

Roberta Santos Tunes

**Influência da periodontite crônica severa frente ao
controle metabólico bem como do tratamento
periodontal na resposta imunológica de indivíduos
diabéticos tipo 2**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Doutor em Clínica
Odontológica na Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Getúlio da Rocha Nogueira Filho
Co-Orientador(a): Profa. Dra. Maria Cristina Foss de Freitas

Piracicaba
2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

T834 Tunes, Roberta Santos.
i Influência da periodontite crônica severa frente ao controle metabólico bem como do tratamento periodontal na resposta imunológica de indivíduos diabéticos tipo 2. / Roberta Santos Tunes. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Getúlio da Rocha Nogueira Filho, Maria Cristina Foss de Freitas.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Monócitos. 2. Diabetes Mellitus. 3. Citocinas. 4. Inflamação. 5. PCR em tempo real. 6. ELISA. I. Nogueira Filho, Getúlio da Rocha. II. Freitas, Maria Cristina Foss de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Influence of chronic severe periodontitis in the face of metabolic control, and of periodontal therapy in the immune response of diabetic type 2 individuals

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Monocytes. 2. Diabetes Mellitus. 3. Cytokines. 4. Inflammation. 5. Real-time PCR. 6. ELISA

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Getúlio da Rocha Nogueira Filho, Ricardo Guimarães Fischer, Sérgio Luis Scombatti de Souza, Francisco de Assis Pereira, Antônio Wilson Sallum

Data da Defesa: 27-07-2009

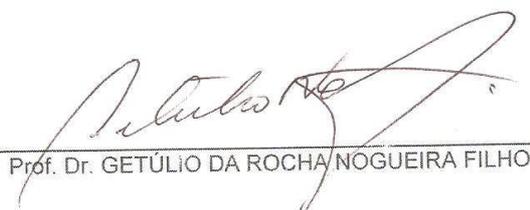
Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



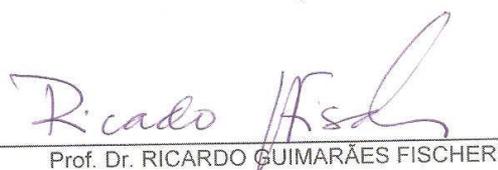
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 27 de Julho de 2009, considerou a candidata ROBERTA SANTOS TUNES aprovada.



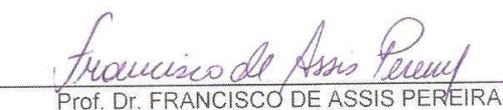
Prof. Dr. GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO



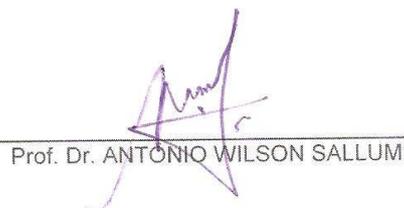
Prof. Dr. RICARDO GUIMARÃES FISCHER



Prof. Dr. SÉRGIO LUIS SCOMBATTI DE SOUZA



Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS PEREIRA



Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM

Dedicatória

Dedico este trabalho,

À Deus,

Que me deu o maior dos presentes, o dom da vida, e cuja fé me dá força e coragem para vivê-la como se os milagres não existissem, mas também esperança, alegria e sabedoria para vivê-la como se tudo fosse um milagre.

Aos meus pais, Jeanne e Urbino

Base e alicerce de tudo! Exemplos de amor incondicional, caráter, dedicação, determinação, perseverança, disciplina, coragem, força, honestidade, sinceridade, afeto, carinho, bondade, sabedoria, humildade, profissionalismo, enfim, humanidade! E foi baseado nestes exemplos que me transformei no que sou. A vocês devo TUDO! Amo vocês, meus grandes mestres da VIDA e magnífica fonte de inspiração!

Ao meu irmão Beto,

Obrigada por todo carinho, atenção e compreensão desprendidos do seu jeitinho durante todo este período de convívio próximo ou mesmo distante. Te amo muito! Torço pelo seu sucesso hoje e sempre.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**, Magnífico Reitor da UNICAMP.

Ao **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**, Digníssimo Diretor da FOP.

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, Coordenador de Pós-graduação e à Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica.

À **FAPESB**, pelo auxílio financeiro para realização deste estudo e pela concessão da bolsa de estudo.

À **FAEPA**, pelo auxílio financeiro para a realização deste estudo.

À minha co-orientadora, amiga, mãe, irmã, colega, enfim, **Profa. Dra. Maria Cristina Foss de Freitas**, obrigada pelo suporte incondicional prestado, de todas as formas, durante todo este período em que estivemos juntas na elaboração deste trabalho. Obrigada por acreditar nas minhas potencialidades médica e odontológica e ter me dado a oportunidade de realizar o sonho de aplicar na prática todos os meus conhecimentos, integrando ambas as áreas da saúde, na confecção deste estudo. Você me enxergou como sou! Para mim, você é o exemplo de jovem profissional, professora, pesquisadora, esposa, mãe, filha, enfim, de uma mulher, que com muito esforço, maturidade, alegria e leveza, sabe conciliar todas as áreas da vida, e por isso, espelho-me em você! Obrigada ainda por me deixar dispor do convívio e da sua intimidade familiar, o que tornou este caminho muito mais leve, alegre e seguro! Obrigada, Cris, por você ter cruzado o meu caminho! Sou eternamente grata a você!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Getúlio da Rocha Nogueira Filho**, pela a oportunidade do doutorado, da bolsa, bem como da idéia inicial deste projeto. Obrigada por ter, mesmo à distância, me disposto da sua atenção, apoio e presteza e por ter apoiado e me confiado a realização deste projeto de doutorado no HC-FMRP, vislumbrando a concretização de um projeto de maior alcance para a comunidade científica odontológica. Obrigada pela a sua ajuda durante todo o meu processo de formação como periodontista e por seu incentivo à minha carreira acadêmica, que se concretiza com a finalização deste doutorado.

À **Profa. Dra. Norma Tiraboschi Foss**, por ter disponibilizado seu laboratório, recursos financeiros, e assim, tornado possível a concretização deste projeto. Muito além disso, sou profundamente grata a todo carinho e atenção concedidos a mim, acolhendo-me, na sua família.

À **Profa. Dra. Margaret Castro**, por ter disponibilizado o seu laboratório e recursos financeiros para a realização deste projeto. Porém, acima de tudo, sou grata à sua amizade, consideração e por ter me deixado compartilhar das preciosidades humanas e do aconchego da sua equipe de trabalho.

Aos **Professores Drs. da divisão de Endocrinologia e Metabologia do departamento de clínica médica da FMRP, Milton César Foss, Airton Moreira, Sonir, Franzé, Léa, Patrícia e Francisco** por todo respeito como colega, aluna de pós-graduação e ser humano, prestados à minha pessoa, bem como pelo aconchego e carinho que sempre me fizeram sentir parte da equipe. Meu muito obrigada a todos vocês!

À **Profa. Dra. Marilena Komesu**, pela grande parceria espiritual e colaboração profissional na realização deste trabalho, uma vez que possibilitou o tratamento dos pacientes no DAPE, além de representar um grande exemplo de pessoa humana, fazendo parte do meu crescimento pessoal.

Aos **Residentes da Endocrinologia**, bem como **da Clínica Médica**, além, dos **enfermeiros, técnicos de enfermagem, alunos da nutrição**, muito obrigada por toda dedicação, ajuda e empenho prestados na realização deste trabalho. Com certeza este projeto, sendo multidisciplinar não poderia se concretizar sem a participação ativa de vocês.

À **Henrique Ceretta**, mestrando do CEMEQ, muito obrigada pela realização da análise estatística dos resultados deste trabalho de maneira altamente responsável, prestativa, eficiente e solidária. Sem você este conhecimento não poderia ser construído.

Aos **Professores Drs. da área de Periodontia da FOP/Unicamp**, pela oportunidade do doutorado, por suas participações em minha formação acadêmica e pelos conhecimentos transmitidos.

À minha querida tia **Wanda Carvalho**, que desde **muito tempo** vem me acompanhando e participando ativamente do meu progresso pessoal, espiritual e profissional. Com certeza, tia, não foi por acaso que a vida promoveu este nosso reencontro! Você representa a voz que acalenta, o peito que afaga, a mão que acaricia, o olhar que compreende e consola, a mente que entende e aconselha, enfim, o coração que ama e acolhe. Tenho por você o amor que uma filha tem por sua mãe. Espero que possa tê-la ao meu lado, auxiliando-me por toda a minha caminhada, que só está começando. Obrigada por tudo! **Vá desculpando qualquer coisa.**

Aos meus avós, **Estér, Maria de Lourdes e Zeca** (in memorian), agradeço por todo amor, carinho e atenção dedicados a mim durante toda a minha vida e obrigada por terem sido edificadores de famílias tão bem estruturadas, das quais sou um fruto. Obrigada ainda por todo incentivo e torcida à conquista destes títulos, apesar do sacrifício de não ter desfrutado da companhia de vocês no momento final de suas vidas.

Aos **meus familiares**, tios, primos e inha, que sempre acreditando e torcendo por mim, têm participado de todas as minhas conquistas. Aos meus familiares de coração e

espirituais adquiridos durante esta jornada, obrigada por todo apoio, incentivo, carinho, cumplicidade, dedicação e compreensão concedidos para a concretização deste sonho. Agradeço, em especial à tia **Greice**, irmã um pouco mais velha e grande amiga, que com muito carinho e dedicação participou ativamente de todos os momentos da minha vida, sendo a grande tia coruja que é. Ao tio **Carlinhos**, agradeço todo o incentivo à carreira odontológica acadêmica, sendo grande exemplo de cirurgião-dentista e professor universitário. Ao tio **Osman** por ser meu grande exemplo e incentivador da carreira médica.

