 2007), e reduzem as concentrações de glicose no sangue (LO et al., 2006). O efeito acontece, uma vez que o β -glucano ocasiona a queda na absorção da glicose pelos enterócitos (PAULA et al., 2005), diminuindo a concentração de glicose sanguínea (REYNA et al., 2003), o que pode auxiliar no tratamento da diabetes *mellitus* (WÜRSCH; PI-SUNYER, 1997).

Adicionalmente, soluções de β -glucanos provenientes de fungos, quando administradas por via oral, reduziram a perda óssea alveolar em ratos com doença periodontal induzida por ligadura (BREIVIK et al., 2005).

Entretanto, os efeitos dos β -glucanos não foram avaliados em animais diabéticos com doença periodontal, e nem tampouco foram esclarecidos os mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

Desta forma, pesquisas envolvendo um mesmo princípio ativo capaz de modular a resposta inflamatória e concomitantemente controlar glicemia é de extremo interesse, especialmente sabendo-se que a doença periodontal é mais frequente e mais grave em pacientes com controle glicêmico inadequado (FRIEDLANDER, 2010). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o

efeito do uso de β -glucanos em ratos diabéticos submetidos à doença periodontal induzida por ligadura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 β -glucanos

Diversos compostos ricos em fibras são empregados como tratamento alternativo no controle da glicemia e na redução da resistência à insulina (TOSH, 2013; KING et al., 2005). Dentre eles destacam-se os β -glucanos que, além dos efeitos metabólicos, são amplamente utilizados como agentes imunomoduladores e antitumorais (SAMUELSEN; SCHREZENMEIR; KNUTSEN, 2014; HARNACK; ECKERT; PECHER, 2011; VETVICKA, 2011; SENER et al., 2006; CHEN; ZHANG; JIANG, 2013).

Os β -glucanos representam os principais componentes estruturais da parede celular de fungos (RAHAR et al., 2011), plantas (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008) e algumas bactérias (GACTO et al., 2000). Estes polissacarídeos possuem ações comprovadas sobre parâmetros metabólicos e imunológicos em doenças crônicas como, por exemplo, diabetes *mellitus* (RAHAR et al., 2011), dislipidemias (KING, 2005) e infecções (AKRAMIENE et al., 2007; SANDVIK et al., 2007).

A estrutura química dos β -glucanos possui uma ligação linear central β (1- 3) formada por unidades de glicose ligadas na cadeia principal, que se diferenciam conforme seu comprimento e ramificações (XIAO; TRINCADO; MURTAUGH, 2004; SONCK et al., 2010). Os β -glucanos isolados de plantas são lineares e possuem ramificações com ligações β (1- 4), enquanto as provenientes de fungos possuem ramificações com ligações β (1- 6). A posição de sua ramificação geralmente define a atividade biológica que o β -glucano irá desempenhar (RAHAR et al., 2011).

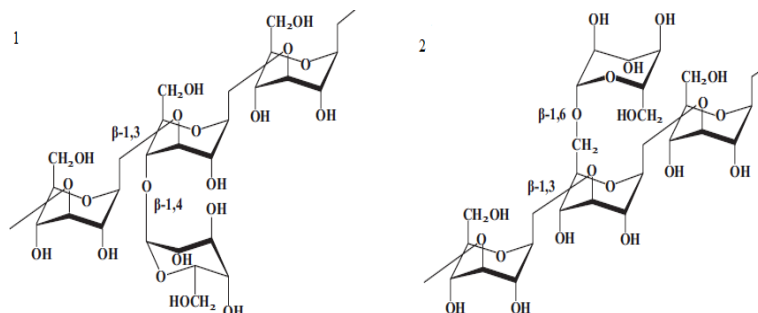


Figura 1 1) Estrutura química de β -glucanos isolados de plantas com ramificações β (1- 4); 2) estrutura química de β -glucanos isolados de fungos com ramificações β (1- 6)

Fonte: (RIBEIRO et al., 2009).

Em relação a sua toxicidade, β -glucanos administrados por via oral durante quatro semanas não demonstraram sinais de toxicidade, nem quando administrados em grandes quantidades (TÚRMINA et al., 2012; CHEN; ZHANG; JIANG, 2013).

2.1.1 Atividade imunomodulatória dos β -glucanos

Os β -glucanos provenientes da parede celular de fungos são polímeros lineares formados por unidades de glicose $\beta(1-3)$ -D-glucopiranosil com ramificações $\beta(1-6)$ de diferentes tamanhos que apresentam atividade imunomodulatória (SONCK et al., 2010; XIAO; TRINCADO; MURTAUGH, 2004).

A potência imunológica dos β -glucanos está associada à sua habilidade em ativar os leucócitos (SANDVIK et al., 2007) sendo atribuída e dependente da massa molecular, conformação, solubilidade e também do grau e posicionamento de suas ramificações. Em geral, tem-se sugerido que os β -glucanos de alto peso molecular (mais prevalentes na natureza) podem ativar

diretamente os leucócitos, estimulando suas funções fagocíticas, citotóxicas e atividade antimicrobiana (AKRAMIENE et al., 2007). Os β -glucanos de peso molecular intermediário possuem atividade biológica *in vivo*, porém seus efeitos celulares são menos evidentes, enquanto os de baixo peso molecular são geralmente considerados inativos (AKRAMIENE et al., 2007).

Os β -glucanos têm sido extensivamente usados auxiliando na proteção contra infecções. Em vários modelos experimentais, esses compostos têm mostrado proteção contra infecções por bactérias e protozoários, além de uma melhora da eficiência de antimicrobianos em infecções por bactérias resistentes (RICE et al., 2005). O efeito protetor dos β -glucanos foi demonstrado em infecções experimentais por *Leishmania major* e *L. donovani*, *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus suis*, *Plasmodium berghei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mesocystoides corti*, *Trypanosoma cruzi*, *Eimeria vermiciformis* e *Bacillus anthracis* (VETVICKA, 2011).

2.1.2 Atividade metabólica dos β -glucanos

A ação dos β -glucanos sobre o metabolismo ocorre principalmente devido às interações físico-químicas destas fibras com a digesta. Estes polissacarídeos formam uma camada gelatinosa que funciona como uma barreira que dificulta a absorção de carboidratos, levando assim a uma menor concentração de glicose no sangue. Essa função pode ser observada tanto em humanos quanto em animais (TAPPY; GUGOLZ; WURSCH, 1996; REYNA et al., 2003; LIATIS et al., 2009; CHOI et al., 2010; DONG et al., 2011).

Esta camada gelatinosa deve-se à viscosidade formada na luz intestinal que atua como uma peneira que filtra moléculas pequenas retardando a digestão e absorção de alguns nutrientes (RIBEIRO et al., 2009). Há também a hipótese de que esta camada gelatinosa atrase a interação do amido e sua enzima

digestiva causando a redução na absorção de carboidratos e, conseqüentemente, a redução da glicemia (BATTILANA et al., 2001).

Essa particularidade da fibra do β -glucanos decorre da sua propriedade físico-química (peso molecular e solubilidade), de sua predisposição à retenção de água, viscosidade, emulsificação, fermentabilidade, resistência à degradação por bactérias intestinais e a sua propensão à absorção de nutrientes (SCHNEEMAN, 1987).

De acordo com Lo et al. (2006) tanto os β -glucanos de aveia quanto os de fungos, quando fornecidos via oral, são capazes de reduzir a glicemia de roedores. O extrato aquoso de β -glucanos de *Agaricus blazei basidiocarpos* mostrou atividade anti-hiperglicemiante, anti-hipertrigliceridêmica, anti-hipercolesterolemica e antiarteriosclerótica em ratos diabéticos (KIM et al., 2005).

Ademais, há relatos de que as fibras como o β -glucanos reduzem o risco de doenças cardiovasculares e metabólicas através da mediação do processo inflamatório (LIU et al., 2002; LIU, 2003). As hipóteses destes mecanismos demonstram que os β -glucanos podem diminuir a oxidação de glicose e lipídeos promovendo um ambiente intestinal saudável, prevenindo a inflamação, alterando as adipocitocinas no tecido adiposo e aumentando a circulação entero-hepática de lipídeos e compostos lipofílicos (KING et al., 2005).

2.2 Doença periodontal

A doença periodontal é caracterizada por uma infecção bacteriana oral crônica associada à presença de biofilme, que resulta na inflamação gengival e/ou dos tecidos periodontais, podendo evoluir com destruição gradual do ligamento periodontal, osso alveolar de suporte e cemento radicular (IRFAN; DAWSON; BISSADA, 2001; MICHAUD et al., 2007).

Trata-se de uma condição altamente prevalente na população adulta em todo mundo, sendo observado um aumento acentuado em sua ocorrência com o avanço da idade. Uma das formas mais comuns da doença periodontal, denominada periodontite, afeta aproximadamente 50% da população adulta no mundo, enquanto que suas formas graves afetam de 10% a 15% destes indivíduos (CHAPPLE; GENCO, 2013).

Numerosas espécies de bactérias periodontopatógenas (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*) existentes no biofilme são responsáveis pela indução e manutenção da inflamação periodontal (ORINGER, 2002; LOOS, 2005; MOUTSOPOULOS; MADIANOS, 2006; ALMEIDA et al., 2007). Esses microrganismos estão frequentemente presentes na microbiota subgengival e são representados principalmente por bactérias anaeróbias Gram-negativas (MINTZ, 2004).

A produção de citocinas e quimiocinas pelas bactérias do biofilme gera uma resposta inflamatória que quando exacerbada leva à degradação das estruturas do periodonto de sustentação, caracterizando-se pela destruição do ligamento periodontal, ativação de osteoclastos e reabsorção do osso alveolar, migração apical do epitélio juncional e formação de bolsas periodontais (GENCO, 1992; SLOTS; REYNOLDS; GENCO, 1980).

Na DOENÇA PERIODONTAL grande parte da destruição observada ocorre como resultado de uma resposta imunoinflamatória do hospedeiro ao biofilme. Os produtos bacterianos iniciam uma resposta local na gengiva, que envolve o recrutamento de células inflamatórias, geração de prostanóides e citocinas, síntese de enzimas líticas e ativação de osteoclastos (ARMITAGE, 2002; MOUTSOPOULOS; MADIANOS, 2006).

As prostaglandinas e outros metabólitos do ácido aracdônico têm um reconhecido papel na patogenia da doença periodontal como um importante

mediador pró-inflamatório na gengivite e na reabsorção do osso alveolar (DRISKO, 1996). Elevados níveis de Prostaglandina E2 (PGE2) são detectados no líquido crevicular de pacientes com doença periodontal, achado esse que tem sido associado ao aumento da gravidade da doença (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS, 1993). A ciclooxygenase-2 (COX-2), precursora da PGE2, é expressa durante as condições inflamatórias induzidas por citocinas inflamatórias e endotoxinas (SEIBERT et al., 1994) (SMITH; GARAVITO; DEWITT, 1996).

O ligante do receptor do fator nuclear kappa β (RANK-L) e a osteoprotegerina (OPG) também são mediadores chave que regulam a expressão de osteoclastos e desempenham um papel fundamental na formação e ativação dos mesmos (CROTTI et al., 2003). Segundo Liu et al. (2003), o nível de mRNA de RANKL é mais elevado na periodontite avançada. Em contraste, o nível de mRNA de OPG na periodontite - tanto avançada quanto moderada - é menor em pacientes com a doença do que em pacientes saudáveis.

2.2.1 Doença periodontal experimental

Ao contrário de outras doenças infecciosas humanas, que não têm correspondentes em outras espécies, a doença periodontal inflamatória é comum em muitas espécies animais (KHAZANDI et al., 2014). Diferentes modelos animais podem ser utilizados para se avaliar a patogênese ou até mesmo as modalidades terapêuticas possíveis com relação à doença periodontal inflamatória.

Neste sentido, os ratos geralmente são alvo de estudos experimentais da doença periodontal. Tal fato deve-se às grandes semelhanças entre ratos e outras espécies animais, inclusive humanos, em relação à arquitetura da região de molares, além do menor custo da pesquisa, fácil manuseio e disponibilidade de

utilização de várias linhagens com diferentes estados microbiológicos e imunológicos (WEINBERG; BRAL, 1999). Além disso, estudos da doença periodontal inflamatória em humanos levantam vários problemas, como a determinação do nível da atividade da doença, riscos individuais e suscetibilidade à progressão da doença. Dessa forma, é importante escolher um modelo animal experimental que compartilhe características semelhantes com relação à anatomia e à doença periodontal inflamatória de outras espécies (WEINBERG; BRAL, 1999).

