

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

SOPHIA MARCONDES DE ANDRADE PEREIRA SANTA CLARA KALIL

**EFEITO DA ANEXINA A1 SOBRE A PERDA ÓSSEA
PERIODONTAL DURANTE A PERIODONTITE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

SÃO PAULO

2024

SOPHIA MARCONDES DE ANDRADE PEREIRA SANTA CLARA KALIL

**EFEITO DA ANEXINA A1 SOBRE A PERDA ÓSSEA
PERIODONTAL DURANTE A PERIODONTITE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Raissa Micaella Marcello Machado

**SÃO PAULO
2024**

Kalil, Sophia Marcondes de Andrade Pereira Santa Clara.

Efeito da Anexina A1 sobre a perda óssea periodontal durante a periodontite experimental em camundongos / Sophia Marcondes de Andrade Pereira Santa Clara Kalil. - 2024.

11 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2024.

Área de concentração: Periodontia.

Orientadora: Prof. Dr. Raissa Micaela Marcelo Machado.

1. Anexina.
 2. Doença periodontal.
 3. Perda óssea.
 4. Morfometria.
 5. Periodontite.
- I. Machado, Raissa Micaela Marcelo (orientadora). II. Título.

SOPHIA MARCONDES DE ANDRADE PEREIRA SANTA CLARA KALIL

**EFEITO DA ANEXINA A1 SOBRE A PERDA ÓSSEA
PERIODONTAL DURANTE A PERIODONTITE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção título de Mestre em Odontologia.

Aprovado(a) em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Raissa Micaella Marcello Machado.
Universidade Paulista - UNIP

Prof.^a Dr.^a Mabelle de Freitas Monteiro
Universidade Paulista - UNIP

Prof.^a Dr.^a Mônica Grazieli Corrêa
Universidade Paulista – UNIP

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao universo por manifestar meus desejos e sonhos em realidade, a toda conspiração energética que agiu positivamente em mim, a todos os meus mentores e guias por me iluminarem e me manterem sempre forte;

Sou muito grata pelo universo ter concedido à minha vida minha gata Chanel, meu ponto de equilíbrio e sempre companheira nas varadas noites de estudo, de tristeza e de felicidade;

Agradeço aos meus pais, pelos quais me sinto abençoada, por todo amor, educação, e que permitiram, se dedicaram, acompanharam e me apoiaram todos os dias para concluir essa etapa da minha vida; por compreenderem a minha ausência enquanto me dedicava à realização desta revisão de literatura e durante toda a minha caminhada acadêmica odontológica;

Agradeço aos meus irmãos, primos e tias, que me apoiam desde o começo e confiaram em mim, sendo meus pacientes;

Agradeço ao meu namorado, fiel companheiro e amigo, que me deu total confiança e força para seguir meu caminho;

Agradeço a todos os colegas que passaram pela minha vida e que, de alguma forma, me fizeram evoluir;

Agradeço a todos os amigos e amigas que cruzaram meu caminho e que durante toda essa jornada estiveram junto a mim, fazendo com que todos os dias eu pudesse acreditar em minha capacidade e, principalmente, por se dedicarem a me ajudar, independentemente do que fosse;

Agradeço à minha amiga e inspiradora Victoria Machado de Oliveira Vilas Boas, com quem convivi no intuito de trabalharmos e estudarmos juntas. Hoje, somos mais próximas do que imaginávamos, e ela sempre me incentivou, estimulou, acalmou e confiou em mim para o tão esperado momento final.

Não posso deixar de agradecer a todos os funcionários dos prédios da UNIP Indianópolis, que trabalham com muito esforço para nosso conforto e bem-estar, principalmente aos funcionários da Clínica Odontológica UNIP – São

Paulo(Indianópolis), que estão sempre disponíveis para nos ajudar em momentos e situações do dia a dia corrido. Eles merecem toda a nossa eterna gratidão: Léo, Wilson, Marcos Sérgio, Diego, Marcos, Mário, Bahia (Valdemir), Carol, Claudete, Elenice, Émerson, Jonas, Wilsinho, Wagner, Kleber, Oscar, Regina e Sérgio. E minha sincera gratidão às "tias" da limpeza, que organizam e higienizam toda a desordem deixada pelos jovens estudantes de odontologia.