À minha nova família ribeirão-pretana, configurada nos grandes irmãos **Kika, Nati e Fê**. Vocês simplesmente tornaram minha vida em Ribeirão muito mais feliz, na medida em que sabia que tinha com quem contar e com quem compartilhar, em qualquer momento que precisasse. Vocês me mostraram, ainda mais, o valor de uma grande amizade e parceria, que, com certeza nunca mais vai acabar. Amo vocês de paixão!

Às minhas queridas do meu coração **Mary, Pati, Gê e Thai**, obrigada por todo suporte emocional, profissional e mesmo material que me ofereceram durante este período. Realmente poder contar com a amizade e a consideração de vocês me fez um ser humano muito mais feliz e completo. Este é só o começo de uma parceria não só profissional, já que a periodontia nos uniu, mais de uma vida cheia de alegrias e aventuras, pois ainda temos muito que nos divertir juntas. Amo vocês!

À grande amiga baiana e piracicabana **Thai Gonçalves** por toda a paciência, dedicação e compreensão durante a nossa convivência em Piracicaba. Se já era sua fã em Salvador, convivendo com você só me trouxe a certeza da grande pessoa humana com valores tão nobres, que você é e que carrego no meu coração para sempre. Você me carregou no colo e me ajudou a enfrentar um dos anos mais difíceis da minha vida. Espero tê-la sempre como minha grande amiga e parceira profissional.

À minha grande amiga e companheira **Mani**, que se já éramos amigas na faculdade de Medicina, nos tornamos irmãs em Ribeirão. Sua alegria, força e carinho foram, sem dúvida, um grande alicerce para suportar a ausência da minha família durante este período. Obrigada pela sua grande amizade!

À **Ceci**, minha maíinha ribeirão-pretana, que não só me ensinou com maestria como trabalhar impecavelmente em um laboratório, mas me acolheu no seio da sua família oferecendo-me o carinho, a preocupação e o aconchego que esta mãe zelosa oferece para suas filhotas. Obrigada por me deixar sentir, muitas vezes, irmã da Manu e da Cami! Obrigada ainda pelo trabalho árduo prestado para a concretização deste trabalho!

Às preciosidades do laboratório da Endocrinologia, nas pessoas da **Lê, do Deilson, do Fábio, da Carol, da Aniete, da Rô e da Marina**. Obrigada por todo apoio e carinho prestados durante este período. Trabalhar com vocês foi um verdadeiro prazer. Muito obrigada por me fazer sentir parte desta extraordinária equipe não só profissional, mas humana.

Às amigas **Aninha, Carol e Zildinha** obrigada pela amizade de vocês e por todas as graças espirituais compartilhadas! Poder contar com vocês tornou esta jornada muito mais segura! Obrigada, Aninha, por ter me possibilitado compartilhar do aconchego do seu lar e da sua intimidade na etapa final deste projeto, mostrando-se cada vez mais a pessoa especial que é.

Aos meus professores, monitores da Especialização, **Silvinha, Mônica, Sandro, Cissa e Claudinha** que de forma brilhante e muito carinhosa me ajudaram a dar os primeiros passos na Periodontia. Não tenho vocês só como colegas, mas como mestres e, acima de tudo, amigos pessoais, o que torna muito especial nossa relação, refletindo na formação de uma grande equipe de trabalho. Agradeço em especial às amigas e colegas de equipe Cissa e Mônica que tanto me ajudaram na finalização deste projeto, assumindo várias das minhas responsabilidades em sala de aula.

Às professoras **Jane, Jacque** e, em especial à grande parceira de trabalho e amiga que espero ter conquistado, **Gabriela**, por toda a ajuda e responsabilidades assumidas em sala de aula, para que eu finalizasse e tornasse real todo este esforço e sonho. Obrigada pela cumplicidade Gabi.

À amiga **Teo**, obrigada por esta amizade tão linda e de tantos anos que nos tornou não só amigas, mas cúmplices, confidentes, enfim, parentes espirituais. Obrigada por todo apoio incondicional durante a etapa mais difícil, porém mais enriquecedora da minha vida. Sei que sempre poderei contar com você, minha irmãzinha.

Às amigas **Van, Nanda, Aninha e Piti**, companheiras inseparáveis desde a faculdade, obrigada por poder contar com vocês em todos os momentos da minha vida, inclusive nos mais importantes, como na conquista destes títulos. A distância só fortaleceu os nossos elos, nos mostrando o verdadeiro significado da nossa amizade, que tem nos ajudado a enfrentar grandes obstáculos nas nossas vidas. Espero que essa amizade verdadeira, surgida por intermédio da Odontologia, seja sempre fortalecida nela e ainda mais fora dela. Adoro e torço sempre por vocês.

À amiga **Beta Naves**, que não só no nome somos parecidas mas também na alma. Obrigada pelo apoio incondicional à realização deste curso. Você é e sempre será uma amiga especial!

À amiga **Pati Veiga**, que me mostrou que a relação aluno-professor, baseada na dedicação e respeito, pode se transformar em uma bela amizade. Obrigada toda a assistência, apoio, carinho que tem me prestado desde que nos conhecemos. Espero poder contar com esta amizade hoje e sempre. Te adoro!

À grande amiga e terapeuta **Luíza Carrer**, obrigada não só pela grande revolução íntima que me proporcionou, mas pela grande amizade, carinho, compreensão e

acolhimento dedicados durante toda esta jornada. Você me ajudou a me enxergar, valorizar, aceitar e respeitar como verdadeiramente sou. Você está no meu coração! Obrigada por tudo.

À **Sandra**, que com amor e zelo tomou conta de mim e da minha casa, compartilhando meus problemas e alegrias, e, assim, tornando-se mais que uma funcionária, uma amiga. Muito Obrigada.

À atenciosa funcionária **Eliete**, pela presteza em auxiliar a todos da Periodontia.

Aos pacientes desta tese. Obrigada pela confiança.

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para realização deste trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

"Anyway,

People are often unreasonable, illogical, and self-centered,

Forgive them anyway.

If you are kind, people may accuse you of selfishness and ulterior motives,

Be kind anyway.

If you are successful, you will win some false friends and some true enemies,

Succeed anyway.

If you are honest and frank, people may cheat you,

Be honest and frank anyway.

What you spend years building, someone could destroy overnight,

Build anyway.

If you find serenity and happiness, some people may be jealous,

Be happy anyway.

Give the world the best you have, and it may never be enough,

Give the world the best you've got anyway.

You see, in the final analysis it is between you and GOD,

It was never between you and them anyway."

Mother Teresa

Resumo

Este estudo objetiva verificar a influência sistêmica da periodontite crônica severa frente ao controle metabólico bem como do tratamento periodontal na resposta imunológica de indivíduos diabéticos tipo 2 através da análise da expressão gênica e protéica de citocinas por células mononucleares aderentes de sangue periférico. Foram selecionados 20 pacientes divididos em: grupo teste – 10 diabéticos tipo 2 com periodontite crônica severa e controle metabólico inadequado; grupo controle – 10 diabéticos tipo 2 sem periodontite e controle metabólico inadequado. Primeiramente, os pacientes foram hospitalizados por 8 dias para a obtenção de um controle metabólico adequado, permanecendo inalterada a condição periodontal nesta fase. Posteriormente, o grupo teste foi submetido à terapia mecânica em estágio único associada à antibioticoterapia sistêmica com amoxicilina e metronidazol. Amostras sanguíneas foram obtidas no primeiro e último dias de hospitalização, e 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal para a análise imunológica. Para avaliação dos parâmetros laboratoriais relacionados ao controle metabólico, como HbA1c, foram obtidas amostras sanguíneas antes e após a hospitalização, e 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal. Culturas de um total de $2,5 \times 10^6$ células/mL mononucleares aderentes, foram realizadas por 24h na presença e ausência de LPS ($5 \mu\text{g/mL}$). As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 foram detectadas nos sobrenadantes das culturas através do ELISA, enquanto que a sua expressão gênica foi verificada por PCR em tempo real. Enquanto o controle metabólico diminuiu a secreção de TNF- α ($p=0,02$), IL-1 β ($p=0,03$), IL-8 ($p=0,04$) e IL-6 ($p=0,02$) nos sobrenadantes das células estimuladas do grupo controle, os pacientes do grupo teste apresentaram níveis maiores destas citocinas após o controle metabólico quando comparados ao grupo controle ($p<0,01$ ou $p=0,01$). O controle metabólico bem como a infecção periodontal severa, apesar de não terem influenciado a expressão gênica das citocinas próinflamatórias pelas células estimuladas de ambos os grupos, aumentou a expressão gênica em 2 vezes da IL-8 ($p=0,04$) pelas células basais do grupo teste, evidenciando-se uma hipoexpressão, respectivamente, de 4, 3 e 11 vezes, da IL-1 β , IL-8 e IL-6 ($p<0,01$ ou $p=0,01$) por estas células no grupo teste em relação ao grupo controle, antes do controle metabólico. Enquanto o tratamento periodontal promoveu uma

diminuição da secreção de TNF- α ($p=0,04$) pelas células estimuladas do grupo teste, o mesmo não influenciou a expressão gênica das citocinas nestas condições. O controle metabólico associado ao tratamento periodontal promoveu um aumento da expressão gênica em 6 e 5 vezes, respectivamente da IL-1 β e IL-6 ($p<0,01$), pelas células basais do grupo teste. Enquanto, o controle metabólico promoveu reduções na HbA1c de 1% no grupo controle ($p=0,04$) e 1,1% no grupo teste ($p=0,03$), o tratamento periodontal promoveu uma redução adicional de 1,6% na HbA1c do grupo teste. Assim, demonstrou-se o papel modulador da periodontite crônica severa na resposta imunológica dos pacientes diabéticos tipo 2, mantendo a capacidade reativa próinflamatória das células mononucleares frente ao controle metabólico, e que o tratamento desta infecção local pode exercer efeitos sistêmicos, diminuindo o potencial próinflamatório das células mononucleares circulantes, contribuindo para a melhor sensibilidade insulínica e facilitando o controle metabólico destes indivíduos.