A anatomia da junção dento-gengival da região de molares de rato é muito semelhante àquela descrita em algumas espécies animais e em humanos, tornando o estudo experimental da doença periodontal inflamatória nesses animais uma ferramenta bastante válida (LISTGARTEN, 1975). Os achados clínicos e microscópicos da doença periodontal inflamatória experimentalmente induzida em ratos também são semelhantes àqueles achados em outras espécies. Clinicamente, nota-se sangramento gengival sob sondagem suave e, microscopicamente, o epitélio juncional sofre alterações graduais, como formação de cristas epiteliais, ulceração e migração apical. Observa-se ainda, no tecido conjuntivo subjacente, infiltrado inflamatório contendo linfócitos T e B, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares, bem como destruição de fibras colágenas e atividade osteoclástica aumentada (KLAUSEN, 1991).

Em ratos, a doença periodontal pode ser induzida por meio de manipulação dietética (ROBINSON; HART; PIGOTT, 1991), da inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos (FIEHN; KLAUSEN; EVANS, 1992) e, ainda, por meio da colocação de ligaduras ao redor da região cervical do molar do animal (GYÖRFI et al., 1994), geralmente o primeiro molar superior ou inferior. A colocação de ligadura com fio de seda ou algodão ao redor da região cervical de primeiros molares, inferiores ou superiores, tem sido amplamente utilizada na indução da doença

periodontal inflamatória experimental (KLAUSEN, 1991; ARAL et al., 2015; KIM et al., 2014). Neste modelo, a ligadura age tanto como um fator promotor da formação de placa dento-bacteriana quanto como um trauma mecânico na área dento-gengival, provocando achatamento e deslocamento dos tecidos gengivais mesial e distal, bem como reduz a integridade tecidual pela ulceração ocasional do epitélio sulcular, o que permite uma intensa interação hospedeiro-placa dento bacteriana. Neste modelo de indução, a iniciação da doença periodontal inflamatória por bactérias é bem documentada e o resultado final que envolve destruição do osso alveolar e de outros tecidos conjuntivos é prontamente observada (LOHINAI et al., 1998).

2.3 Diabetes mellitus

O diabetes *mellitus* é uma doença onde a homeostase do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios é inadequadamente regulada pelo hormônio pancreático insulina, resultando em um aumento do nível de glicose no sangue (SUNIL; IGNACIMUTHU; AGASTIAN, 2011). Os sinais e sintomas mais frequentes do diabetes *mellitus* são: poliúria, polidipsia, glicosúria, polifagia, alterações visuais, lesões na pele, distúrbios cardíacos, bucais e renais (SEINO et al., 2010). Essa patologia é um dos principais problemas de saúde pública mundial e vem se agravando rapidamente especialmente nas nações em desenvolvimento. Adicionalmente, esta doença acomete cerca de 285 milhões de pessoas no mundo, sendo que destas, 90% são portadoras de diabetes *mellitus* tipo 2 (FAZELI FARSAANI et al., 2013). Em animais de companhia, estima-se que a prevalência do diabetes *mellitus* esteja entre 0,3% e 1,3% em cães, enquanto que em gatos este valor está entre 0,25% e 2% (MACIEL et al., 2013).

Existem dois tipos de diabetes *mellitus*, o tipo 1 e o tipo 2. No diabetes *mellitus* do tipo 1, verifica-se uma deficiência na produção de insulina

decorrente da destruição autoimune das células β do pâncreas. Em geral, neste tipo da doença, os pacientes são jovens (antes dos 30 anos de idade) e não obesos quando os sintomas aparecem pela primeira vez e seu tratamento exige o uso de insulina. No diabetes *mellitus* Tipo 2, ocorre resistência à ação da insulina. Neste caso a doença tem herança poligênica ainda não completamente definida. A patogênese do diabetes *mellitus* Tipo 2 é complexa e envolve a interação entre a genética e fatores ambientais, entre esses especialmente a obesidade proveniente do sedentarismo e ingestão alimentar excessiva. Em ambos os casos, os agentes hipoglicemiantes orais e/ou insulina tornam-se frequentemente necessários (DEFRONZO, 2004; MALANDRINO; SMITH, 2011).

A grande importância do diabetes *mellitus* como um problema de saúde pública está no fato de que a maioria das complicações crônicas da doença é altamente incapacitante para a realização das atividades diárias e produtivas, além de comprometer a qualidade de vida dos indivíduos. Acrescenta-se a isso, o fato de o tratamento das mesmas ser extremamente oneroso para o sistema de saúde pública (FAZELI FARSANI et al., 2013).

O desenvolvimento de produtos que possibilitem o surgimento de novas alternativas para o tratamento do diabetes é relevante, principalmente tendo-se em vista a prevalência desta enfermidade em todo o mundo. Além de se tratar de uma doença de caráter crônico, a mesma predispõe os pacientes a uma série de outras complicações em longo prazo, especialmente aquelas associadas ao sistema circulatório (micro e macroangiopatias), que tem tratamento complexo e dispendioso (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2005).

2.3.1 Modelo animal experimental de diabetes *mellitus* Tipo 1

Estudos envolvendo modelos animais de diabetes *mellitus* são importantes devido às diversas limitações de investigação da doença diretamente em seres humanos. Sendo assim, já que existe semelhança fisiológica, celular e molecular entre os roedores e os humanos, a utilização de modelos experimentais torna-se uma ferramenta bastante útil (CHATZIGEORGIOU et al., 2009; DAMATTA, 2010).

Os modelos mais utilizados *in vivo* para o estudo do diabetes *mellitus* são aqueles utilizando roedores tratados com aloxano ou estreptozotocina. A estreptozotocina é um glicosídeo nitrosurea natural isolado do *Streptomyces achromogenes*. Esta substância estimula a produção de radicais livres, o que leva à destruição e disfunção das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Este xenobiótico tem sido usado para induzir o diabetes com concomitante deficiência de insulina. Uma dose simples de 40 a 80 mg/kg em ratos pode produzir um modelo experimental do diabetes *mellitus* (MARLES; FARNSWORTH, 1995).

A dose necessária para induzir diabetes depende das espécies de animais, via de administração e do estado nutricional (FEDERIUK et al., 2004; LENZEN, 2008).

A indução do diabetes *mellitus* tipo 1 por estreptozotocina foi descrita pela primeira vez na década de 60. A estreptozotocina causa dano nas bases de DNA, depletando a nicotina adenina dinucleotídeo (NAD⁺), a qual inibe a biossíntese e a secreção de insulina promovendo a destruição irreversível das células beta, resultando em grave síndrome diabética (AKBARZADEH et al., 2007; SZKUDELSKI, 2001).

Já a ação diabetogênica da droga Aloxano foi descrita em 1940. Essa substância inibe a glicoquinase, provocando um estado de diabetes grave por

meio da sua capacidade de formar espécies reativas de oxigênio, resultando em necrose da célula beta pancreática. Entretanto, o aloxano é menos utilizado devido às dificuldades em induzir o diabetes e manter os animais em boas condições (LENZEN, 2008).

O modelo de diabetes tipo I induzido por estreptozotocina em ratos tem muitas vantagens sobre os outros modelos, como a facilidade em induzir a doença e capacidade de manter os animais em condições adequadas. Assim, é considerado um modelo experimental apropriado de diabetes *mellitus*¹, sendo utilizado em muitos experimentos como protocolo de indução da patologia (AKBARZADEH et al., 2007).

2.4 Doença periodontal e diabetes *mellitus*

Segundo Al-Khabbaz e Al-Shammari (2011) existe um relacionamento bidirecional entre diabetes *mellitus* e doença periodontal e que pacientes diagnosticados com diabetes são considerados grupo de alto risco com maior susceptibilidade a formas graves de perda óssea. Estudos clínicos têm mostrado que pacientes diagnosticados com diabetes *mellitus* têm maior prevalência de complicações periodontais quando comparados a indivíduos saudáveis, incluindo inflamação gengival (LALLA et al., 2006), reabsorção óssea (TERVONEN et al., 2000), abscesso periodontal (UETA et al., 1993) e perda de dentes (KAUR et al., 2009). Assim, pessoas com diabetes geralmente têm uma alta prevalência de doença periodontal que é caracterizada por lesões graves e de progresso rápido (OU; LI, 2011).

Similarmente, a presença de doença periodontal em pacientes diabéticos pode influenciar seu controle glicêmico (KOROMANTZOS et al., 2011). Koromantzios et al. (2011) demonstraram que o tratamento da doença periodontal pode melhorar o estado de pacientes com diabetes tipo II. Ademais,

Ou e Li (2011) observaram que o tratamento periodontal reduziu o nível de glicose em jejum e hemoglobina glicosilada de pacientes diabéticos.

Tervonen e Karjalainen (1997) acompanharam a progressão da doença periodontal em pacientes diabéticos por três anos. Estes autores observaram que o nível de saúde periodontal dos pacientes diabéticos com bom ou moderado controle da glicemia foi semelhante ao de indivíduos não diabéticos. Já os indivíduos com pobre controle da glicemia tiveram maior perda de inserção e foram mais propensos a apresentar recorrência da doença. Este fenômeno tem sido apontado também por outros pesquisadores (KIM et al., 2012; BREIVIK et al., 2005; MATTHEWS, 2002) .

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o exposto, podemos observar que os β -glucanos são agentes imunoestimulantes e possuem ação hipoglicemiante. Não foram encontrados na literatura estudos envolvendo modelos de diabetes experimental associados à doença periodontal induzida por ligadura e o uso de β -glucanos obtidos de *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, torna-se necessário entender como o uso sistêmico desses β -glucanos pode influenciar a progressão do diabetes associado à doença periodontal, bem como descrever seus possíveis mecanismos de ação na modulação da resposta imune em caráter local e sistêmico e ainda aperfeiçoar as técnicas de controle do diabetes associado à doença periodontal.

REFERÊNCIAS

- AKBARZADEH, A. et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 60–64, Sept. 2007.
- AKRAMIENE, D. et al. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina**, Kaunas, v. 43, n. 8, p. 597–606, Jan. 2007.
- AL-KHABBAZ, A. K.; AL-SHAMMARI, K. F. Diabetes *mellitus* and periodontal health: dentists' knowledge. **Medical Principles and Practice**, Basel, v. 20, n. 6, p. 538–544, Jan. 2011.
- ALMEIDA, J. M. de 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.
- ARAL, C. A. et al. Alveolar bone protective and hypoglycemic effects of systemic propolis treatment in experimental periodontitis and diabetes *Mellitus*. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 18, n. 2, p. 195–201, Feb. 2015.
- ARMITAGE, G. C. Classifying periodontal diseases--a long-standing dilemma. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 30, p. 9–23, Jan. 2002.
- BATTILANA, P. et al. Mechanisms of action of beta-glucan in postprandial glucose metabolism in healthy men. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 55, n. 5, p. 327–33, May 2001.
- BREIVIK, T. et al. Soluble beta-1,3/1,6-glucan from yeast inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 32, n. 4, p. 347–52, abr. 2005.
- CARVALHO, A. S. et al. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 29, n. 11, p. 735–740, Nov. 2011.
- CHAPPLE, I. L. C.; GENCO, R. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 40, supl. 1, p. 106–112, Apr. 2013.

CHATZIGEORGIOU, A. et al. The use of animal models in the study of diabetes *mellitus*. **In Vivo**, Athens, v. 23, n. 2, p. 245–258, Mar./Apr. 2009.

CHEN, J.; ZHANG, X. D.; JIANG, Z. The application of fungal β -glucans for the treatment of colon cancer. **Current Chemical Chemistry. Anti Cancer Agents**, Netherlands, v. 13, n. 5, p. 725–30, June 2013.

CHOI, J. S. et al. Consumption of barley beta-glucan ameliorates fatty liver and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 54, n. 7, p. 1004–1013, July 2010.

CROTTI, T. et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 38, n. 4, p. 380–387, Aug. 2003.

DAMATTA, R. A. Animal models in biomedical research. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, p. 210-211, 2010. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/view/7728>>. Acesso em: 5 dez. 2014.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes *mellitus*. **The Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 88, n. 4, p. 787–835, July 2004.

DESHPANDE, K. et al. Diabetes and periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 207–212, Oct./Dec. 2010.

DONG, J. et al. Hypoglycaemic effects and inhibitory effect on intestinal disaccharidases of oat beta-glucan in streptozotocin-induced diabetic mice. **Food Chemistry**, London, v. 129, n. 3, p. 1066–1071, Dec. 2011.

DRISKO, C. H. Non-surgical pocket therapy: pharmacotherapeutics. **Annals of Periodontology**, Chicago, v. 1, n. 1, p. 491–566, Nov. 1996.

FAZELI FARSANI, S. et al. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. **Diabetologia**, New York, v. 56, n. 7, p. 1471–1488, July 2013.