E, por fim, agradeço a todos os meus professores, tão importantes e maravilhosos que puderam me passar todo o conhecimento e a informação necessária para o meu crescimento acadêmico, profissional e humano. Sou e serei eternamente grata a todos e, deles, guardarei boas memórias e lembranças. A eles, que, de alguma forma, me ensinaram, me ajudaram, me pegaram no pé, a toda a equipe de periodontia composta de alunos, colegas e professores: Prof.^a Dra. Monica Grazielli, Prof. Dr. Marcio Casati, Prof. Dr. Fabiano Cirano, Prof.^a Dra. Suzana Pimentel e Prof.^a Dra. Raissa Micaella Marcello Machado, profissionais exemplares que me ensinaram a ser uma aluna humana e profissional diferenciada, transmitindo todos os conhecimentos e informações importantes para a minha vida. E à Prof.^a Dra. Mabelle de Freitas Monteiro, por quem tive a honra de ser orientada durante quase todo o período do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Gratidão.

RESUMO

A doença periodontal é uma doença inflamatória multifatorial, desencadeada pelas agressões do biofilme bacteriano. Nesse sentido, as alterações no perfil inflamatório e na expressão de algumas moléculas reguladoras da resposta do hospedeiro podem promover o desenvolvimento da doença periodontal e intervir no reparo periodontal e ósseo. Este projeto objetivou estudar a influência da AnxA1, uma molécula pró-resolução de inflamação, no desenvolvimento da doença periodontal e em seu efeito sobre a resolução de lesões periodontais, analisando o padrão da perda óssea. Doze camundongos C57BL/6 fêmeas, sendo 6 delas nocauteadas para AnxA1 (grupo teste - AnxA1^{-/-}, camundongos fêmeas) e 6 com expressão normal (grupo controle -WT), foram submetidos à indução de periodontite experimental por ligadura por 12 dias e foram eutanasiados para a realização das análises. Outros 6 camundongos teste e 6 controle receberam ligadura por um período de 12 dias, tiveram a ligadura removida e, após 7 dias, foram eutanasiados para avaliar a importância da AnxA1 na resolução da inflamação. Após a eutanásia, a mandíbula foi utilizada para avaliação da perda óssea por morfometria. Nos animais que passaram pela indução da periodontite, ambos os grupos apresentaram perda óssea com médias de $0,38 \pm 0,09$ mm para AnxA1 e $0,42 \pm 0,09$ mm para o grupo controle, mas sem diferença entre eles ($p > 0,05$). Para os camundongos que passaram por um período de resolução após a indução da periodontite experimental observou-se uma perda óssea de $0,21 \pm 0,07$ mm para AnxA1 e $0,22 \pm 0,13$ mm para o grupo controle, mas sem diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). Em conclusão, o estudo de indução experimental e resolução da periodontite por ligadura em camundongos nocauteados para AnxA1 não confirmou a relação dessa molécula com a perda óssea periodontal e com o reparo ósseo.

Palavras-chave: Anexina. Periodontite. Perda óssea. Morfometria.

ABSTRACT

The periodontal disease is a multifactorial inflammatory condition triggered by the aggression of bacterial biofilm. In this context, changes in the inflammatory profile and the expression of some regulatory molecules of the host's response can promote the development of periodontal disease and influence periodontal and bone repair. This project aimed to study the influence of AnxA1, a pro-resolution molecule of inflammation, in the development of periodontal disease and its effect on the resolution of periodontal lesions, analyzing the pattern of bone loss. Twelve female C57BL/6 mice, with 6 of them being AnxA1 knockouts (test group - AnxA1^{-/-}, female mice) and 6 with normal expression (control group - WT), underwent experimental periodontitis induction by ligature for 12 days and were euthanized for analysis. Another 6 test mice and 6 controls received ligature for 12 days, had the ligature removed, and were euthanized after 7 days to assess the importance of AnxA1 in inflammation resolution. After euthanasia, the mandible was used to evaluate bone loss by morphometry. In animals that underwent periodontitis induction, both groups presented bone loss with averages of 0.38 ± 0.09 mm for AnxA1 and 0.42 ± 0.09 mm for the control, but with no difference between them ($p > 0.05$). For mice that went through a period of resolution after ligature removal, a bone loss of 0.21 ± 0.07 mm for AnxA1 and 0.22 ± 0.13 mm for the control group was observed, but without differences between the groups ($p > 0.05$). In conclusion, the study of experimental induction and resolution of periodontitis by ligation in AnxA1 knockout mice did not confirm the relationship of this molecule with periodontal bone loss and bone repair.