Palavras chave: monócitos; diabetes; periodontite; citocinas.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the systemic influence of chronic severe periodontitis in relation to metabolic control and of periodontal therapy in the immune response of diabetic type 2 patients through the evaluation of cytokine protein and gene expression in human adherent peripheral blood mononuclear cells. Twenty patients were studied, distributed in 2 groups: test group - 10 type 2 diabetic patients with severe chronic periodontitis and inadequate metabolic control; control group - 10 type 2 diabetic patients without periodontitis and inadequate metabolic control. First, all participants were hospitalized for 8 to 10 days to obtain adequate metabolic control, without any periodontal condition alterations. Afterwards, the test group received one-stage non-surgical periodontal therapy associated with Amoxicilin and Metronidazole. Blood samples were obtained on the first and last day of hospitalization, and 4 to 6 weeks after periodontal therapy for immunological analyses. For metabolic parameters analyses, like HbA1c, blood samples were obtained before and after hospitalization, and 3 to 6 weeks after periodontal therapy. Mononuclear cells were isolated by gradient density using Ficoll-Hypaque®. A total of 2.5×10^6 adherent cells/mL were cultivated during 24hs in the presence or absence of LPS. The cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6 were quantified in cell culture supernatants using ELISA, while their gene expression was verified by Real Time PCR. It was demonstrated that metabolic control promoted a reduction of TNF- α ($p=0,02$), IL-1 β ($p=0,03$), IL-8 ($p=0,04$) and IL-6 ($p=0,02$) levels in control group supernatants stimulated cells, while the test group showed increased levels of that cytokines compared to the control group after metabolic control ($p<0,01$ or $p=0,01$). The metabolic control as the presence of chronic severe periodontal infection, although did not affect the gene expression of that cytokines by stimulated cells from both groups, increased IL-8 gene expression 2 times ($p=0,04$) by test group unstimulated cells while it was verified a lower gene expression respectively of IL-1 β , IL-8 and IL-6 ($p<0,01$ or $p=0,01$) by 4, 3, and 11 times related to the control group, before metabolic control. Moreover, periodontal therapy promoted a reduction of TNF- α ($p=0,04$) levels in test group supernatants stimulated cells, although did not affect the gene expression of the cytokines studied by these cells. There

was observed combined effect of metabolic control and periodontal therapy on IL-1 β and IL-6 ($p < 0,01$) gene expression, that were increased by 6 and 5 times, respectively, by test group unstimulated cells. While metabolic control promoted reductions of 1% and 1,1% in HbA1c levels of control and test group respectively, periodontal therapy promoted an additional reduction of 1,6% in HbA1c levels of test group. Therefore, it was suggested that chronic severe periodontal infection can modulate the immunological response of type 2 diabetic patients, through the maintenance of the inflammatory reactive capacity of mononuclear cells even if in the presence of metabolic control, and that the local infection treatment can promote systemic effects, through decreasing the pro-inflammatory potential of mononuclear circulating cells, helping to restore insulin sensitivity, resulting in an improved glycemic control in those individuals.

Key words: mononuclear cells; diabetes; periodontitis; cytokines.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	07
2.1. Papel da resposta inflamatória crônica induzida por citocinas através da ativação do sistema imunológico na patogênese do diabetes tipo 2	07
2.2. Papel da resposta inflamatória crônica induzida por citocinas através da ativação do sistema imune inato na patogênese da doença periodontal crônica	20
2.3. Influência do diabetes tipo 2 na patogênese da doença periodontal crônica	25
2.4. A influência da doença periodontal na inflamação crônica de baixo grau característica do diabetes tipo 2	30
3. PROPOSIÇÃO	39
3.1. Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Seleção dos pacientes	41
4.2. Delineamento do estudo	42
4.3. Diagnóstico e classificação das doenças periodontais	42
4.4. Diagnóstico clínico e avaliação do controle metabólico do Diabetes Mellitus	45
4.5. Avaliação das complicações crônicas do Diabetes Mellitus tipo 2	46
4.6. Intervenção clínica I: Internação hospitalar para obtenção do controle metabólico	47
4.7. Intervenção clínica II: Tratamento Periodontal	48
4.8. Coleta de sangue para a cultura de células mononucleares aderentes do sangue periférico	49
4.9. Cultura das células mononucleares aderentes do sangue periférico	50
4.10. Detecção de citocinas TNF-α, IL-1β, IL-8 e IL-6 em sobrenadantes de culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico	51
4.10.1. Preparo da curva padrão	52
4.10.2. Técnica do ELISA	53
4.11. Avaliação da expressão gênica das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-8 e IL-6 por células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas ou não por LPS	54
4.11.1. Extração do RNA total	54
4.11.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) - Reação de transcrição reversa	55
4.11.3. PCR em tempo real (q-PCR)	56
4.12. Análise Estatística	59
5. RESULTADOS	63
5.1. Caracterização clínica da amostra	63
5.2. Caracterização periodontal da amostra	75
5.3. Quantificação de citocinas em sobrenadantes de culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico (método ELISA)	79
5.3.1. Análise dos resultados obtidos da quantificação das citocinas	

nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas e não estimuladas por LPS	79
5.3.2. Análise dos resultados das quantificações das citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas por LPS	83
5.3.2.1. Comparações das quantificações das citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico considerando-se a amostra total, sem a divisão entre os grupos	83
5.3.2.2. Comparações das quantificações das citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico considerando-se os grupos estudados e os tempos observacionais analisados em relação às intervenções realizadas	85
5.4. Quantificação relativa da expressão gênica de citocinas pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico em cultura (método PCR em tempo Real - qPCR)	90
5.4.1. Análise dos resultados da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico em culturas estimuladas e não estimuladas por LPS	90
5.4.2. Análise dos resultados da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico de culturas estimuladas ou não por LPS (culturas BAS e LPS), considerando-se a amostra total, sem a divisão entre os grupos	94
5.4.3. Análise dos resultados da expressão relativa do genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico de culturas não estimuladas por LPS (culturas BAS), considerando-se os grupos estudados e os tempos observacionais analisados em relação às intervenções realizadas	97
5.4.4. Análise da expressão relativa do genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico de culturas estimuladas por LPS (culturas LPS), considerando-se os grupos estudados e os tempos observacionais analisados em relação às intervenções realizadas.	103
6. DISCUSSÃO	109
7. CONCLUSÕES	143
REFERÊNCIAS	145
ANEXO 1	166
ANEXO 2	167
APÊNDICE 1	168
APÊNDICE 2	169
APÊNDICE 3	170
APÊNDICE 4	171
APÊNDICE 5	172
APÊNDICE 6	173

APÊNDICE 7	174
APÊNDICE 8	175
APÊNDICE 9	176
APÊNDICE 10	177

1. Introdução

O diabetes mellitus é uma síndrome clínica crônica, composta por um grupo de desordens, clinicamente e geneticamente heterogêneas, que afetam o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Sua principal característica é a elevação anormal dos níveis de glicose sanguíneos. Esta hiperglicemia decorre de uma deficiência insulínica causada por defeitos de secreção deste hormônio por uma disfunção na célula β pancreática e/ou por uma ineficiente ação periférica decorrente de uma resistência insulínica no fígado e nos músculos. Esta desregulação metabólica é comumente associada a alterações do metabolismo do tecido adiposo (Graves *et al.*, 2006; Mealey & Oates, 2006).

O diabetes mellitus afeta cerca de 21 milhões de Americanos, incluindo mais de 9% da população adulta, apresentando um grande impacto na saúde da população, uma vez que é responsável por uma alta morbidade e mortalidade nos indivíduos afetados, como também por um elevado custo financeiro para o sistema de saúde público (Graves *et al.*, 2006; Mealey & Oates, 2006). É estimado que, em muitos países, como a Índia, China e Estados Unidos, que apresentam os maiores números de pacientes diabéticos atualmente (sendo >90% de diabéticos tipo 2), a prevalência desta doença duplique nos próximos 20 anos (Wild *et al.*, 2004). No Brasil, apesar da falta de pesquisas recentes acerca da prevalência do diabetes na população, de acordo com o último censo realizado em 1988, foi observada uma prevalência de 7,6% de diabetes mellitus e 7,8% de condições pré-diabéticas, como intolerância à glicose, na população urbana brasileira com idade entre 30 e 69 anos (Malerbi & Franco, 1992). Dez anos depois, em 1997, um novo censo de diabetes realizado na cidade de Ribeirão Preto, constatou a prevalência de 12,1% de diabetes mellitus e de 7,7% de intolerância à glicose na população urbana com idade entre 30 e 69 anos, demonstrando um aumento de 59% na prevalência do diabetes e a manutenção de prevalência equivalente de intolerância à glicose, quando comparados os dados (Torquato *et al.*, 2003). Segundo Wild *et al.* (2004), no ano de 2000, a população total de diabéticos no Brasil foi estimada em 4,6 milhões de pessoas, ocupando o oitavo lugar entre os países de maior prevalência de diabetes no mundo. Para 2030 a previsão é de que o Brasil atinja

uma população de 11,3 milhões de pessoas acometidas, subindo para o sexto lugar nesta lista. Cerca de 85 a 90% dos casos de diabetes são de diabéticos tipo 2, enquanto que o diabetes tipo 1 acomete cerca de 5 a 10% dos pacientes (Wild *et al.*, 2004; Mealey & Oates, 2006).