FEDERIUK, I. F. et al. Induction of type-1 diabetes *mellitus* in laboratory rats by use of alloxan: route of diabetes *mellitus* instillation, pitfalls, and insulin treatment. **Comparative Medicine**, Memphis, v. 54, n. 3, p. 252–257, June 2004.

FIEHN, N. E.; KLAUSEN, B.; EVANS, R. T. Periodontal bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous Streptococcus sanguis. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 27, n. 6, p. 609–614, Nov. 1992.

FRIEDLANDER, A. H. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: comment to Teeuw, Gerdes, and Loos. **Diabetes Care**, New York, v. 33, n. 2, p. 421–427, July 2010.

GACTO, M. et al. Characterization of an extracellular enzyme system produced by Micromonospora chalybeata with lytic activity on yeast cells. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 6, p. 961–967, June 2000.

GAO, R. et al. Interaction of barley β -glucan and tea polyphenols on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 6, p. 128–134, June 2012.

GENCO, R. J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 338–355, Apr. 1992.

GYÖRFI, A. et al. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 21, n. 9, p. 601–615, Oct. 1994.

HAFFAJEE, A. D. et al. Effect of herbal, essential oil, and chlorhexidine mouthrinses on the composition of the subgingival microbiota and clinical periodontal parameters. **The Journal of Clinical Dentistry**, Yardley, v. 20, n. 7, p. 211–217, Jan. 2009.

HARNACK, U.; ECKERT, K.; PECHER, G. Beta-(1-3),(1-6)-D-glucan enhances the effect of low-dose cyclophosphamide treatment on A20 lymphoma in mice. **Anticancer Research**, Athens, v. 31, n. 4, p. 1169–1172, Apr. 2011.

HENDARTO, H. et al. GLP-1 analog liraglutide protects against oxidative stress and albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats via protein kinase A-mediated inhibition of renal NAD(P)H oxidases. **Metabolism: clinical and experimental**, Basel, v. 61, n. 10, p. 1422–1434, Oct. 2012.

IRFAN, U. M.; DAWSON, D. V; BISSADA, N. F. Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. **Journal of the International Academy of Periodontology**, London, v. 3, n. 1, p. 14–21, Jan. 2001.

ISLAM, M. S. Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. **Phytomedicine** : international journal of phytotherapy and phytopharmacology, Jena, v. 19, n. 1, p. 25–31, Dec. 2011.

KAUR, G. et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen,, v. 36, n. 9, p. 765–774, Sept. 2009.

KHAZANDI, M. et al. In vitro efficacy of cefovecin against anaerobic bacteria isolated from suß-glucanos ingival plaque of dogs and cats with periodontal disease. **Anaerobe**, London, v. 28, p. 104–108, Aug. 2014.

KIM, J.-H. et al. Receptor activator of nuclear factor- κ b ligand and sclerostin expression in osteocytes of alveolar bone in rats with ligature-induced periodontitis. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 85, n. 11, p. e370–378, Nov. 2014.

KIM, K.-S. et al. The effects of complex herbal medicine composed of *Cornus fructus*, *Dioscoreae rhizoma*, *Aurantii fructus*, and *Mori folium* in obese type-2 diabetes mice model. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 69–75, Mar. 2013.

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**, Coponhagen,v. 47, n. 6, p. 800–810, Dec. 2012.

KING, D. E. et al. Dietary fiber, inflammation, and cardiovascular disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinhem, v. 49, n. 6, p. 594–600, June 2005.

KING, D. E. et al. Fiber and C-reactive protein in diabetes, hypertension, and obesity. **Diabetes Care**, New York, v. 28, n. 6, p. 1487–1489, June 2005a.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 62, n. 1, p. 59–73, Jan. 1991.

KOROMANTZOS, P. A. et al. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 38, n. 2, p. 142–147, Mar. 2011.

KRAYER, J. W.; LEITE, R. S.; KIRKWOOD, K. L. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 54, n. 1, p. 13–33, Jan. 2010.

LALLA, E. et al. Periodontal changes in children and adolescents with diabetes: a case-control study. **Diabetes Care**, New York, v. 29, n. 2, p. 295–299, Mar. 2006.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, New York, v. 51, n. 2, p. 216–226, Feb. 2008.

LIATIS, S. et al. The consumption of bread enriched with betaglucan reduces LDL-cholesterol and improves insulin resistance in patients with type 2 diabetes. **Diabetes & Metabolism**, Paris, v. 35, n. 2, p. 115–120, Apr. 2009.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 46, n. 11, p. 677–680, Nov. 1975.

LIU, S. et al. A prospective study of dietary fiber intake and risk of cardiovascular disease among women. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 39, n. 1, p. 49–56, Jan. 2002.

LIU, S. Whole-grain foods, dietary fiber, and type 2 diabetes: searching for a kernel of truth. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 77, n. 3, p. 527–9, mar. 2003.

LO, H.-C. et al. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. **Life Sciences**, Elmsford, v. 78, n. 17, p. 1957–1966, Mar. 2006.

LOHINAI, Z. et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 123, n. 3, p. 353–360, Feb. 1998.

LOOS, B. G. Systemic markers of inflammation in periodontitis. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 76, n. 11, p. 2106–2115, Nov. 2005.

LOPES, B. M. V. et al. Clinical and microbiologic follow-up evaluations after non-surgical periodontal treatment with erbium:YAG laser and scaling and root planing. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 81, n. 5, p. 682–691, May 2010.

LÓPEZ, N. J.; GAMONAL, J. A.; MARTINEZ, B. Repeated metronidazole and amoxicillin treatment of periodontitis. A follow-up study. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 71, n. 1, p. 79–89, Jan. 2000.

MACIEL, R. M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. **Research in Veterinary Science**, London, v. 95, n. 2, p. 389–397, Oct. 2013.

MALANDRINO, N.; SMITH, R. J. Personalized medicine in diabetes. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 57, n. 2, p. 231–240, Feb. 2011.

MALERBI, D. et al. Brazilian Diabetes Society consensus statement--intensive insulin therapy and insulin pump therapy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 125–35, mar. 2006.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine** : international journal of phytotherapy and phytopharmacology, Jena, v. 2, n. 2, p. 137–189, Oct. 1995.

MATTHEWS, D. C. The relationship between diabetes and periodontal disease. **Journal Canadian Dental Association**, Ottawa, v. 68, n. 3, p. 161–164, Mar. 2002.

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**, Bethesda, v. 99, n. 2, p. 171–175, Jan. 2007.

MINTZ, K. P. Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. **Microbiology**, Washington, v. 150, n. 8, p. 2677–2688, Aug. 2004.

MOUTSOPOULOS, N. M.; MADIANOS, P. N. Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1088, p. 251–264, Nov. 2006.

OFFENBACHER, S.; HEASMAN, P. A.; COLLINS, J. G. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 64, n. 5, p. 432–444, May 1993.

ORINGER, R. J. Modulation of the host response in periodontal therapy. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 73, n. 4, p. 460–470, Apr. 2002.

OU, L.; LI, R.-F. Effect of periodontal treatment on glycosylated hemoglobin levels in elderly patients with periodontal disease and type 2 diabetes. **Chinese Medical Journal**, Peking, v. 124, n. 19, p. 3070–3073, Oct. 2011.

PAULA, A. C. C. F. F. de et al. Hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing beta-glucans from extracts of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb., Poaceae. **Brazilian Journal of Medical and biological Research**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 885–893, June 2005.

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. Insulin therapy for type 1 diabetes *mellitus*: past and present. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 268–278, Mar. 2008.

RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 94–103, Apr. 2011.

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**, New York, v. 10, n. 6, p. 438–443, Nov./Dec. 2003.

RIBEIRO, A. de O. et al. Atividade antidiabética e efeitos fisiológicos associados aos β -glucanos presentes em *rhynchelytrum repens*. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 11, n. 3, p. 41-50, Feb. 2009. Disponível em: <<http://revistas.unopar.br/index.php/biologicas/article/view/274>>. Acesso em: 05 dez. 2014.

RICE, P. J. et al. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 314, n. 3, p. 1079–1086, Sept. 2005.

ROBINSON, M.; HART, D.; PIGOTT, G. H. The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. **Laboratory Animals**, London, v. 25, n. 3, p. 247–253, July 1991.

RUBIN-BEJERANO, I. et al. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 55–67, 12 jul. 2007.

SAMUELSEN, A. B. C.; SCHREZENMEIR, J.; KNUTSEN, S. H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: a review. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 58, n. 1, p. 183–193, Jan. 2014.

SANDVIK, A. et al. Oral and systemic administration of beta-glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 148, n. 1, p. 168–177, Apr. 2007.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. A. Vascular complications in diabetes *mellitus*: the role of endothelial dysfunction. **Clinical Science**, London, v. 109, n. 2, p. 143–159, Aug. 2005.

SCHNEEMAN, B. O. Dietary fiber and gastrointestinal function. **Nutrition Reviews**, New York, v. 45, n. 5, p. 129–132, May 1987.

SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 25, p. 12013–12017, Dec. 1994.

SEINO, Y. et al. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes *mellitus*. **Journal of Diabetes Investigation**, Amsterdam, v. 1, n. 5, p. 212–228, Oct. 2010.

SENER, G. et al. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 542, n. 1-3, p. 170–178, Aug. 2006.

SILVA, J. A. F. et al. Sequential IL-23 and IL-17 and increased Mmp8 and Mmp14 expression characterize the progression of an experimental model of periodontal disease in type 1 diabetes. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 227, n. 6, p. 2441–2450, June 2012.

SLOTS, J.; REYNOLDS, H. S.; GENCO, R. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 29, n. 3, p. 1013–1020, Sept. 1980.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, n. 52, p. 33157–33160, Dec. 1996.

SONCK, E. et al. The effect of beta-glucans on porcine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 135, n. 3-4, p. 199–207, June 2010.

SUNIL, C.; IGNACIMUTHU, S.; AGASTIAN, P. Antidiabetic effect of *Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S. Moore. in type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 134, n. 2, p. 298–304, Mar. 2011.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiologia Bohemoslovaca**, Praha, v. 50, n. 6, p. 537–546, 2001.

TAPPY, L.; GUGOLZ, E.; WURSCH, P. Effects of breakfast cereals containing various amounts of beta-glucan fibers on plasma glucose and insulin responses in NIDDIABETES *MELLITUS* subjects. **Diabetes Care**, New York, v. 19, n. 8, p. 831–834, Aug. 1996.

TERVONEN, T. et al. Alveolar bone loss in type 1 diabetic subjects. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 27, n. 8, p. 567–571, Aug. 2000.

TERVONEN, T.; KARJALAINEN, K. Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 24, n. 7, p. 505–510, July 1997.

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**, London, v. 67, n. 4, p. 310–317, Apr. 2013.

TÚRMINA, J. A. et al. Toxicological assessment of β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan (lasiodiplodan) in mice during a 28-day feeding study by gavage. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 12, p. 14298–14309, Jan. 2012.

UETA, E. et al. Prevalence of diabetes *mellitus* in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. **Journal of Oral Pathology & Medicine** : official publication of the international association of

oral pathologists and the american academy of oral pathology, Copenhagen, v. 22, n. 4, p. 168–174, Apr. 1993.

VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, Hong Kong, v. 2, n. 2, p. 115–9, 10 mar. 2011.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 94, n. 2, p. 276–284, May 2008.

WEINBERG, M. A.; BRAL, M. Laboratory animal models in periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 26, n. 6, p. 335–340, June 1999.

WÜRSCH, P.; PI-SUNYER, F. X. The role of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes. A review with special emphasis on cereals rich in beta-glucan. **Diabetes Care**, New York, v. 20, n. 11, p. 1774–1780, Nov. 1997.

XIAO, Z.; TRINCADO, C. A.; MURTAUGH, M. P. Beta-glucan enhancement of T cell IFNgamma response in swine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 315–320, Dec. 2004.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 β -glucanos (*Sacharomyces cerevisiae*) reduzem níveis glicêmicos e atenuam a perda óssea alveolar em ratos Wistar diabéticos com doença periodontal

Artigo foi redigido de acordo com as normas para submissão a revista *Plos One*.