Key-words: Annexin. Periodontitis. Bone loss. Morphometry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 CONCLUSÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	11

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial desencadeada pelo desequilíbrio entre a resposta inflamatória do hospedeiro e as agressões provocadas pelo biofilme (Lamont; Koo; Hajishengallis, 2018). Dessa forma, eventos com a capacidade de alterar a resposta imune ou os eventos inflamatórios ou anti-inflamatórios no periodonto têm a capacidade de interferir na periodontite e no processo de perdas ósseas.

Evidências recentes relacionam a presença de um biofilme disbiótico (Hajishengallis; Lamont, 2012) e a falha em resolver o processo inflamatório local (Van Dyke; Sima, 2020) como componentes-chave para o colapso periodontal e consequente perda óssea. Além disso, uma relação de *feedback* positivo entre disbiose e inflamação também já foi relatada (Hajishengallis; Darveau; Curtis, 2012).

Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa avaliando o proteoma salivar em pacientes periodontais e seus descendentes, comparados com pacientes periodontalmente saudáveis e seus filhos, permitiu a identificação de possíveis alvos proteicos relacionados à susceptibilidade à periodontite (Casarin et al., 2023). Entre as moléculas identificadas, a anexina A1 (AnxA1) se destacou por ser sete vezes menos expressa em crianças com pais periodontais do que em filhos de pais saudáveis, ao mesmo tempo que também se apresentou menos expressa em pacientes com periodontite do que em saudáveis. Tal estudo se utilizou de análise proteômica e de validações imunoenzimáticas em saliva e cultura celular para sugerir a AnxA1 como um potencial marcador de susceptibilidade para periodontite. A AnxA1 é uma molécula diretamente envolvida na resposta imune inata e adaptativa no recrutamento e na apoptose de neutrófilos, na reprogramação de macrófagos para o fenótipo M2 e no processo de resolução da inflamação (Sugimoto et al., 2016), e sua atividade está relacionada à ligação aos receptores ALX/FPR2, os mesmos utilizados pelas resolvinas D1 e D3 e a lipoxina A4, moléculas já relacionadas com a patogênese da doença periodontal (Freire; Van Dyke, 2013; Mustafa et al., 2013). Ademais, sua redução/ausência está relacionada com diversas outras doenças inflamatórias como aterosclerose, doença inflamatória intestinal, colite e artrite reumatoide (Gobbetti; Cooray, 2016). Apesar da grande plausibilidade biológica do envolvimento da AnxA1 na susceptibilidade e no desenvolvimento da periodontite, sua relação com a patogênese da doença periodontal nunca foi testada. Nesse sentido, estudos em

animais e ensaios clínicos são necessários para confirmar resultados de estudos prévios e se a AnxA1 pode ser usada como fator discriminante entre pacientes periodontais e indivíduos periodontalmente saudáveis.

Considerando o inicialmente exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a relação da AnxA1 com a patogênese da doença periodontal e com a resolução da inflamação local em um estudo de periodontite experimental em camundongos *knockouts* para AnxA1.

2 CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, o estudo de indução experimental e resolução da periodontite por ligadura em camundongos nocauteados para AnxA1 não confirmou a relação dessa molécula com a perda óssea periodontal e com o reparo ósseo.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- Casarin RCV, Salmon CR, Stolf CS, Paz HES, Rangel TP, Domingues RR, et al. Salivary annexin A1: A candidate biomarker for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2023 Jul;50(7):942-51.
- Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000.* 2013 Oct;63(1):149-64.
- Gobbetti T, Cooray SN. Annexin A1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. *Biol Chem.* 2016 Oct 1;397(10):981-93.
- Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Oct;10(10):717-25.
- Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012 Dec;27(6):409-19.
- Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Dec;16(12):745-59.
- Mustafa M, Zarrough A, Bolstad AI, Lygre H, Mustafa K, Hasturk H, et al. Resolvin D1 protects periodontal ligament. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013 Sep 15;305(6):C673-9.
- Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LP. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *J Immunol Res.* 2016;2016.
- Van Dyke TE, Sima C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: Is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? *Periodontol 2000.* 2020 Feb;82(1):205-13.