O diabetes mellitus tipo 2 é uma doença multifatorial com fatores de risco sociais, comportamentais e ambientais que atuam junto a uma forte herança poligênica. Apesar da poderosa interferência genética indicada em 100% dos gêmeos homozigóticos, o ambiente desempenha um importante papel na patogênese deste tipo de diabetes. Diante disto, é que se observa uma epidemia global de diabetes mellitus tipo 2, incentivada por um aumento da população, da expectativa de vida, da urbanização, da obesidade e do sedentarismo (Fernandez-Real & Pickup, 2007). O diabetes tipo 2 é, então, causado por uma resistência a insulina combinada a uma incapacidade de produção de uma quantidade de insulina adicional para compensar esta resistência. Este tipo de diabetes está comumente associado à obesidade, seu principal fator de risco ambiental, que contribui para a resistência periférica à ação da insulina, através dos níveis elevados de ácidos graxos livres derivados dos adipócitos, os quais inibem a utilização de glicose, síntese de glicogênio e glicólise, com o conseqüente aumento na produção deste hormônio, caracterizando a hiperinsulinemia (Graves *et al.*, 2006; Mealey & Oates, 2006; Fernandez-Real & Pickup, 2007). Porém, com a progressão da doença, ocorre uma diminuição da massa de células β pancreáticas às custas, sobretudo, de apoptose, resultando em uma produção inadequada de insulina (Graves *et al.*, 2006).

Como conseqüência, sobretudo do desafio hiperglicêmico crônico, o diabetes mellitus apresenta complicações crônicas freqüentes como as macroangiopáticas, clinicamente representadas pela coronariopatia, doença vascular periférica e doença vascular cerebral e as microangiopáticas, como a neuropatia, retinopatia e nefropatia. Tem sido evidenciado que o controle metabólico é fator preponderante não só na patogênese e progressão das complicações diabéticas micro e macrovasculares (DCCT research group, 1993; UKPDS group, 1998), mas também na alta susceptibilidade destes pacientes a infecções, uma vez que estes indivíduos apresentam um risco de 2 a 5 vezes maior para as doenças periodontais, que pode ser reduzido por um controle glicêmico efetivo (Taylor,

2001). Alguns estudos clássicos acerca da prevalência, severidade e incidência da periodontite nos indivíduos diabéticos foram realizados na população dos índios Pima do Arizona, a qual apresenta a maior ocorrência de diabetes mellitus tipo 2 do mundo. Estes estudos evidenciaram uma maior prevalência de periodontite, bem como da severidade de perda de inserção e óssea nos indivíduos diabéticos em comparação àqueles sem diabetes. Além disso, verificaram uma incidência de periodontite de 2.6 vezes maior, ao longo de 2,5 anos, entre os diabéticos do que entre os não-diabéticos (Nelson *et al.*, 1990; Emrich *et al.*, 1991). A idade do paciente, o tempo de duração do diabetes bem como a presença de complicações diabéticas não-orais parecem estar correlacionados com a severidade da doença periodontal (Thorstensson & Hugoson 1993; Moore *et al.*, 1999). Da mesma forma em que o controle metabólico do diabetes está associado fortemente às suas complicações crônicas, ele também é um fator importante na instalação e progressão das doenças periodontais, de modo que pacientes diabéticos com pobre controle glicêmico apresentam formas mais severas de destruição periodontal, enquanto os bem controlados são parecidos com os não-diabéticos no grau de severidade periodontal (Taylor *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2007). Respectivamente, em estudo longitudinal com a população de índios Pima e em outro epidemiológico nos Estados Unidos, diabéticos pobremente controlados apresentaram um risco 11 vezes maior de aumento progressivo na perda óssea e 2.9 vezes maior de apresentarem periodontite, quando comparados àqueles bem controlados, sem aumento nos riscos (Taylor *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, parâmetros clínicos periodontais, como sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e perda de inserção, demonstram-se mais severos em diabéticos descompensados (Tsai *et al.*, 2002; Salvi *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2007).

As doenças periodonatis e o diabetes mellitus são doenças crônicas, altamente prevalentes, que apresentam similaridades na sua etiopatogênese (Mealey & Oates, 2006). O diabetes aumenta o risco às doenças periodontais e mecanismos biológicos plausíveis, através dos quais o diabetes afeta o estado periodontal, têm sido amplamente demonstrados, muitos dos quais são intrinsecamente similares àqueles associados às complicações crônicas diabéticas, sugerindo que a periodontite possa ser listada como a sexta complicação clássica do diabetes (Löe, 1993). Por outro lado, é menos claro o impacto das

doenças periodontais no controle glicêmico e patogênese do diabetes, bem como os mecanismos através dos quais essa influência possa ocorrer (Mealey & Oates, 2006; Lalla, 2007).

Evidências recentes têm revelado associações, antes não reconhecidas, entre resistência insulínica, obesidade, circulação de mediadores imunoinflamatórios, susceptibilidade imunogenética, função de monócitos/macrófagos e infecções crônicas (Fernandez-Real & Pickup, 2007). De acordo com a hipótese proposta por Pickup et al. (1997, 1998) o diabetes mellitus tipo 2 é uma manifestação da resposta inflamatória do hospedeiro, desde que uma resposta de fase aguda induzida por citocinas, chamada de inflamação de baixo grau, decorrente da longa ativação do sistema imune inato, está envolvida na patogênese do diabetes tipo 2 e complicações associadas, como dislipidemia e aterosclerose. Da mesma forma, investigações acerca dos mecanismos na resposta mediada pelo hospedeiro na doença periodontal têm revelado que ela envolve a ativação do eixo imunológico inato, especialmente pela hiperregulação das citocinas próinflamatórias provenientes de monócitos e leucócitos polimorfonucleares, na presença crônica de um biofilme bacteriano subgingival Gram-negativo (Nassar *et al.*, 2007). Desta maneira, infecções periodontais crônicas inflamatórias Gram-negativas podem induzir ou perpetuar um estado sistêmico inflamatório crônico, contribuindo para o aumento da resistência insulínica e um pobre controle glicêmico (Loos, 2005; Mealey & Oates, 2006; Mealey & Rose, 2008). Uma resposta imune inata exacerbada então, caracterizada pela estimulação de mediadores inflamatórios, sobretudo citocinas, parece ser o antecedente comum a ambas as doenças, apresentando efeitos sinérgicos quando coexistem no hospedeiro (Forrester, 2004; Nassar *et al.*, 2007).

Ao mesmo tempo em que estudos sobre a participação de processos inflamatórios crônicos no desenvolvimento da resistência insulínica têm demonstrado níveis elevados de proteínas de fase aguda, como proteína-C-reativa, e de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), IL-1 β e IL-8 em soro de pacientes diabéticos tipo 2 (Spranger *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2003; Tuttle *et al.*, 2004), outros também indicaram a elevação destes mesmos mediadores inflamatórios associados a endotoxinas no soro como também nos tecidos e fluido crevicular gengival de

sítios e indivíduos com periodontite e de pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite (Ejeil *et al.*, 2003; Górska *et al.*, 2003; Oroszko *et al.*, 2006; Engebretson *et al.*, 2007). Assim, o papel central das citocinas no desenvolvimento das complicações crônicas e resistência insulínica características do diabetes tipo 2, bem como no início e manutenção da resposta imune local e sistêmica ao biofilme periodontal, torna-as importantes alvos para o estudo das interrelações entre ambas as doenças (Nassar *et al.*, 2007; Preshaw *et al.*, 2007).

Monócitos circulantes e macrófagos humanos, por sua vez, sendo integrantes fundamentais da resposta imune inata e importantes fontes de citocinas nos vários órgãos e tecidos associados aos processos de resistência insulínica e desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes, bem como às doenças periodontais, têm sido utilizados para a avaliação da resposta imunológica de pacientes diabéticos e com periodontite, através do padrão de secreção e expressão gênica de citocinas próinflamatórias (Salvi *et al.*, 1997; Hatanaka *et al.*, 2006; Fernandez-Real & Pickup, 2007; Tsiotra *et al.*, 2007; Giulietti *et al.*, 2007; Ehses *et al.* 2008). As alterações no comportamento imunocelular dos pacientes diabéticos tipo 2 e daqueles com periodontite, como a hiperreatividade de monócitos frente a agentes microbianos, ainda não se encontram bem elucidadas, assim como o papel dos fatores moduladores deste comportamento, como o controle metabólico (Salvi *et al.*, 1998; Shanmugam *et al.*, 2003; Foss-Freitas *et al.* 2006; Chacón *et al.*, 2007).

Além disso, diante do fato das evidências científicas sobre o impacto do tratamento periodontal nos mediadores inflamatórios sistêmicos (Talbert *et al.*, 2006; Lalla *et al.*, 2007) e no controle glicêmico (Janket *et al.*, 2005; Faria-Almeida *et al.*, 2006), contribuindo para a melhoria da sensibilidade insulínica nos diabéticos tipo 2, serem ainda preliminares e controversas, justifica-se a realização desta pesquisa que tem por objetivo avaliar a influência sistêmica da periodontite crônica frente ao controle metabólico bem como do tratamento periodontal na resposta imunológica de pacientes diabéticos tipo 2, através da análise da expressão gênica e protéica de citocinas em células mononucleares de sangue periférico.