Viviam de Oliveira Silva^{1#¶&¥}, Raquel Vieira Lobato^{1¶&¥}, Eric Francelino Andrade^{1#¶&¥}, Marcelo Henrique Napimoga^{2¶&¥}, Juliana Trindade Clemente Napimoga^{3&¥}, Cristina Gomes de Macedo^{3&¥}, Michel Reis Messoria^{4£&¥}, Luciano José Pereira^{1*£&¥}

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

²Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, São Leopoldo Mandic, Campinas, São Paulo, Brasil

³Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brasil

⁴Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

* Autor Correspondente: Luciano José Pereira, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras - Pav.08, Campus Universitário - Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras - Minas Gerais - Brasil,
Phone: (55 35) 3829 5211
Fax: (55 35) 3829 1715
e-mail: lucianopereiraufila@gmail.com

Elaboração do artigo; £ Revisão crítica do conteúdo intelectual do artigo; ¶ Concepção e desenvolvimento do trabalho, aquisição análise e interpretação dos dados; & Aprovação da versão final a ser publicada; ¥ Acordo pela responsabilidade de todos os aspectos do trabalho

Resumo

Objetivou-se avaliar os efeitos do tratamento com β -glucanos isolados de *Sacharomyces cerevisiae* sobre o perfil metabólico e parâmetros de perda óssea alveolar em ratos diabéticos com doença periodontal. Foram utilizados 48 ratos *Wistar*, induzidos a diabetes *mellitus* com injeção intraperitoneal de estreptozotocina 80 mg/kg e doença periodontal através de protocolo de ligadura. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x2, com seis repetições por tratamento. Os animais foram tratados com β -glucanos, por gavagem, durante 28 dias. O β -glucano reduziu a perda óssea alveolar em animais com doença periodontal tanto diabéticos quanto não diabéticos ($p < 0,05$). O β -glucano apresentou resultado positivo em reduzir a glicemia, colesterol e os triacilgliceróis em animais diabéticos, tanto com doença periodontal como sem doença periodontal. O tratamento com β -glucano aumentou os níveis de peptídeo C em animais com diabetes e doença periodontal ($p < 0,05$). Em geral, o tratamento com β -glucanos reduziu a expressão de COX-2 e RANK-L e aumentou a expressão de OPG nos animais com diabetes e doença periodontal. Concluiu-se que o tratamento com β -glucano promoveu efeitos metabólicos e periodontais benéficos em ratos diabéticos com doença periodontal.

Palavras-chave: Inflamação, diabetes *mellitus*, periodontite, prebióticos, sistema imune

Introdução

A doença periodontal é caracterizada por uma inflamação crônica que afeta os tecidos de suporte dos dentes e pode levar à perda dentária [1,2]. Embora o fator etiológico primário da doença seja o biofilme dental, a resposta do hospedeiro e a presença de doenças sistêmicas, como o diabetes *mellitus*, afetam seu desenvolvimento e progressão [3,4].

O diabetes *mellitus* é uma doença onde a homeostase do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios é inadequadamente regulada pelo hormônio pancreático insulina, resultando em um aumento do nível de glicose no sangue [5]. Dentre as comorbidades associadas a diabetes *mellitus*, a doença periodontal representa o sexto distúrbio mais prevalente [6,7] e evidências indicam uma ação bidirecional entre as duas patologias [8,9].

No paciente diabético não-compensado, a hiperglicemia resultante promove alterações vasculares (microangiopatias), fagocitose ineficaz pelos neutrófilos e macrófagos, além de lentificação da síntese de colágeno causando retardo na reparação tecidual [10]. Já nos pacientes com doença periodontal ativa, ocorre liberação crônica exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a ação da insulina e consequente agravando as alterações metabólicas [11]. Medidas alternativas de controle da glicemia e da resposta imunológica, como por exemplo o emprego de β -glucanos, tem gerado resultados promissores em estudos com animais e seres humanos [12,13,14]. Os β -glucanos são os principais componentes estruturais da parede celular de fungos, plantas e algumas bactérias [13]. Eles tem se mostrado capazes de modular a resposta imunológica (tanto não específica quanto específica) [13], estimulando a fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias [15,16]. Além disso, esses polímeros apresentam reconhecida ação hipoglicemiante [17,14]. Soluções de β -(1,3/1,6) glucanos, administradas por via oral já foram utilizadas em modelos de doença periodontal induzida por ligadura e diminuíram a perda óssea alveolar

[12,18]. Entretanto, esta resposta não foi avaliada em indivíduos diabéticos e nem tampouco foram esclarecidos os mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

A eficácia dos β -glucanos como agentes imunomoduladores da doença periodontal em pacientes diabéticos ainda é pouco estudada. Dessa forma, pesquisas envolvendo um mesmo princípio ativo capaz de modular a resposta inflamatória e concomitantemente a glicemia é de extremo interesse, especialmente sabendo-se que a doença periodontal é mais frequente e mais severa em pacientes com controle glicêmico inadequado [19]. Uma vez que a doença periodontal e o diabetes *mellitus* são patologias que apresentam alta prevalência na população, são multifatoriais e possuem características crônicas [10], o aperfeiçoamento das técnicas de controle apresenta relevância do ponto de vista da saúde pública. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com β -glucanos isolados de *Sacharomyces cerevisiae* sobre o perfil metabólico e parâmetros de perda óssea alveolar em ratos diabéticos com doença periodontal.

Material e métodos

Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) através do protocolo número 083/11, de acordo com a legislação nacional em vigor do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Um total de 48 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*), em estado hígido, pesando 192 ± 21 g foram utilizados no presente estudo. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UFLA. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x2 (diabéticos ou não; induzidos a doença periodontal ou não, tratados e não

tratados com β -glucanos), com seis repetições por tratamento. Cada parcela foi representada por um animal.

Os animais foram submetidos a um período de sete dias de aclimação com o ambiente e equipe de execução do projeto. Os mesmos foram acomodados em gaiolas metabólicas individuais e a sala foi climatizada a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Ração comercial e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

Após a semana de aclimação, os 48 animais foram divididos de forma aleatória e separados em grupos de seis, conforme descritos a seguir: Grupo 1 - controle (sem indução de diabetes, sem indução de doença periodontal); Grupo 2 - diabetes (indução de diabetes com estreptozotocina); Grupo 3 - doença periodontal (indução de doença periodontal por 14 dias); Grupo 4 - β -glucano (administrado a partir do primeiro dia do experimento); Grupo 5 - Diabetes associado à doença periodontal; Grupo 6 – Diabetes com administração de β -glucano; Grupo 7 - Doença periodontal com administração de β -glucano; Grupo 8 - Diabetes associado à doença periodontal com administração de β -glucano.

Indução do diabetes

Para a indução do diabetes *mellitus* experimental, metade dos animais recebeu injeção intraperitoneal de 80 mg/kg de estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em tampão citrato [20], administrada 48 horas antes do início do experimento (Figura 1). Antes do início do experimento (dia zero), os animais foram submetidos a jejum de oito horas e a glicemia foi mensurada, através da amputação da ponta da cauda, usando glicosímetro (Accu-Chek[®] Roche, Basel, Suíça). Foram considerados diabéticos os animais com nível sérico de glicose em jejum acima de 200 mg/dL.

Indução da doença periodontal

A doença periodontal foi induzida através de protocolo de ligadura, no primeiro molar mandibular direito. Os animais receberam anestesia geral com injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg associado com cloridrato de cetamina na dose de 80 mg/kg e depois de anestesiados receberam a ligadura [21]. Em todos os animais de grupos com doença periodontal, esta foi induzida durante 14 dias (Figura 1).

Administração do β -glucano

O β -glucano usado no presente estudo foi proveniente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e apresenta a seguinte composição: β -glucanos- Mín. 60,0 %; Proteína Bruta - Max. 8,0%; pH (solução 2%) 4,0 - 7,0; Cinzas - Max.10,0g/100g. Distribuição de tamanho de partículas: média - 41 μ m < 20 μ m 19%; 20 - 50 μ m 43%; 50 - 100 μ m 28%; 100 - 200 μ m 10%; >200 μ m 0%. Fluides (segundos) - 70.2; Ângulo de repouso (graus) 31.2; Compressibilidade 37%; Habilidade de retenção de água (média) 7.4, Índice de solubilidade na água 7.9. Dados informados pelo fabricante.

Foram administradas doses diárias de 30 mg/kg/dia do produto, dissolvidos em 0,3 ml de solução salina, por gavagem, durante 28 dias. Os animais dos grupos não tratados receberam o mesmo volume de solução salina. Os animais com doença periodontal receberam β -glucano durante os 14 dias antes da indução e também durante os 14 dias após a colocação da ligadura, totalizando 28 dias de tratamento com β -glucano (Figura 1).

Coleta de material para análise

Ao final do período experimental (28 dias) a glicemia foi mensurada, através da amputação da ponta da cauda, usando glicosímetro (Accu-Chek[®] Roche, Basel, Suíça). Para mensuração da glicemia os animais foram

previamente mantidos em jejum de oito horas. Em seguida os animais foram eutanasiados através de punção cardíaca sob anestesia com 50 mg/kg de tiopental sódico via intraperitoneal.

Amostras de sangue foram coletadas para determinação das concentrações plasmáticas de colesterol total e triacilgliceróis por ensaio colorimétrico e de peptídeo C por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits comerciais.

As mandíbulas foram removidas para as análises da expressão dos genes ciclooxigenase 2 (COX-2), ligante do receptor do fator nuclear kappa β (RANK-L) e osteoprotegerina (OPG) que foram realizadas através das técnicas de PCR quantitativo em tempo real. Os graus de perda óssea alveolar foram avaliados diretamente nas mandíbulas dissecadas após a remoção do tecido mole por meio de análise morfométrica [22].

PCR quantitativo em tempo real para os genes COX-2, RANK-L e OPG

O RNA total foi isolado através de kit Mini Kit Qiagen RNeasyProtocol (Qiagen; Valencia, CA, USA), de acordo com a recomendação do fabricante. A concentração de RNA total foi determinada a partir da densidade óptica usando um espectrofotômetro de micro-volume (Nanodrop 1000, Nanodrop Technologies LLC, Wilmington, NC, EUA).

Transcrição reversa do RNA total foi tratada com DNase (Turbo DNase, Ambion Inc., Austin, TX, USA) e um micrograma foi utilizado para a síntese de cDNA. A reação foi realizada utilizando o kit de síntese First Strand cDNA (Ferments, Glen Burnie, MD, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

Conjuntos de primers para os genes COX2, RANK-L, OPG e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram projetados a partir de sequências disponíveis no GenBank usando Primer Express 3.0 software de

design de sonda (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). As sequências dos primers foram as seguintes: COX2: forward: 5' - ACT TGC GTT GAT GGT GGC TGT CTT - 3', reverse: 5' - CTG TAT CCC GCC CTG CTG GTG - 3'; OPG: forward: 5' - TCC TGG CAC CTA CCT AAA ACA GCA - 3', reverse: 5' - CTA CAC TCT CGG CAT TCA CTT TGG - 3'; RANKL: forward: 5' - CAT CGG GTT CCC ATA AAG - 3', reverse: 5' - GAA GCA AAT GTT GGC GTA - 3'; e GAPDH: forward: 5' - GAC TGT GGA TGG CCC CTC TG-3', reverse: 5' - CGC CTG CTT CAC CAC CTT CT - 3'. A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada em 7300 PCR Real Time (Applied Biosystem), utilizando o SYBR Green PCR Master Mix (Ferments, Glen Burnie, MD, USA). O produto da reação foi quantificado com a ferramenta de quantificação relativa, utilizando GAPDH como gene de referência. Controles negativos com SYBR Green PCR Master Mix e água foram realizados para todas as reações.

Análise morfométrica da perda óssea alveolar

As mandíbulas foram dissecadas e imersas em solução de hipoclorito de sódio 1% por quatro horas e todo tecido mole remanescente foi removido mecanicamente. As peças foram coradas com azul de metileno (1g/100ml) por um minuto para demarcar a junção cimento-esmalte. As mandíbulas foram observadas em lupa estereoscópica e posicionadas de forma que ocorresse a sobreposição das cúspides vestibular e lingual, não havendo a possibilidade de visualização da superfície oclusal. A imagem foi digitalizada por câmera fotográfica. O método de Crawford et al. (1978) foi utilizado para realizar medições lineares da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, na metade de cada raiz seguindo o eixo. As mensurações foram obtidas nas três raízes do 1º molar da face lingual, por meio do programa Image J (Bethesda, MD, USA) por

um examinador treinado e desconhecedor dos grupos experimentais. A média de três medidas foi utilizada para expressar a perda óssea alveolar por animal.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através de Análise de Variância (ANOVA). Quando valores de F indicaram diferença significativa nas interações, estas foram desdobradas entre os fatores. As análises foram realizadas através do programa estatístico SISVAR [23]. O nível de significância foi fixado em 95%.

Resultados

Os animais diabéticos apresentaram glicemia inicial média superior aos animais dos grupos sem diabetes ($p < 0,05$). A glicemia média inicial dos grupos de animais diabéticos foi de 428 mg/dL.

Verificou-se que os parâmetros metabólicos analisados, glicemia final, colesterol total e triacilgliceróis, foram superiores em grupos de animais diabéticos em relação aos grupos de animais que não foram induzidos à doença (Tabela 1 - $p < 0,05$). Os animais com diabetes e doença periodontal induzida indicaram maiores concentrações plasmáticas de glicose e colesterol quando comparados aos animais diabéticos sem doença periodontal (Tabela 1 - $p < 0,05$). Já para os triacilgliceróis, os resultados foram inversos, sendo que os animais com diabetes e doença periodontal tratados ou não com β -glucano mostraram concentrações menores em relação aos diabéticos com e sem β -glucano (Tabela 1 - $p < 0,05$). O β -glucano apresentou resultado positivo em reduzir a glicemia e os triacilgliceróis em animais diabéticos, tanto com doença periodontal como sem doença periodontal. O colesterol indicou uma menor concentração em função do uso de β -glucano nos animais diabéticos com doença

periodontal, quando esses foram comparados ao grupo dos não tratados (Tabela 1 - $p < 0,05$).

Tabela 1: Glicemia, colesterol total e triacilgliceróis (mg/dL / média $\pm$ desvio padrão) de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

DIABETES	DOENÇA PERIODONTAL	β-GLUCANO	
		Sem	Com
Glicemia			
Sem*	Sem	91 (9)	97 (4)
	Com	111 (4)	106 (11)
Com	Sem	517 (32) a x	367 (24) a y
	Com	561 (44) b x	440 (73) b y
Colesterol total			
Sem*	Sem	50 (5)	53 (4)
	Com	59 (5)	58 (9)
Com	Sem	82 (18) a	72 (10) a
	Com	97 (5) b x	83 (10) b y
Triacilgliceróis			
Sem*	Sem	82 (16)	68 (13)
	Com	68 (13)	63 (16)
Com	Sem	276 (49) b x	191 (16) b y
	Com	229 (72) a x	144 (25) a y

* Diferem dos tratamentos com diabetes pelo teste F ($P < 0,05$)

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras nas colunas diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

^{x,y} Médias seguidas por diferentes letras nas linhas diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

Nos animais diabéticos a presença da doença periodontal promoveu um aumento na expressão de COX-2 (Tabela 2 - $p < 0,05$). O tratamento com β -glucanos reduziu a expressão dessa enzima nos animais com diabetes e doença periodontal em relação aos que não foram tratados (Tabela 2 - $p < 0,05$).

A expressão de RANK-L foi menor em animais diabéticos não tratados, quando esses foram comparados aos diabéticos com doença periodontal não tratados (Tabela 2 - $p < 0,05$). Também foi observada redução na expressão

desse gene nos animais do grupo com doença periodontal e grupo tratado com β -glucano em relação aos respectivos grupos com diabetes (Tabela 2 - $p < 0,05$). Nos animais com doença periodontal, o uso de β -glucano reduziu a expressão de RANK-L tanto em animais diabéticos quanto não diabéticos (Tabela 2 - $p < 0,05$).

Quanto a expressão de OPG em animais não diabéticos, os grupos sem doença periodontal apresentaram maior expressão de OPG que os grupos com doença periodontal (Tabela 2 - $p < 0,05$). Esses mesmos grupos (não diabéticos e sem doença periodontal) também apresentaram uma maior expressão de OPG quando comparados aos animais diabéticos e sem doença periodontal (Tabela 2 - $p < 0,05$). O tratamento com β -glucano aumentou a expressão de OPG em animais com doença periodontal e não diabéticos (Tabela 2 - $p < 0,05$).

Tabela 2: Expressão dos genes de COX-2, RANK-L e OPG (média $\pm$ desvio padrão) de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

DIABETES	DOENÇA PERIODONTAL	β-GLUCANO	
		Sem	Com
COX-2			
Sem*	Sem	1,08 (0,18)	0,89 (0,12)
	Com	1,40 (0,44)	0,92 (0,24)
Com	Sem	0,84 (0,07) a	0,72 (0,15)
	Com	1,54 (0,44) b x	0,82 (0,08) y
RANK-L			
Sem*	Sem	1,46 (0,42) a	1,54 (0,53) A
	Com	4,21 (1,60)b A x	2,41 (0,63) y
Com	Sem	2,22, (0,32) a	3,71 (0,93) B
	Com	6,74(2,46) b B x	2,09 (0,65) y
OPG			
Sem*	Sem	3,86 (0,52) b B	3,92 (0,82) b B
	Com	1,17 (0,33) a y	2,57 (0,21) a x
Com	Sem	2,24 (0,33) A	2,12 (0,96) A
	Com	1,47 (0,36)	2,14 (0,63)

* Diferem dos tratamentos com diabetes pelo teste F ($P < 0,05$)

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras nas colunas diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

^{x,y} Médias seguidas por diferentes letras nas linhas diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

Os grupos de animais com doença periodontal apresentaram maior perda óssea alveolar que os grupos sem indução da doença (Tabela 3 - $p < 0,05$). Os animais diabéticos e com doença periodontal tiveram maior perda óssea alveolar em relação os animais com diabetes e sem doença periodontal (Tabela 3 - $p < 0,05$). O β -glucano reduziu a perda óssea alveolar em animais com doença periodontal tanto diabéticos quanto não diabéticos (Tabela 3 - $p < 0,05$).

Tabela 3: Perda óssea alveolar (mm / média $\pm$ desvio padrão) de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

DIABETES	DOENÇA PERIODONTAL	β -GLUCANO	
		Sem	Com
Sem	Sem	1,20 (0,14) a	0,98 (0,12) a
	Com	2,10 b (0,36)A x	1,78 (0,35)b A y
Com	Sem	1,16 (0,10) a	1,13 (0,13) a
	Com	2,63 (0,13)b B x	2,10 (0,36)b B y

^{A,B} Médias seguidas por diferentes letras nas colunas diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras nas colunas diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

^{x,y} Médias seguidas por diferentes letras nas linhas diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

Discussão

Os resultados do presente estudo mostraram que o β -glucano foi eficiente em melhorar os parâmetros metabólicos (glicemia, colesterol total e triacilgliceróis) e a perda óssea alveolar em animais diabéticos com doença periodontal.

Os efeitos positivos dos β -glucanos sobre o metabolismo em ratos diabéticos são conhecidos [24,17]. A redução destes parâmetros, frente ao uso de β -glucano, pode estar relacionada a sua capacidade de agir diretamente na digesta. Estes polissacarídeos formam uma camada gelatinosa que funciona como uma barreira que dificulta a absorção de carboidratos, levando assim a uma menor concentração de glicose e lipídeos no sangue [25,25,26,27,28,29].

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram encontrados mostrando melhorias significativas na glicemia, triacilglicerois e colesterol total de ratos diabéticos tratados com β -glucano, elucidando seu efeito benéfico sobre a tolerância à glicose e metabolismo lipídico [30,31].

Apesar de estudos indicarem que a hiperglicemia pode agravar a perda óssea alveolar [18,12,32], no presente estudo observamos que não houve relação entre o controle glicêmico e a redução da perda óssea. Tais resultados podem ser explicitados pelo fato de que os animais com doença periodontal não diabéticos também terem apresentado redução da perda óssea alveolar. Em outras palavras, o beta-glucano foi eficiente na redução da perda óssea mesmo em animais com a glicemia normal. Esse resultado pode estar relacionado com o efeito imunológico do beta-glucano, reduzindo a expressão de RANK-L (parâmetro relacionado a perda óssea alveolar). Sendo assim, podemos associar a melhoria da perda óssea alveolar (tanto em animais diabéticos quanto em não diabéticos) aos conhecidos efeitos imunomodulatórios dos β -glucanos provenientes de fungos [16,33,34]. A potência imunológica desses polissacarídeos está associada à sua habilidade em ativar os leucócitos estimulando suas funções fagocíticas, citotóxicas e atividade antimicrobiana [35,36].

No presente estudo, os animais com doença periodontal induzida apresentaram níveis elevados de RANK-L e redução na expressão de OPG. A compreensão da via de sinalização do sistema RANK-L/OPG, é de grande importância para o entendimento do processo de reabsorção óssea, uma vez que o equilíbrio dessa via é essencial para a homeostase do tecido ósseo [37]. A OPG regula a remodelação óssea através do controle da diferenciação e ativação de osteoclastos [38,39]. Enquanto isso, o RANK-L favorece a osteoclastogênese, estimulando a atividade osteoclastica e inibindo a apoptose [40,39]. O envolvimento de RANK-L e OPG na doença periodontal ficou evidente em um estudo onde camundongos foram induzidos a periodontite através de inoculação

de microorganismo patogênico. Nesse modelo, a atividade da doença periodontal foi relacionada com altos níveis de RANK-L, enquanto um aumento da expressão de OPG inibiu a atuação deste ligante [41]. Resultados similares ao presente estudo também foram encontrados em experimentos com camundongos diabéticos com doença periodontal induzida por inoculação de bactéria, que mostraram maior expressão de RANK-L em animais doentes. Os mesmos indicaram menor perda óssea quando foram identificados maiores índices de OPG [42]. Resultados similares foram encontrados em estudos com ratos induzidos a doença periodontal por ligadura, onde a OPG foi relacionada com a preservação do volume ósseo alveolar [43].

No presente estudo, o uso de β -glucano reduziu a expressão de RANK-L em animais com doença periodontal (induzidos ou não ao diabetes *mellitus*), ao mesmo tempo que aumentou a expressão de OPG em animais com doença periodontal não diabéticos. Mais uma vez esse resultado pode indicar uma ação moduladora do β -glucano diretamente no sistema imune. Efeitos anti-inflamatórios dos β -glucanos foram descritos previamente [44,45]. Desta forma, a menor expressão de COX-2 em animais diabéticos e com doença periodontal tratados com β -glucanos, pode ser justificada pela atividade anti-inflamatória deste produto no tecido periodontal reduzindo assim a perda óssea alveolar.

Considera-se que a funcionalidade dos β -glucanos na modulação da resposta imune ou metabólica pode ser influenciada pela sua origem. Assim, os provenientes de fungos (β -1,3/1,6) apresentam maior atividade imunomodulatória, enquanto que os provenientes de grãos, cereais e gramíneas (β -1,3-1,4) possuem características que conferem maior potencial metabólico [46]. Entretanto, o presente estudo comprovou que os β -glucanos provenientes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* possuem tanto propriedades imunomodulatórias, quanto metabólicas, podendo se tornar um grande aliado para pacientes diabéticos e com doença periodontal. Não existem relatos sobre a

toxicidade frente ao consumo de β -glucanos, o que torna esse composto relativamente seguro para o consumo [46]. Desta forma, os β -glucanos surgem como uma alternativa viável ao uso de medicamentos.

Conclusão

O tratamento com β -glucano proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* administrado no período de 28 dias reduziu os níveis glicêmicos e atenuou a perda óssea alveolar em ratos diabéticos com doença periodontal.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-01692-12-12 e PPM00268/14), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 481125 / 2013-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

1. Irfan UM, Dawson D V, Bissada NF (2001) Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. J Int Acad Periodontol 3: 14–21.
2. Michaud DS, Joshipura K, Giovannucci E, Fuchs CS (2007) A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. J Natl Cancer Inst 99: 171–175.
3. Williams RC, Offenbacher S (2000) Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. Periodontol 2000 23: 9–12.

4. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC (2003) Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol* 8: 12–37.
5. Sunil C, Ignacimuthu S, Agastian P (2011) Antidiabetic effect of *Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S. Moore. in type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 134: 298–304.
6. Al-Maskari AY, Al-Maskari MY, Al-Sudairy S (2011) Oral Manifestations and Complications of Diabetes *Mellitus*: A review. *Sultan Qaboos Univ Med J* 11: 179–186.
7. L  e H (1993) Periodontal disease. The sixth complication of diabetes *mellitus*. *Diabetes Care* 16: 329–334.
8. Lakschevitz F, Aboodi G, Tenenbaum H, Glogauer M (2011) Diabetes and periodontal diseases: interplay and links. *Curr Diabetes Rev* 7: 433–439..
9. Awuti G, Younusi K, Li L, Upur H, Ren J (2012) Epidemiological survey on the prevalence of periodontitis and diabetes *mellitus* in Uyghur adults from rural Hotan area in Xinjiang. *Exp Diabetes Res* 2012: 758921.
10. Deshpande K, Jain A, Sharma R, Prashar S, Jain R (2010) Diabetes and periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 14: 207–212.
11. Koromantzios PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, et al. (2011) A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical

periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol* 38: 142–147.