2. Revisão de Literatura

2.1. Papel da resposta inflamatória crônica induzida por citocinas através da ativação do sistema imunológico na patogênese do diabetes tipo 2

Nos últimos 10 anos tem havido um grande interesse científico na hipótese de que inflamação crônica de baixo grau e a ativação do sistema imune inato estão intimamente envolvidos na patogênese do diabetes tipo 2, desde a sua concepção por Pickup et al. (1997, 1998), sugerindo que elementos do sistema imune inato, como as proteínas da fase aguda, contribuem para o desenvolvimento desta patologia. Neste modelo, a ativação do sistema imune inato, gerando um estado de inflamação crônica mediada por citocinas, é o possível mecanismo de ligação entre os fatores de susceptibilidade para o diabetes tipo 2, sendo deflagrado por fatores comportamentais e do meio ambiente (obesidade, ingestão em excesso de nutrientes calóricos e gordurosos, sedentarismo, estresse, fumo e exposição a infecções) e facilitado pela predisposição genética. Todos estes fatores estão associados a ações bioquímicas, via ativação do sistema imune inato, que resultam em resistência e deficiência de secreção de insulina, principais mecanismos etiopatológicos do diabetes tipo 2 (Pickup *et al.*, 2004; Crook, 2004; Fernandez-Real & Pickup, 2007).

O sistema imune natural ou inato consiste no mecanismo mais rápido e primeira linha de defesa contra ameaças ambientais como infecções microbianas e injúrias químicas e físicas, possuindo como componentes teciduais uma série de células sentinelas, tais como os macrófagos, monócitos, células apresentadoras de antígenos, polimorfonucleares, mas também células endoteliais e adipócitos (Pickup et al., 2004; Crook, 2004; Fernandez-Real & Pickup, 2007). Ao mesmo tempo em que controla a resposta imune adaptativa, através da ativação de linfócitos T e B, macrófagos e outras células sentinelas, pela ativação de receptores de superfície celular que reconhecem estruturas moleculares associadas a patógenos, reconhecidos como agentes nocivos, estimulam fatores de transcrição nuclear,

como o fator nuclear-kB (NF-kB), culminando com a indução de genes responsáveis pela produção das citocinas próinflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , principais mediadores da inflamação e da resposta de fase aguda (sendo crônica no diabetes) (Pickup *et al.*, 2004; Fernandez-Real & Pickup, 2007). Estas citocinas estimulam a produção das proteínas da fase aguda pelo fígado, tais como proteína-C-reativa, fibrinogênio, amilóide A sérica, complemento, α -1 glicoproteína ácida, hepatoglobina (que têm suas concentrações circulatórias aumentadas sendo consideradas proteínas de fase aguda positivas) e albumina e transferrina (consideradas proteínas de fase aguda negativas, pois têm suas concentrações circulatórias diminuídas). As proteínas da fase aguda compõem um grupo diverso de proteínas cujas concentrações circulatórias aumentam ou diminuem em resposta a fatores estressores como injúria, infecção e inflamação, sendo consideradas marcadores inflamatórios (Pickup *et al.*, 2004; Crook, 2004; Fernandez-Real & Pickup, 2007). Havendo proporcionalidade entre estímulo e resposta, a imunidade inata, através da resposta de fase aguda, representa um mecanismo de sobrevivência, na medida em que permite o restabelecimento da homeostase orgânica após injúrias ambientais. Porém, se a resposta não for proporcional ao estímulo, ou se este for persistente (erros alimentares e sedentarismo prolongados), a hipótese é de que a longa e persistente ativação do sistema imune inato, resultando em uma inflamação crônica, permite o estabelecimento da doença ao invés do reparo, em pacientes que desenvolvem o diabetes tipo 2 (Pickup *et al.*, 2004; Crook, 2004; Fernandez-Real & Pickup, 2007).

Esta hipótese tem sido suportada por evidências que demonstram concentrações elevadas destes marcadores inflamatórios da resposta de fase aguda, bem como das citocinas próinflamatórias em pacientes diabéticos tipo 2, podendo ser considerados fatores preditores desta patologia e associados a comorbidades como as doenças cardiovasculares. Spranger *et al.* (2003) e Hu *et al.* (2004), em estudos caso/controle prospectivos, utilizando, respectivamente, participantes do estudo Postdam-EPIC e do Nurses' Health, analisaram as concentrações de proteína-C-reativa, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e receptor 2 do TNF- α , em 192 e 737 indivíduos que desenvolveram diabetes tipo 2 durante o período de observação de 2.3 e 10 anos e em 384 e 785 indivíduos controles que não desenvolveram a doença. No primeiro estudo, verificaram-se aumento dos níveis de IL-6 e TNF- α no grupo caso, sem

diferença nos níveis de IL-1 β entre os grupos, porém IL-6 sendo considerada um preditor independente para o diabetes tipo 2 (OR 2.6, 95% IC:1.2-5.5). No segundo, os níveis de proteína-C-reativa, IL-6 e receptor 2 do TNF- α , encontravam-se mais elevados no grupo caso do que no controle, sendo proteína-C-reativa considerada fator preditor independente para a doença (OR 4.36 95% IC:2.8-6.8), após ajuste para as variáveis de estilo de vida. O primeiro estudo indicou ainda um sinergismo entre as citocinas, de modo que indivíduos com níveis elevados tanto de IL-6 como de IL-1 β apresentaram independentemente um risco mais elevado de desenvolver o diabetes tipo 2. A fim de analisar uma etiologia inflamatória em comum para o diabetes e doenças cardiovasculares, é que Esposito *et al.* (2003) analisou as concentrações circulatórias da IL-8, uma potente quimiocina, capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos e linfócitos T para os espaços subendoteliais, bem como a adesão de monócitos ao endotélio, indicando sua maior predominância nos pacientes diabéticos recentemente diagnosticados (6 meses de diagnóstico) do que nos controles sadios (13.7 \pm 2.8 / 8.7 \pm 1.9 pg/mL, p<0.05), além de uma correlação significativa dos seus níveis com aqueles de glicemia em jejum. Ao mesmo tempo Tuttle *et al.* (2004) verificaram que tanto os níveis da IL-6 (apenas esta com aumentos significativos: 1.41 \pm 0.48 / 0.33 \pm 0.06 pg/mL, p<0.05) como os de TNF- α estavam aumentados nas mulheres com diabetes tipo 2 associado ou não às doenças cardiovasculares em comparação àquelas não diabéticas. Pereira *et al.* (2006), comparando diabéticos não obesos e com um controle metabólico mediano (HbA1c < 8%) com pacientes controles sadios equiparados, verificaram níveis maiores de TNF- α , triglicérides, metabólitos do óxido nítrico e receptor solúvel de IL-2 nos diabéticos, não havendo diferenças entre os grupos na demais variáveis testadas tais como, proteína-C-reativa, colesterol total, LDL e HDL. Estes indicaram um aumento nos marcadores próinflamatórios em diabéticos tipo 2, mesmo na ausência de obesidade e marcante hiperglicemia. Assim, as reações inflamatórias não dependem da ação isolada dos mediadores inflamatórios, mas a ação integrada de várias citocinas é crucial para a perpetuação da resposta de fase aguda.

A explicação de como a inflamação crônica induzida por citocinas pode estar envolvida na patogênese do diabetes tipo 2, está associada a mecanismos pelos quais as

citocinas podem contribuir tanto para a resistência insulínica como para a deficiência na secreção de insulina (Crook, 2004; Fernandez-Real & Pickup, 2007).

Um dos primeiros estudos que associaram a liberação de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo, como o TNF- α , com a indução de resistência insulínica no diabetes tipo 2 demonstrou tanto a sua expressão gênica como protéica localmente no tecido adiposo e sistemicamente no plasma. Além disso, através da inibição da expressão de TNF- α em um dos modelos animais, utilizando um receptor de TNF- α recombinante, a sensibilidade insulínica aumentou, sugerindo uma função direta desta citocina no desenvolvimento da resistência insulínica (Hotamisligil *et al.*, 1993). A concepção de que o tecido adiposo produz outros mediadores inflamatórios, tais como IL-6, proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), adiponectina, leptina, visfatina, resistina, plasminogênio, proteína-C-reativa, que possuem ações tanto autócrinas como parácrinas, via circulação, demonstrou como a obesidade contribui para a ativação da resposta inflamatória crônica, estando associada com a resistência insulínica e o diabetes tipo 2 (Shoelson *et al.*, 2006; Bastard *et al.*, 2006). No modelo pelo qual os mediadores inflamatórios contribuem para o desenvolvimento da resistência insulínica na obesidade e no diabetes tipo 2, estes podem ativar mecanismos intracelulares via estimulação ou não de receptores. Intermediados por receptores, as citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6), lipopolissacárides (LPS) e outros produtos microbianos, lipídios, ácidos graxos livres e os AGES (produtos finais da glicosilação avançada) ativam os eixos da I-kappa-B (I κ B) quinase- β (IKK β) / fator nuclear-kappaB (NF- κ B) e da proteína c-Jun-NH₂-quinase terminal (JNK). A JKN tem demonstrado promover a resistência insulínica através da fosforilação dos resíduos de serina no substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1), impedindo o sinal do receptor de insulina, que se dá normalmente através de uma cascata de tirosina quinases. Diferentemente da JNK, a IKK β causa a resistência insulínica pela ativação transcricional do NF- κ B. Este é um fator de transcrição nuclear que induz a transcrição de vários genes responsáveis pelas citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8), fatores de crescimento, receptores e de outras proteínas relevantes que participam do processo de resistência insulínica (Shoelson *et al.*, 2006; King, 2008). A ativação da IKK β culmina com a fosforilação do

IKB, um inibidor citosólico do NF- κ B. A fosforilação desta proteína a torna vulnerável a ubiquitinação e degradação proteasomal, liberando a translocação do NF- κ B para o núcleo e a sua regulação de genes específicos. Outros estresses celulares ativam estes eixos sem o estímulo de receptores específicos, tais como ativadores da proteína quinase C e espécies reativas de oxigênio intracelulares (Shoelson *et al.*, 2006) (figura 1).