12. Breivik T, Opstad PK, Engstad R, Gundersen G, Gjermo P, et al. (2005) Soluble beta-1,3/1,6-glucan from yeast inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. *J Clin Periodontol* 32: 347–352.
13. Samuelsen ABC, Schrezenmeir J, Knutsen SH (2014) Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: a review. *Mol Nutr Food Res* 58: 183–193.
14. Tosh SM (2013) Review of human studies investigating the post-prandial blood-glucose lowering ability of oat and barley food products. *Eur J Clin Nutr* 67: 310–317.
15. Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P, Fink GR (2007) Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* 2: 55–67.
16. Vetvicka V (2011) Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World J Clin Oncol* 2: 115–119.
17. Lo H-C, Tsai F-A, Wasser SP, Yang J-G, Huang B-M (2006) Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. *Life Sci* 78: 1957–1966.

18. Kim YS, Kang SJ, Kim JW, Cho HR, Moon SB, et al. (2012) Effects of Polycan, a β -glucan, on experimental periodontitis and alveolar bone loss in Sprague-Dawley rats. *J Periodontal Res* 47: 800–810.
19. Friedlander AH (2010) Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: comment to Teeuw, Gerdes, and Loos. *Diabetes Care* 33: e101; author reply e102.
20. Hendarto H, Inoguchi T, Maeda Y, Ikeda N, Zheng J, et al. (2012) GLP-1 analog liraglutide protects against oxidative stress and albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats via protein kinase A-mediated inhibition of renal NAD(P)H oxidases. *Metabolism* 61: 1422–1434.
21. Messori MR, Oliveira LFF, Foureaux RC, Taba M, Zangerônimo MG, et al. (2013) Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 84: 1818–1826.
22. Souza DM de, Prado F de A, Prado M de A, Rocha RF da, Carvalho YR (2011) Evaluation of periodontal bone loss in rats for radiographic and morphometric methods. *Periodontia*: 67–73.
23. Ferreira DF (n.d.) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 1039–1042.
24. Kim Y-W, Kim K-H, Choi H-J, Lee D-S (2005) Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol Lett* 27: 483–487.

25. Tappy L, Gugolz E, Wursch P (1996) Effects of breakfast cereals containing various amounts of beta-glucan fibers on plasma glucose and insulin responses in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 19: 831–834.
26. Reyna NY, Cano C, Bermúdez VJ, Medina MT, Souki AJ, et al. (n.d.) Sweeteners and beta-glucans improve metabolic and anthropometrics variables in well controlled type 2 diabetic patients. *Am J Ther* 10: 438–443.
27. Liatis S, Tsapogas P, Chala E, Dimosthenopoulos C, Kyriakopoulos K, et al. (2009) The consumption of bread enriched with betaglucan reduces LDL-cholesterol and improves insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 35: 115–120.
28. Choi JS, Kim H, Jung MH, Hong S, Song J (2010) Consumption of barley beta-glucan ameliorates fatty liver and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 54: 1004–1013.
29. Dong J, Cai F, Shen R, Liu Y (2011) Hypoglycaemic effects and inhibitory effect on intestinal disaccharidases of oat beta-glucan in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Chem* 129: 1066–1071.
30. Miranda-Nantes CCBO, Fonseca EAI, Zaia CTB V, Dekker RFH, Khaper N, et al. (2011) Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats. *Mycobiology* 39: 187–193.

31. Gao R, Wang Y, Wu Z, Ming J, Zhao G (2012) Interaction of barley β -glucan and tea polyphenols on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Food Sci* 77: H128–H134.
32. Matthews DC (2002) The relationship between diabetes and periodontal disease. *J Can Dent Assoc* 68: 161–164.
33. Sonck E, Stuyven E, Goddeeris B, Cox E (2010) The effect of beta-glucans on porcine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 135: 199–207.
34. Xiao Z, Trincado CA, Murtaugh MP (2004) Beta-glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 315–320.
35. Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E (2007) Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43: 597–606.
36. Sandvik A, Wang YY, Morton HC, Aasen AO, Wang JE, et al. (2007) Oral and systemic administration of beta-glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. *Clin Exp Immunol* 148: 168–177.
37. Cochran DL (2008) Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 79: 1569–1576.
38. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309–319.

39. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, et al. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3597–3602.
40. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ (1998) TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188: 997–1001.
41. Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, et al. (2000) Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 106: R59–R67.
42. Mahamed DA, Marleau A, Alnaeeli M, Singh B, Zhang X, et al. (2005) G(-) Anaerobes-Reactive CD4+ T-Cells Trigger RANKL-Mediated Enhanced Alveolar Bone Loss in Diabetic NOD Mice. *Diabetes* 54: 1477–1486.
43. Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai J V, Taba M, et al. (2007) RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol* 78: 1300–1308.
44. Lee DH, Kim HW (2014) Innate immunity induced by fungal β -glucans via dectin-1 signaling pathway. *Int J Med Mushrooms* 16: 1–16.
45. Smiderle FR, Alquini G, Tadra-Sfeir MZ, Iacomini M, Wichers HJ, et al. (2013) *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydr Polym* 94: 91–99.

46. Francelino Andrade E, Vieira Lobato R, Vasques Araújo T, Gilberto Zangerônimo M, Vicente Sousa R, et al. (2014) EFFECT OF BETA-GLUCANS IN THE CONTROL OF BLOOD GLUCOSE LEVELS OF DIABETIC PATIENTS: A SYSTEMATIC REVIEW. *Nutr Hosp* 31: 170–177.

Figuras

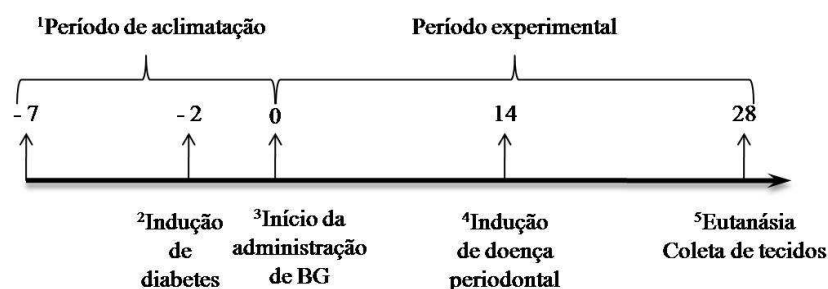


Figura 1: Representação esquemática do delineamento experimental ao longo do tempo; ¹Todos os animais foram acomodados em gaiolas metabólicas individuais e passaram por um período de aclimação de sete dias; ²Para os animais dos grupos diabetes, diabetes + doença periodontal, diabetes + β -glucano, diabetes + doença periodontal + β -glucano; ³Para os animais dos grupos β -glucano, diabetes + β -glucano, doença periodontal + β -glucano, diabetes + doença periodontal + β -glucano; ⁴Para os animais dos grupos doença periodontal, diabetes + doença periodontal, doença periodontal + β -glucano, diabetes + doença periodontal + β -glucano; ⁵Coleta de amostras sanguíneas e remoção das mandíbulas.

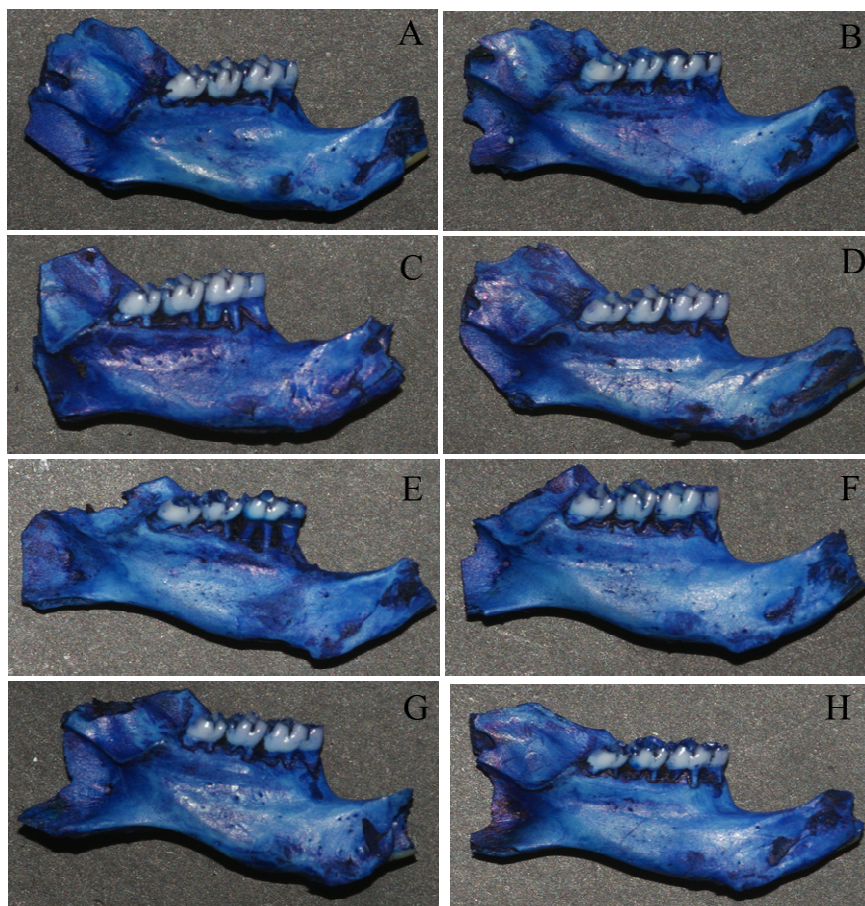


Figura 2: Perda óssea alveolar de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias; A - controle; B - diabetes; C - doença periodontal; D - β -glucano; E - diabetes + doença periodontal; F - diabetes + β -glucano; G - doença periodontal + β -glucano, H - diabetes + doença periodontal + β -glucano.

(VERSÃO PRELIMINAR)

**ARTIGO 2 Efeito de β -glucanos sobre a perda óssea e morfologia intestinal
de ratos submetidos à doença periodontal induzida por ligadura**

**Artigo foi redigido de acordo com as normas para submissão a revista
Journal of Periodontology.**

Viviam O. Silva, MS^{*}, Raquel V. Lobato, MS^{*}, Eric F. Andrade, MS^{*}, Debora
R. Orlando, MS^{*}, Luciano J. Pereira, DDS, PhD^{*‡}

^{*} Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras -
UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil

[‡]Autor correspondente: Luciano José Pereira
Departamento de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Lavras – UFLA – Pav.08
Campus Univertário - Caixa Postal 3037
Lavras - Minas Gerais - Brasil
CEP: 37200-000
Phone: (55 35) 3829 5211
Fax: (55 35) 3829 1715
e-mail: lucianopereiraufila@gmail.com

Resumo

Objetivo: avaliar a perda óssea alveolar e a morfologia da mucosa intestinal por meio de avaliação histológica em ratos *Wistar* com doença periodontal induzida por ligadura, tratados com β -glucanos provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*. **Metodos:** Foram utilizados 24 ratos *Wistar*, induzidos a doença periodontal através de protocolo de ligadura. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, com seis repetições por tratamento. Os animais foram tratados com 30 mg/kg/dia de β -glucanos, durante 28 dias. Foram coletadas as mandíbulas e os fragmentos de cada segmento intestinal. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística (ANOVA - $p < 0,05$). **Resultados:** O β -glucano foi eficiente em reduzir a perda óssea nos animais com doença periodontal quando esses foram comparados aos que não receberam tratamento ($p < 0,05$). Os animais tratados com β -glucanos apresentaram maior altura de vilosidades no duodeno tanto em grupos com doença periodontal quanto em grupos sem a doença ($p < 0,05$). Profundidade de cripta foi menor no jejuno de animais com doença periodontal tratados com β -glucanos quando comparados aos animais não tratados ($p < 0,05$). A relação profundidade de criptas/altura de vilosidades foi maior no duodeno de animais com doença periodontal tratados com β -glucanos em relação aos não tratados ($p < 0,05$). **Conclusão:** O uso de β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae*, na dose de 30 mg/kg/dia, reduziu a perda óssea alveolar em ratos *Wistar* com doença periodontal e aumentou a área de absorção no duodeno desses animais.

Palavras-chave: Periodontite, prebiótico, inflamação, imunidade, intestino.

Introdução

A doença periodontal é uma patologia altamente prevalente na população adulta caracterizada por uma infecção bacteriana oral crônica associada à presença de biofilme. Esta resulta na inflamação gengival e dos tecidos adjacentes, podendo evoluir com destruição gradual do ligamento periodontal e osso alveolar de suporte dos dentes podendo levar a mobilidade e possível perda do dente ^{1,2,3}. A infecção periodontal é constantemente associada à diversas doenças sistêmicas sendo, nesse sentido, consideradas um grave problema de saúde pública. Atualmente, estima-se que a periodontite crônica afeta aproximadamente 80% da população de meia idade, o que ressalta sua importância no âmbito social ⁴.

O aumento da quantidade de microrganismos patogênicos na região subgengival pode ativar uma cascata de mecanismos de defesa do hospedeiro. Esses mecanismos estão associados à produção de fatores que levam ao processo inflamatório e de destruição do periodonto ⁴.

β -glucanos provenientes da parede celular de fungos - polímeros lineares formados por unidades de glicose β (1-3)-D-glucopiranosil com ramificações β (1-6) - tem demonstrado efeito protetor em infecções experimentais ⁵. Alguns autores sugerem que os β -glucanos agem sobre o sistema imune favorecendo a fagocitose e a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, estimulando os neutrófilos e monócitos, acarretando então melhora na resposta imune ^{6,7}. Além disso, estudos apontam que soluções contendo β -glucanos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* foram capazes de reduzir a perda óssea em ratos com doença periodontal induzida por ligadura. Uma das explicações para esse efeito, foi a capacidade desses compostos em estimular a fagocitose de macrófagos ³. β -glucanos oriundos de outros fungos também se mostraram eficientes no tratamento da perda óssea alveolar em ratos *Sprague-Dawley*, por

promover redução nas quantidades de citocinas pró-inflamatórias e inibição da produção de estresse oxidativo ⁸.

Pesquisas envolvendo produtos dietéticos capazes de auxiliar no controle da resposta inflamatória periodontal, como por exemplo os β -glucanos, são de extremo interesse. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a perda óssea e a morfologia da mucosa intestinal de ratos *Wistar* com doença periodontal induzida por ligadura e tratados com β -glucanos provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Material e métodos

Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) através do protocolo número 083/11, de acordo com a legislação nacional em vigor do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Um total de 24 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*), em estado hígido, pesando 203 ± 18 g foram utilizados no presente estudo. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UFLA. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (induzidos ou não a doença periodontal, tratados ou não com β -glucanos), com seis repetições por tratamento. Cada parcela foi representada por um animal.

Os animais foram submetidos a um período de sete dias de aclimação com o ambiente e equipe de execução do projeto. Os mesmos foram acomodados em gaiolas metabólicas individuais e a sala foi climatizada a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C, com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Ração comercial e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

Após a semana de aclimação, os 24 animais foram divididos de forma aleatória e separados em grupos com seis animais, cada um recebendo um dos quatro tratamentos a seguir: grupo 1 - controle; grupo 2 - β -glucano administrado a partir do primeiro dia do experimento; grupo 3 - doença periodontal induzida no 14º dia do experimento; grupo 4 - administração de β -glucano durante todo o período do experimento + indução de doença periodontal a partir do 14º dia do experimento.

Indução da doença periodontal

A doença periodontal foi induzida através de protocolo de ligadura, no primeiro molar mandibular direito. Os animais receberam anestesia geral com injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg associado com cloridrato de cetamina na dose de 80 mg/kg. Depois de anestesiados os animais dos grupos 3 e 4 receberam a ligadura ⁹. Em todos os animais de grupos com doença periodontal, esta foi induzida durante 14 dias (Figura 1).

β -glucano

O β -glucano utilizado foi o extrato da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, em doses diárias de 30 mg/kg por gavagem ^{8,3}. Todos os animais tratados com β -glucano (grupos 2 e 4), receberam o mesmo por um período total de 28 dias. Os grupos não tratados (1 e 3) receberam volume equivalente de solução salina. Os animais com doença periodontal receberam β -glucano durante os 14 dias antes da indução e também durante os 14 dias após a colocação da ligadura, totalizando 28 dias de tratamento com β -glucano (Figura 1).

Coleta de material para análise

Ao final do período experimental (28 dias) os animais foram eutanasiados através de punção cardíaca sob anestesia com tiopental sódico na

dose de 50 mg/kg via intraperitoneal. A seguir, as mandíbulas e os fragmentos de cada segmento intestinal (duodeno, jejuno e íleo) foram coletados.

Procedimentos histológicos e análise histométrica do tecido periodontal e intestino

As amostras de tecido das mandíbulas e das distintas partes do intestino delgado foram coletadas e fixadas em formalina a 10% por 48 horas.

Antes do procedimento de rotina, as mandíbulas foram dissecadas, brevemente lavadas em água e em seguida, colocadas em solução desmineralizante de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 18% até a completa descalcificação.

Após completa descalcificação, as mandíbulas e as frações do intestino foram processadas rotineiramente conforme protocolo histológico e embebidas em parafina. Cortes seriados de cinco μm de espessura foram obtidos. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para análise por microscopia de luz. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera digital conectada ao microscópio. As mesmas foram digitalizadas e analisadas usando software de análise de imagem (Image-J, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Para avaliação da perda óssea aoveolar, a área entre a crista óssea inter-radicular e a furca foi medida - perda de massa óssea por milímetro quadrado^{10,11}.

Foram determinados a altura de vilosidade, profundidade de cripta e a relação entre a altura de profundidade de criptas/altura de vilosidades. A relação entre a profundidade de criptas/altura de vilosidades foi mensurada como se segue: a altura de vilosidades foi definida como a distância vertical (μm) entre o topo da vilosidade e a junção vilosidade-cripta; e a profundidade de criptas foi obtida pela mensuração da distância vertical da junção vilosidade-cripta até o

limite inferior final da cripta. Em cada secção foram mensuradas dez distâncias para profundidade de cripta assim como para altura de vilosidades, e os valores obtidos para cada segmento (duodeno, jejuno ou íleo) de cada animal foram representados pela média de três secções histológicas⁹.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através de Análise de Variância (ANOVA). Quando valores de F indicaram diferença significativa nas interações, estas foram desdobradas entre os fatores. As análises foram realizadas através do programa estatístico SISVAR¹². O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

Resultados

O β -glucano foi eficiente em reduzir a perda óssea nos animais com doença periodontal em relação aos animais que não receberam tratamento ($p < 0,05$ - Tabela 1). Os animais com doença periodontal apresentaram maior perda óssea quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,05$ - Tabela 1). Os animais tratados com β -glucanos apresentaram maior altura de vilosidades no duodeno tanto em grupos com doença periodontal quanto em grupos sem doença periodontal ($p < 0,05$ - Tabela 2). Já no jejuno, o grupo com doença periodontal indicou um aumento na altura de vilosidades em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$ - Tabela 2). A profundidade de criptas foi superior no grupo com doença periodontal em comparação ao grupo controle, tanto no duodeno quanto no jejuno ($p < 0,05$ - Tabela 3). No duodeno, o tratamento com β -glucanos aumentou a profundidade de criptas em animais do grupo tratado com β -glucanos em relação aos animais do grupo controle ($P < 0,05$ - Tabela 3). Já no jejuno, esse mesmo tratamento conferiu uma maior profundidade de criptas

aos animais com doença periodontal quando esse foi comparado ao grupo com a doença tratados com β -glucanos ($p < 0,05$ - Tabela 3). Os animais com doença periodontal apresentaram uma relação altura de vilosidades/profundidade de criptas, na porção do intestino referente ao duodeno, superior em função do uso de β -glucanos, quando comparados a animais do grupo não tratados ($p < 0,05$ - Tabela 4). No jejuno, o grupo controle indicou maior relação altura de vilosidades/profundidade de criptas em relação aos animais com doença periodontal ($p < 0,05$ - Tabela 4). Nenhuma das variáveis analisadas (altura de vilosidades, profundidade de criptas e relação altura de vilosidades/profundidade de criptas) apresentou diferença na porção do intestino referente ao ílio (Tabelas 2, 3 e 4).

Discussão

O presente estudo mostrou que o tratamento com 30 mg/kg/dia de β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae*, diabetes *mellitus* ministrado por via oral, reduziu a perda óssea em ratos *Wistar* com doença periodontal induzida por ligadura. Esse efeito imunomodulador pode ser explicado devido à ações exercidas pelos β -glucanos sobre o sistema imune, como por exemplo, aumentar os mecanismos de cicatrização de através de reações com receptores específicos em leucócitos localizados em tecidos da mucosa ¹³ ou neutralizar a sepse induzida por endotoxinas bacterianas ¹⁴. Segundo Breivik *et al.* ³, soluções de β -1,3/1,6-glucano de *Saccharomyces cerevisiae* (10 mg/kg/dia) foram capazes de reduzir a perda óssea nos grupos de animais tratados, quando esses foram comparados aos grupos controle. Esses resultados se assemelham com os descritos no presente estudo, onde a redução da perda óssea em função do tratamento com β -glucanos, foi determinada através de análise histométrica do tecido periodontal. Os autores do trabalho citado, atribuem essa ação à capacidade dos β -glucanos em estimular a fagocitose de macrófagos e a

diferenciação de células T³. Outro achado que reforça o resultado apresentado no presente estudo, foi a ação de *Polycan* (β -glucano extraído da levedura *Aureobasidium pullulans*) no tratamento da perda óssea alveolar em ratos *Sprague-Dawley*. *Polycan* foi administrado em doses de 21,25, 42,5 e 85 mg/kg/dia, durante dez dias, após a indução da doença periodontal. Os resultados indicaram que os tratamentos com 42,5 e 85 mg/kg/dia de *Polycan* foram eficientes em reduzir a perda óssea nos animais com ligadura. Os autores sugerem que o *Polycan* promove essa ação através da redução das quantidades de citocinas pró-inflamatórias e inibição da produção de estresse oxidativo⁸.

O presente estudo avaliou ainda o efeito de β -glucanos na estrutura da mucosa intestinal. Duas importantes alterações foram observadas no segmento intestinal referente ao duodeno: em ambos os grupos tratados com β -glucanos, a altura de vilosidade foi superior em relação aos grupos controle e com doença periodontal; os resultados indicaram também, um aumento na relação altura de vilosidades/profundidade de criptas nos animais com doença periodontal induzida em função da administração oral do β -glucanos. A relação altura de vilosidades/profundidade de criptas pode ser considerada um indicador da capacidade da mucosa intestinal em absorver os nutrientes da digesta^{15,16}. Células dendríticas presentes na mucosa intestinal e nas placas de Peyer, agem como transportadores de antígenos para a drenagem nos linfonodos. Nos nódulos linfáticos essas células estão envolvidas na imunidade sistêmica¹⁷. De acordo com Sandvik *et al.*¹⁴ essas células dendríticas podem interagir localmente com as moléculas de β -glucanos através de projeções em todo o epitélio e depois migrar para os nódulos linfáticos, onde se inicia a modulação imunológica.

Conclusão

Concluiu-se que o tratamento com β -glucanos, no período de 28 dias, reduziu a perda óssea alveolar em ratos com doença periodontal e aumentou a área de absorção no duodeno desses animais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-01692-12-12 e PPM00268/14), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 481125 / 2013-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

1. Irfan UM, Dawson D V, Bissada NF. Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. J Int Acad Periodontol. 2001;3(1):14–21.
2. Michaud DS, Joshipura K, Giovannucci E, Fuchs CS. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. J Natl Cancer Inst. 2007;99(2):171–5.
3. Breivik T, Opstad PK, Engstad R, Gundersen G, Gjermo P, Preus H. Soluble beta-1,3/1,6-glucan from yeast inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. J Clin Periodontol. 2005;32(4):347–52.
4. Dosseva-Panova VT, Popova CL, Panov VE. Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. Folia Med (Plovdiv).;56(3):152–60.

5. Vetvicka V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World J Clin Oncol*. 2011;2(2):115–9.
6. Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P, Fink GR. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe*. 2007;2(1):55–67.
7. Sener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Yeğen BC. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol*. 2006;542(1-3):170–8.
8. Kim YS, Kang SJ, Kim JW, Cho HR, Moon SB, Kim KY, et al. Effects of Polycan, a β -glucan, on experimental periodontitis and alveolar bone loss in Sprague-Dawley rats. *J Periodontal Res*. 2012;47(6):800–10.
9. Messora MR, Oliveira LFF, Foureaux RC, Taba M, Zangerônimo MG, Furlaneto FAC, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2013;84(12):1818–26.
10. Rodrigues WF, Madeira MFM, da Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-da-Silva VJ, et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol*. 2012;165(7):2140–51.
11. 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. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(2):216–22.
12. Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia.* Editora UFLA. 2011;35(6):1039–42.
 13. Luhm J, Langenkamp U, Hensel J, Frohn C, Brand JM, Hennig H, et al. Beta-(1-->3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors kappaB, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1beta/IL-1 receptor antagonist ratio. *BMC Immunol.* 2006;7:5.
 14. Sandvik A, Wang YY, Morton HC, Aasen AO, Wang JE, Johansen F-E. Oral and systemic administration of beta-glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. *Clin Exp Immunol.* 2007;148(1):168–77.
 15. Adibmoradi M, Navidshad B, Seifdavati J, Royan M. Effect of dietary garlic meal on histological structure of small intestine in broiler chickens. *J Poult Sci.* 2006
 16. Yang H, Liu A, Zhang M, Ibrahim SA, Pang Z, Leng X, et al. Oral administration of live *Bifidobacterium* substrains isolated from centenarians enhances intestinal function in mice. *Curr Microbiol.* 2009;59(4):439–45.
 17. Macpherson AJ, Smith K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med.* 2006;203(3):497–500.