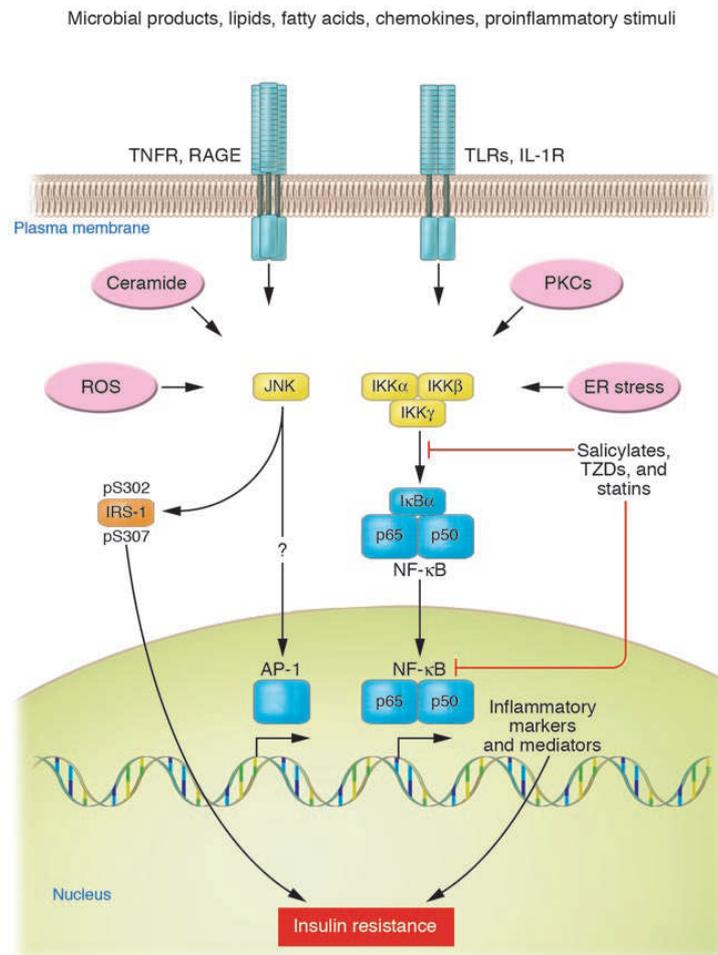


Figura 1 – Potenciais mecanismos intracelulares associados à resistência insulínica. Receptores para TNF- α , IL-1, Toll e AGE (TNFR, IL-1R, TLR, ou RAGE, respectivamente). Estresses intracelulares: espécies reativas de oxigênio (ROS), ceramidas e isoformas de proteínas quinase C (PKC). Fosforilação de resíduos de serina (pS302 e pS307) no substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1). O eixo IKK β /NF- κ B pode ser inibido ou reprimido pela ação de salicilatos, tiazolidinedionas (TZDs) e estatinas. Fonte: Shoelson *et al.*, 2006.

No modelo de desenvolvimento da resistência insulínica relacionada à obesidade, o tecido adiposo visceral parece ser o ponto de partida para a ativação inflamatória característica deste processo. Assim, adipócitos, uma vez estimulados pelo acúmulo de lipídios, têm seus mecanismos intracelulares próinflamatórios ativados, que resultam na secreção de níveis anormais de moléculas bioativas, como citocinas (IL-6, TNF- α), quimiocinas como (MCP-1), e outros mediadores inflamatórios como proteína-C-reativa, angiotensinogênio, ativador do inibidor de plasminogênio-1 (PAI-1). Em resposta à ação local destes mediadores e à crescente estocagem de lipídios e nutrientes, as células endoteliais do tecido adiposo secretam moléculas de adesão, tais como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, que promovem o recrutamento e a infiltração do tecido adiposo por monócitos (Shoelson *et al.*, 2006; Bastard *et al.*, 2006). Estes se diferenciam em macrófagos que, uma vez ativados, e sendo os responsáveis pela maior parte da produção local de TNF- α , IL-6 e indução da síntese de óxido nítrico, vão produzir as mesmas citocinas e quimiocinas, além de outros mediadores inflamatórios, contribuindo não só para a inflamação local, mas também para a propagação desta resposta inflamatória, sistemicamente, de modo a atingir outros órgãos, especialmente aqueles sensíveis à insulina, como o fígado e o músculo esquelético (Shoelson *et al.*, 2006; Bastard *et al.*, 2006; Fernandez-Real & Pickup, 2007). No fígado, os hepatócitos são estimulados a produzirem citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β pela ativação do NF-kB, não só pelo acúmulo de lipídios intracelularmente, bem como por outras substâncias próinflamatórias, que chegam via circulação portal advindas do tecido adiposo visceral e de seus macrófagos, tais como citocinas, ácidos graxos e lipídios. As citocinas produzidas localmente recrutam e/ou ativam monócitos e macrófagos (células de Kupffer no fígado), de modo que, através da sua produção de mais mediadores inflamatórios, contribuem para a resistência insulínica local e sistêmica (Shoelson *et al.*, 2006). Assim, uma vez ativados, especialmente nos adipócitos, hepatócitos, células imune e endoteliais associadas, estes processos intracelulares inflamatórios se auto perpetuam através de um feedback positivo induzido pelas citocinas inflamatórias produzidas, contribuindo para o estado sistêmico inflamatório e resistência insulínica em outros tecidos, característicos do diabetes tipo 2 (Shoelson *et al.*, 2006) (figuras 2 e 2A).

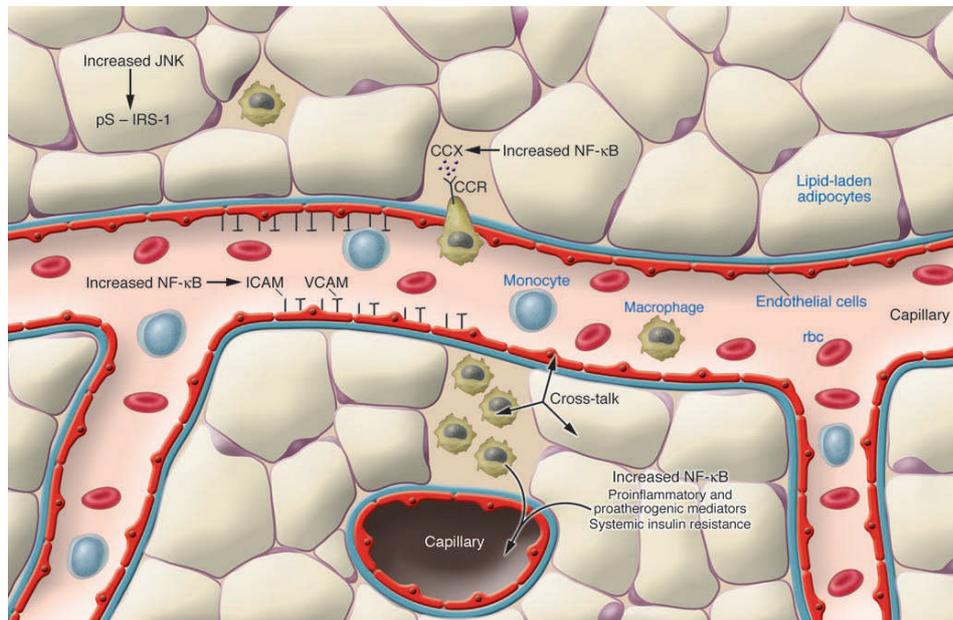


Figura 2 – Potenciais mecanismos associados à inflamação e à resistência insulínica no tecido adiposo. pS, resíduo de serina fosforilado; CCX, moléculas quimioatrativas; CCR, receptores de quimiocinas. Fonte: Shoelson *et al.*, 2006.

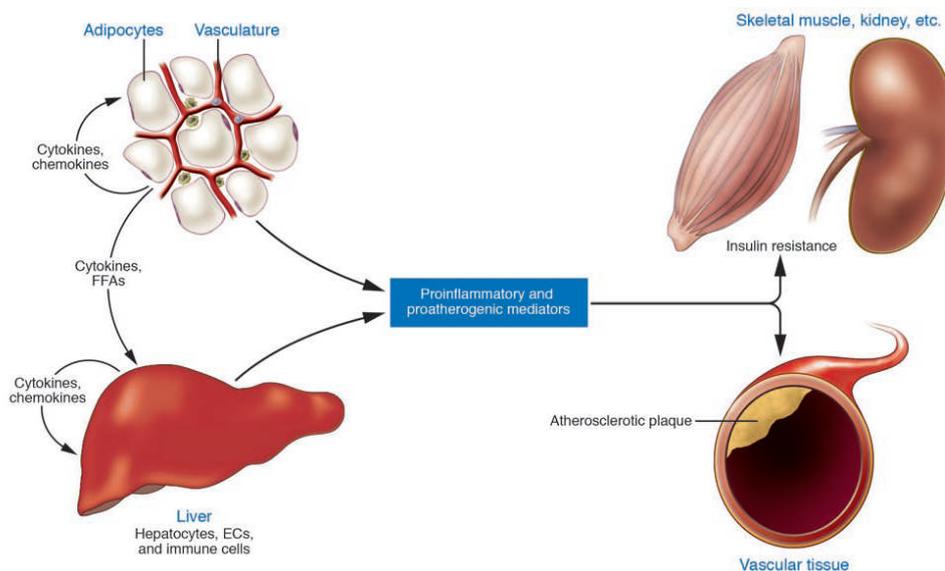


Figura 2A – Efeitos locais e sistêmicos da inflamação no desenvolvimento da resistência insulínica e aterogênese. Mediadores próinflamatórios e aterogênicos são produzidos por tecido adiposo, fígado e células imunes. Isto cria um estado de inflamação

responsável pela resistência insulínica no músculo esquelético e em outros tecidos e pela aterogênese na vascularização. Fonte: Shoelson *et al.*, 2006.