Tabelas

Tabela 1 Avaliação histométrica da perda óssea (mm² - médias $\pm$ desvio padrão) de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

Doença Periodontal	β -glucano	
	Não tratado	Tratado
Não induzido	1,36 (0,19) a	1,39 (0,29)
Induzido	2,50 (0,41) B b	1,58 (0,61) A

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem pelo teste Tukey (P < 0,05)

Tabela 2 Altura de vilosidades (μ m - médias $\pm$ desvio padrão) do duodeno, jejuno e ílio de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

Doença Periodontal	β -glucano	
	Não tratado	Tratado
<i>Duodeno</i>		
Não induzido	435 (31) B	574 (97) A
Induzido	409 (71) B	558 (97) A
<i>Jejuno</i>		
Não induzido	388 (83) b	447 (33)
Induzido	471 (86) a	425 (33)
<i>Ílio</i>		
Não induzido	284 (59)	307 (60)
Induzido	249 (58)	304 (60)

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem pelo teste Tukey (P < 0,05)

Tabela 3 Profundidade de criptas (μm - médias $\pm$ desvio padrão) do duodeno, jejuno e ílio de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

Doença Periodontal	β -glucano	
	Não tratado	Tratado
Duodeno		
Não induzido	153 (23) b B	233 (24) A
Induzido	226 (43) a	234 (37)
Jejuno		
Não induzido	144 (20) b	166 (41)
Induzido	248 (45) a A	197 (51) B
Ílio		
Não induzido	173 (54)	182 (32)
Induzido	165 (44)	187 (21)

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$)

Tabela 4 Relação profundidade de criptas/altura de vilosidades (médias $\pm$ desvio padrão) do duodeno, jejuno e ílio de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

Doença Periodontal	β -glucano	
	Sem	Com
Duodeno		
Sem	2,88 (0,35) a	2,45 (0,25)
Com	1,87 (0,53) b B	2,37 (0,23) A
Jejuno		
Não induzido	2,72 (0,62) a	2,83 (0,65)
Induzido	1,91 (0,13) b	2,35 (0,90)
Ílio		
Não induzido	1,70 (0,27)	1,69 (0,13)
Induzido	1,54 (0,23)	1,62 (0,25)

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

Figuras

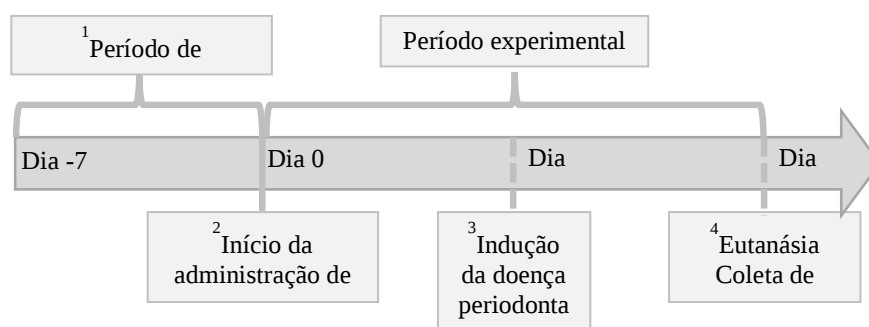


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental ao longo do tempo; ¹Todos os animais serão acomodados em gaiolas metabólicas individuais e passarão por um período de aclimação de 7 dias; ²Para os animais dos grupos 2 e 4; ³Para os animais dos grupos 3 e 4; ⁴Remoção das mandíbulas e coleta de fragmentos do intestino - todos os grupos

(VERSÃO PRELIMINAR)

ANEXOS

ANEXO A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais



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 cha@nimiec.ufpa.br

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 083/11**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito do uso de β -glucanos na imunidade e controle glicêmico em ratos diabéticos submetidos à doença periodontal induzida por ligadura**", que tem como responsável **Luciano José Pereira** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, tendo sido aprovado na reunião de 08/03/2012.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 083/11**, related to the project entitled "**Effect of the use of β -glucans in immunity and glycemic control in diabetic rats submitted to ligature-induced periodontal disease**", under the supervision of **Luciano José Pereira**, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, and was approved in March 08, 2012.

Lavras, 08 de março de 2012.



Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente em exercício da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Cidade Postal 3037 / CEP 37200-000 - Lavras, MG - Brasil
Tel. +55 (35) 3829 5182
cha@nimiec.ufpa.br - www.prp.ufpa.br

ANEXO B – Tabelas de análise de variância

ARTIGO 1

Tabela 1: Analise de variância da glicemia de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIABETES	1	1641690.187500	1641690.187500	1425.114	0.0000
DPERIOD	1	16096.687500	16096.687500	13.973	0.0006
GLUCANO	1	54607.520833	54607.520833	47.404	0.0000
DIAB*DPERIO	1	6052.520833	6052.520833	5.254	0.0272
DIAB*GLUC	1	55420.020833	55420.020833	48.109	0.0000
DPERIO*GLUC	1	275.520833	275.520833	0.239	0.6275
DIA*PER*GLU	1	1190.020833	1190.020833	1.033	0.3156
erro	40	46078.833333	1151.970833		
Total corrigido	47	1821411.312500			
CV (%) =		11.86			
Média geral:		286.1875000	Número de observações:	48	

Tabela 2: Analise de variância da expressão do gene COX-2, RANK-L e OPG de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

A: COX-2

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIABETES	1	0.073153	0.073153	1.119	0.3006
DPERIOD	1	0.664128	0.664128	10.161	0.0040
GLUCANO	1	1.151403	1.151403	17.616	0.0003
DIAB*DPERIOD	1	0.100128	0.100128	1.532	0.2278
DIAB*GLUCANO	1	0.014878	0.014878	0.228	0.6376
DPERIO*GLUC	1	0.393828	0.393828	6.026	0.0217
DIAB*PER*GLU	1	0.042778	0.042778	0.655	0.4265
erro	24	1.568625	0.065359		
Total corrigido	31	4.008922			
CV (%) =		24.90			
Média geral:		1.0265625	Número de observações:	32	

B: RANK-L

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIABETES	1	13.184113	13.184113	9.714	0.0047
DPERIOD	1	21.255200	21.255200	15.662	0.0006
GLUCANO	1	11.907200	11.907200	8.774	0.0068
DIAB*DPERIOD	1	0.259200	0.259200	0.191	0.6660
DIAB*GLUC	1	1.051250	1.051250	0.775	0.3875
DPERIOD*GLUC	1	32.200313	32.200313	23.726	0.0001
DIAB*PER*GLU	1	9.010012	9.010012	6.639	0.0166
erro	24	32.571800	1.357158		
Total corrigido	31	121.439088			
CV (%) =	38.22				
Média geral:	3.0481250	Número de observações:	32		

C: OPG

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIABETES	1	6.319012	6.319012	18.931	0.0002
DPERIOD	1	11.496013	11.496013	34.440	0.0000
GLUCANO	1	2.020050	2.020050	6.052	0.0215
DIAB*DPERIOD	1	5.445000	5.445000	16.312	0.0005
DIAB*GLUCANO	1	0.418612	0.418612	1.254	0.2739
DPERIOD*GLUC	1	2.257813	2.257813	6.764	0.0157
DIAB*PER*GLU	1	0.156800	0.156800	0.470	0.4997
erro	24	8.011050	0.333794		
Total corrigido	31	36.124350			
CV (%) =	23.69				
Média geral:	2.4387500	Número de observações:	32		

Tabela 3: Análise de variância da perda óssea alveolar (mm / média $\pm$ desvio padrão) de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIABETES	1	0.007081	0.007081		
DPERIOD	1	0.128651	0.128651	223.667	0.0000
GLUCANO	1	0.008884	0.008884	15.445	0.0003
DIAB*DPERIO	1	0.004089	0.004089	7.108	0.0110
DIAB*GLUCANO	1	0.000003	0.000003	0.004	0.9475
DPERIOD*GLUC	1	0.002837	0.002837	4.932	0.0321
DIAB*PER*GLU	1	0.001112	0.001112	1.933	0.1721
erro	40	0.023008	0.000575		
Total corrigido	47	0.175662			
CV (%) =	14.67				
Média geral:	0.1635208	Número de observações:	48		

ARTIGO 2

Tabela 1 Análise de variância da avaliação histométrica da perda óssea de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	2.668667	2.668667	16.169	0.0007
GLUCANO	1	1.201985	1.201985	7.283	0.0138
DPERIO*GLUC	1	1.354225	1.354225	8.205	0.0096
erro	20	3.300872	0.165044		
Total corrigido	23	8.525749			
CV (%) =	23.83				
Média geral:	1.7050417	Número de observações:	24		

Tabela 2 Análise de variância da altura de vilosidades do duodeno, jejuno e ílio de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

A - Duodeno

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	2624.205067	2624.205067	0.373	0.5483
GLUCANO	1	123412.910017	123412.910017	17.538	0.0005
DPERIO*GLUC	1	145.336817	145.336817	0.021	0.8872
erro	20	140740.522300	7037.026115		
Total corrigido	23	266922.974200			
CV (%) =	16.98				
Média geral:	493.9950000	Número de observações:	24		

B - Jejuno

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	5392.502604	5392.502604	1.317	0.2647
GLUCANO	1	234.312504	234.312504	0.057	0.8134
DPERIO*GLUC	1	16404.941704	16404.941704	4.007	0.0591
erro	20	81888.830683	4094.441534		
Total corrigido	23	103920.587496			
CV (%) =	14.79				
Média geral:	432.6570833	Número de observações:	24		

C - Íleo

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	2169.421350	2169.421350	0.621	0.4398
GLUCANO	1	8975.307267	8975.307267	2.571	0.1245
DPERIO*GLUC	1	1569.460267	1569.460267	0.450	0.5102
erro	20	69822.144500	3491.107225		
Total corrigido	23	82536.333383			
CV (%) =	20.65				
Média geral:	286.1941667	Número de observações:	24		

Tabela 3 Análise de variância da profundidade de criptas do duodeno, jejuno e íleo de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

A - Duodeno

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	8261.428267	8261.428267	7.679	0.0118
GLUCANO	1	11667.978017	11667.978017	10.845	0.0036
DPERIO*GLUC	1	7658.368267	7658.368267	7.118	0.0148
erro	20	21517.074033	1075.853702		
Total corrigido	23	49104.848583			
CV (%) =	15.49				
Média geral:	211.7441667	Número de observações:	24		

B - Jejuno

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	26930.650104	26930.650104	16.081	0.0007
GLUCANO	1	1316.164704	1316.164704	0.786	0.3859
DPERIO*GLUC	1	7905.051038	7905.051038	4.720	0.0420
erro	20	33493.477950	1674.673898		
Total corrigido	23	69645.343796			
CV (%) =	21.70				
Média geral:	188.6245833	Número de observações:	24		

C - Íleo

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	10.335937	10.335937	0.007	0.9362
GLUCANO	1	1398.274004	1398.274004	0.888	0.3572
DPERIO*GLUC	1	259.975838	259.975838	0.165	0.6888
erro	20	31488.689517	1574.434476		
Total corrigido	23	33157.275296			
CV (%) =	22.42				
Média geral:	176.9970833	Número de observações:	24		

Tabela 4 Análise de variância da relação profundidade de criptas/altura de vilosidades do duodeno, jejuno e íleo de animais tratados com β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dose de 30mg/kg/dia durante 28 dias

A - Duodeno

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	1.782150	1.782150	13.917	0.0013
GLUCANO	1	0.007350	0.007350	0.057	0.8131
DPERIO*GLUC	1	1.288067	1.288067	10.058	0.0048
erro	20	2.561167	0.128058		
Total corrigido	23	5.638733			
CV (%) =	14.95				
Média geral:	2.3933333	Número de observações:	24		

B - Jejuno

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	2.509067	2.509067	6.178	0.0219
GLUCANO	1	0.453750	0.453750	1.117	0.3031
DPERIO*GLUC	1	0.166667	0.166667	0.410	0.5290
erro	20	8.122500	0.406125		
Total corrigido	23	11.251983			
CV (%) =	26.02				
Média geral:	2.4491667	Número de observações:	24		

C – Íleo

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DPERIO	1	0.075938	0.075938	1.480	0.2379
GLUCANO	1	0.006338	0.006338	0.124	0.7289
DPERIO*GLUC	1	0.013537	0.013537	0.264	0.6131
erro	20	1.025950	0.051298		
Total corrigido	23	1.121763			
CV (%) =		13.84			
Média geral:		1.6362500	Número de observações:	24	