Há ainda outros mecanismos pelos quais as citocinas contribuem para a resistência insulínica. O TNF- α estimula lipólise no tecido adiposo, aumentando concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, que contribuem para o aumento na produção de glicose hepática, como também diminuição do metabolismo e utilização de glicose no músculo esquelético, resultantes da resistência insulínica (Tuttle *et al.*, 2004; Popa *et al.*, 2007). Ainda nos adipócitos, o TNF- α diminui a expressão gênica de algumas proteínas associadas à ação do receptor de insulina, como IR-1, proteína transportadora de glicose (GLUT-4) e adiponectina. Além disso, ainda contribui para o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo por estimular a produção de MCP-1 (Popa *et al.*, 2007). A IL-6, por sua vez, associada a IL-1 β , induz a produção hepática de proteína-C-reativa, importante mediador inflamatório, que aumenta a expressão de moléculas de adesão endotelial e interfere na distribuição da insulina. Além disso, ainda em ação conjunta, afeta o metabolismo hepático induzindo a secreção de VLDL e hipertrigliceridemia (Pickup & Crook, 1998; Bastard *et al.*, 2006). A IL-6 prejudica a ação da insulina, possivelmente por envolver a ativação da tirosina fosfatase ou a interação entre o supressor da proteína sinalizadora de citocina (SOCS) e o receptor de insulina (Bastard *et al.*, 2006).

Outro processo pelo qual o aumento crônico dos mediadores inflamatórios observados nos pacientes com diabetes tipo 2 contribui para a etiologia desta doença, é o efeito destes mediadores, sobretudo das citocinas, sobre as células- β pancreáticas, induzindo tanto redução da sua massa por destruição celular como deficiência na sua função de secretar insulina (Donath *et al.*, 2003; Ehses *et al.*, 2008). Tais mediadores advindos da ativação de adipócitos e do sistema imune inato, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1, apresentam efeitos citotóxicos diretos sobre as células- β pancreáticas, sendo que a IL-1 β e o TNF- α são as principais citocinas que promovem sinergicamente, durante a infiltração imune do pâncreas, apoptose e injúrias às células- β pancreáticas. O aumento de nutrientes celulares frente a obesidade, tais como os ácidos graxos saturados, é responsável pelos efeitos deletérios da lipotoxicidade sobre as células- β pancreáticas, através da formação de ceramidas, aumento da produção de óxido nítrico e ativação do mecanismo intrínseco

celular apoptótico via mitocondrial (Donath *et al.*, 2003). Diante do fato de que frente à ação de estressores metabólicos, tais como a hiperglicemia, dislipidemia e adipocinas, as células- β pancreáticas produzem e secretam IL- β , é que Ehses *et al.* (2008) propuseram uma hipótese para o desenvolvimento da inflamação das ilhotas pancreáticas no diabetes tipo 2, culminado com a deficiência na produção de insulina. Uma vez produzida localmente, a IL- β autoestimula sua produção pela ativação do NF- κ B, ao mesmo tempo em que induz a produção de outros fatores inflamatórios, tais como IL-8. Isto promove o recrutamento e infiltração de macrófagos, que são ativados paracrinamente por citocinas derivadas das próprias ilhotas. Finalmente, estes macrófagos ativados produzem mais IL-1 β , culminando com apoptose e disfunção das células- β pancreáticas. A destruição autoimune destas células também pode ocorrer em alguns diabéticos tipo 2, uma vez que, dependendo da idade ou de fatores genéticos ou ambientais, estes podem demonstrar a mobilização de células T reativas a antígenos próprios das células- β (Donath *et al.*, 2003) (Figura 3).

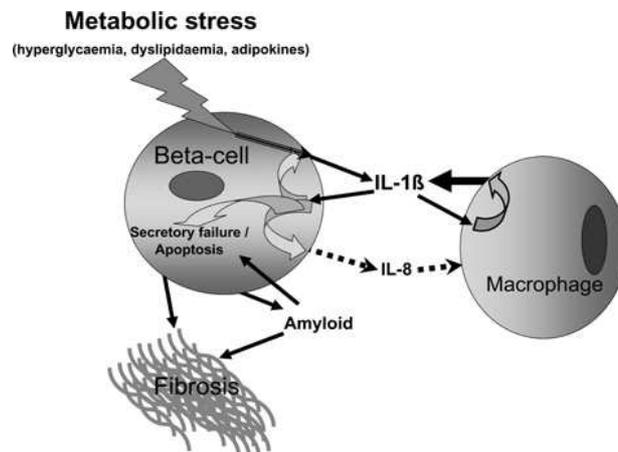


Figura 3 – Hipótese para o desenvolvimento da inflamação das ilhotas pancreáticas no diabetes tipo 2. Fonte: Ehses *et al.*, 2008.

Ao mesmo tempo em que as citocinas ativam e perpetuam a inflamação crônica, implicada na resistência insulínica e deficiência secretória de insulina, processos etiológicos do diabetes tipo 2, elas estão envolvidas no desenvolvimento das complicações crônicas desta doença (Southerland *et al.*, 2006; King, 2008). A hiperglicemia crônica característica do diabetes, resultante da resistência insulínica e de uma deficiente secreção

deste hormônio, é capaz de ativar o sistema imune inato por alguns mecanismos que incluem o aumento da formação dos produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) e suas ações; o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e suas ações; ativação do eixo proteína quinase C / diacilglicerol; ativação da via do poliol /aldose redutase (King, 2008). Todos estes mecanismos culminam com a produção de metabólitos oxidantes bem como de mediadores inflamatórios e citocinas, pela ativação de mediadores de sinalização intracelular como a proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK) e o NF-κB. Os seus efeitos incluem alterações na expressão de genes específicos como na função de proteínas, que contribuem para desregulação na angiogênese, crescimento e sobrevivência celular; aumento da permeabilidade vascular, adesão leucocitária e espessamento de membrana basal; alteração do fluxo sanguíneo e trombose (King, 2008). Estas disfunções celulares e danos teciduais resultam nas complicações microvasculares como retinopatia, nefropatia e neuropatia; nas macrovasculares, envolvendo a aterogênese; nas alterações de reparo tecidual (King, 2008); além da maior susceptibilidade a infecções nos pacientes diabéticos tipo 2 (Peleg *et al.*, 2007; Stegenga *et al.*, 2008).

Monócitos circulantes e macrófagos humanos, importantes mediadores da resposta imune inata e fontes de citocinas, responsáveis tanto pelos processos inflamatórios associados à resistência insulínica como pelas alterações imunocelulares envolvidas no desenvolvimento das complicações do diabetes, como a maior susceptibilidade a infecções, têm constituído instrumentos de avaliação do padrão de resposta imunológica dos pacientes diabéticos frente a agentes moduladores desta, tais como o controle metabólico, agentes microbianos e fatores de risco associados, como a obesidade (Shanmugam *et al.*, 2003; Foss-Freitas *et al.*, 2006; Tsiotra *et al.*, 2007; Fernandez-Real & Pickup, 2007; King, 2008). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado padrões alterados tanto de secreção protéica, como de expressão gênica de citocinas próinflamatórias e mediadores inflamatórios em pacientes diabéticos tipo 2, através de metodologias bem desenvolvidas como ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e reações em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) (Hatanaka *et al.*, 2006; Chacón *et al.*, 2007; Giulietti *et al.*, 2007; Stegenga *et al.*, 2008).

Comparando diabéticos tipo 2 obesos e não obesos, além de obesos não diabéticos, através da análise *in vitro* da secreção protéica de IL-1 β e de TNF- α , por ELISA, de células mononucleares cultivadas em presença de estímulos por 48 e 24 horas, respectivamente, Mito *et al.* (2002) evidenciaram que a obesidade aumentou a produção de IL-1 β , enquanto Morris *et al.* (2004) verificaram que a produção de TNF- α não estava relacionada a obesidade, porém estava aumentada nos indivíduos diabéticos no início do estudo. Após submeter seus pacientes a um regime de restrição calórica por 12 semanas, estes últimos autores verificaram uma redução da produção de TNF- α com a perda de peso, sem relação com a presença de diabetes, indicando ainda uma fraca relação com os níveis plasmáticos de glicose e insulina nestes pacientes. Hatanaka *et al.* (2006) demonstraram uma produção significativamente maior de IL-8, IL-1 β e TNF- α por neutrófilos estimulados de pacientes diabéticos em relação aos controles saudáveis, porém havendo apenas uma tendência de maior produção por parte dos monócitos estimulados, sem correlação com níveis de glicose plasmática ou índice de massa corpórea. Foss-Freitas *et al.* (2006), após submeter pacientes diabéticos tipo 1 e 2 a um controle metabólico rígido por insulina através de internação hospitalar, verificaram uma tendência de aumento na produção de IL-6 e TNF- α por células mononucleares aderentes cultivadas sob estímulo de LPS.

Enquanto Zykova *et al.* (2004), através de técnicas de hibridização e detecção colorimétrica, verificaram uma menor quantidade de RNA mensageiro (RNAm) de TNF- α em culturas de monócitos estimuladas por LPS e interferon-gamma (IFN- γ) de diabéticos tipo 2, com pobre controle glicêmico, do que dos pacientes controles saudáveis, Fodega *et al.* (2004), através de PCR em tempo real, demonstraram uma maior expressão de RNAm da relação dos receptores de TNF- α (TNFR2m/TNFR1m) em células mononucleares de pacientes diabéticas tipo 2 obesas em relação às obesas não diabéticas, além de uma correlação positiva entre tal relação e os níveis de glicose plasmática. Chacón *et al.* (2007) demonstraram um comportamento imunológico diferente dos diabéticos tipo 2 recentemente diagnosticados e bem controlados em relação aos indivíduos saudáveis, mesmo em condições de maior semelhança metabólica, uma vez que verificaram que altas doses de

glicose promoveram maior expressão gênica e secreção protéica de TNF- α pelas culturas de monócitos dos pacientes não diabéticos, enquanto a ativação por LPS promoveu aumento de expressão gênica de TNF- α da mesma forma nos diabéticos tipo 2 e controles sadios, havendo, entretanto maior secreção protéica de TNF- α e IL-6 nos sobrenadantes das culturas de pacientes diabéticos tipo 2 em relação aos controles sadios. Giulietti *et al.* (2004, 2007) demonstraram a existência de uma hiperativação próinflamatória monócítica em diabéticos tipo 2, em controle metabólico inadequado, em relação a pacientes diabéticos tipo 1 e controles sadios, uma vez que verificaram-se maiores expressões gênicas de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 tanto pelas culturas de células mononucleares frescas como estimuladas por INF- γ . Tsiotra *et al.* (2007) verificaram maior expressão gênica de TNF- α e IL-6 pelas células mononucleares não estimuladas de pacientes diabéticas tipo 2, obesas e não-obesas, em relação aos seus controles não diabéticas, enquanto apenas a IL-6 apresentou níveis plasmáticos superiores nos subgrupos obesos em relação aos não-obesos. Alexandraki *et al.* (2008) observaram que pacientes diabéticos tipo 2 apresentaram número superior de células mononucleares, não estimuladas, secretoras de IL-1 β , TNF- α e IL-6 do que pacientes diabéticos tipo 1 ou controles sadios, além de níveis plasmáticos de proteína-C-reativa e IL-6. Porém, após estímulo com mitógeno, o indivíduos controles apresentaram número maior de células secretoras de citocinas.

A explicação para essas alterações no comportamento imunocelular de pacientes diabéticos ainda não está bem definida. Desde que o grau de hiperglicemia é considerado o fator que melhor se correlaciona com a severidade dos processos metabólicos subclínicos no diabetes tipo 2 (DCCT research group, 1993; UKPDS group, 1998; American Diabetes Association, 2009), estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre os níveis de mediadores inflamatórios com a piora no controle glicêmico dos pacientes, de modo que se verificou um aumento nos níveis plasmáticos de TNF- α com a piora nos níveis de HbA1c durante um acompanhamento de 2 anos em pacientes idosos diabéticos tipo 2, e uma diminuição dos níveis de IL-6 obtido com um controle metabólico rígido através de internação hospitalar (Lechleitner *et al.*, 2002; Aso *et al.*, 2003). Através de culturas de monócitos de voluntários sadios em diferentes gradientes de concentração de

glicose por 6 e 24 horas, Morohoshi et al. (1996) demonstraram por RT-PCR e ELISA que a hiperglicemia estimula tanto a síntese de RNAm como a secreção de IL-6 e TNF- α *in vitro*. Já Shanmugam et al. (2003), através da cultura de monócitos humanos THP-1 em meio hiperglicêmico por 72 horas, evidenciaram por meio de técnicas de escaneamento genético de citocinas (cytokine gene arrays), RT-PCR e ensaios de adesão monocítica, que a hiperglicemia aumentou a expressão gênica monocítica de TNF- α , IL-1 β , β_2 integrina e MCP-1, bem como à sua adesão às células endoteliais, demonstrando ainda alguns mecanismos de sinalização pelos quais a hiperglicemia promove tal indução inflamatória. Por outro lado, autores defendem a hiperglicemia como uma influência negativa nas células imunocompetentes, uma vez evidenciada uma melhora na resposta imunocelular de diabéticos com controle metabólico adequado em relação aos diabéticos com controle metabólico inadequado (Geerlings *et al.*, 1999; Foss-Freitas *et al.*, 2006).

Outro fator que parece contribuir para discrepância dos resultados é o efeito da hiperinsulinemia, característica dos diabéticos tipo 2, já que esta, em ausência ou presença de hiperglicemia associada, aumenta a expressão de citocinas próinflamatórias induzida por LPS, como da IL-1 α , IL-1 β e quimiocinas, exercendo um efeito mais preponderante do que a hiperglicemia (Stegenga *et al.*, 2008).

Assim, as evidências apresentadas demonstraram a importância da resposta inflamatória crônica induzida por citocinas, através da ativação do sistema imune inato, nos mecanismos etiopatogênicos, como resistência insulínica e deficiência na função das células- β , bem como naqueles envolvidos no desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes tipo 2, como a maior susceptibilidade a infecções, sendo ainda controversas em relação ao papel de moduladores desta resposta imunoinflamatória, como o controle metabólico.

2.2. Papel da resposta inflamatória crônica induzida por citocinas através da ativação do sistema imune inato na patogênese da doença periodontal crônica

As doenças periodontais são doenças complexas, cuja expressão fenotípica envolve interações entre o biofilme bacteriano e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e as subseqüentes alterações na homeostasia dos tecidos conjuntivo e ósseo que suportam os dentes na cavidade oral (Kornman, 2008). O último modelo conceitual acerca da patogênese da doença periodontal foi proposto por Page & Kornman (1997), no qual a microbiota específica periodontopatogênica é necessária para o início e perpetuação da doença periodontal, porém o grau e severidade da manifestação clínica desta depende da forma com que os componentes da susceptibilidade do hospedeiro, como a resposta imunoinflamatória, são modulados pelos fatores ambientais e de risco adquiridos, além dos genéticos. O modelo sistêmico biológico atualmente proposto, por sua vez, mantém os mesmos conceitos anteriores, porém, leva em consideração a interação dinâmica e organização hierárquica entre os mecanismos biológicos que permeiam a patogênese da doença periodontal, ressaltando a importância do fenótipo biológico individual, que, através dos processos moleculares e celulares imunoinflamatórios, resultam na expressão de genes, proteínas e metabólitos, podendo ser modulados por fatores ambientais (como diabetes e fumo), genéticos e alterações epigenéticas e, por fim, associados ao fenótipo clínico periodontal (Kornman, 2008; Offenbacher *et al.*, 2008).

A resposta imunoinflamatória do hospedeiro, envolvendo tanto a ativação do sistema imune inato como o adaptativo, sendo a maior responsável pela destruição tecidual local, constitui o principal componente da susceptibilidade à doença periodontal, sendo também o caracterizador do fenótipo biológico individual, contribuindo para a determinação do fenótipo clínico periodontal final (Kornman, 2008; Offenbacher *et al.*, 2008). As citocinas, sendo integrantes centrais e efetores dos mecanismos imunoinflamatórios, são fundamentais tanto para o início como para a manutenção da resposta imune ativada pelo biofilme bacteriano periodontopatogênico, em que a secreção

inapropriada destes mediadores inflamatórios, seja quantitativamente (liberação de citocinas em excesso) e/ou qualitativamente (desequilíbrio na proporção entre as citocinas pró e anti-inflamatórias), caracteriza respostas imunoinflamatórias desreguladas, culminando com a destruição dos tecidos periodontais e os sinais clínicos da doença (Preshaw *et al.*, 2007). As citocinas agem em suas células alvo, ligando-se a receptores específicos, de modo a ativarem segundos mensageiros intracelulares que, culminando em alterações na regulação gênica, resultam em alterações fenotípicas nas células. As citocinas não agem isoladamente, porém, em uma complexa interação, conectando elementos da imunidade inata com os da adaptativa, em resposta a infecções ou injúrias. Dessa forma, as citocinas próinflamatórias possuem uma importante função no início, regulação e perpetuação da ativação do sistema imune inato no periodonto (Taylor *et al.*, 2004).

A IL-1 β ativa o sistema imune inato, sobretudo, por induzir a produção de outros potentes mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos, fatores ativadores de plaquetas, moléculas de adesão endotelial, além de outras citocinas, como TNF- α . Assim, funções como recrutamento de células imune, proliferação celular, destruição conjuntiva e óssea, tanto pela ativação de metaloproteinases como de osteoclastos, contração de células musculares lisas dos vasos, pressão sanguínea e outras funções sobre as células nervosas centrais, fazem da IL-1 β uma importante citocina nas doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide, diabetes e periodontite (Delaleu & Bickel *et al.*, 2004). Ao passo que os macrófagos parecem ser as principais fontes desta citocina nos estágios iniciais da inflamação gengival, os linfócitos B e plasmócitos são na doença periodontal avançada (Taylor *et al.*, 2004). O TNF- α secretado por monócitos e macrófagos age sinergicamente com a IL-1, sobretudo, na destruição óssea periodontal, na medida em que promove a osteoclastogênese pela ativação e formação de osteoclastos, bem como induz a apoptose de osteoblastos e suas células precursoras, contribuindo para a discrepância entre a quantidade de osso reabsorvido em relação àquele neoformado no periodonto (Graves, 2008). A IL-6 é outra citocina próinflamatória expressa por várias células residentes das lesões periodontais que, em conjunto com IL-1 e TNF- α , aumenta a reabsorção óssea. Ela apresenta também efeitos na homeostasia vascular, já que induz a produção de moléculas de adesão endotelial como VCAM-1 (molécula de adesão celular

vascular), ICAM-1 (molécula de adesão intracelular) e quimiocinas como MCP-1, culminando com a maior atração e diapedese de leucócitos para os locais de infecção periodontal. A IL-6 é ainda um importante regulador da resposta de linfócitos B (Taylor *et al.*, 2004). A IL-8, por sua vez, é uma importante quimiocina, sendo fundamental para a quimiotaxia e ativação de neutrófilos (Taylor *et al.*, 2004).

A importância destas citocinas próinflamatórias é evidenciada por estudos que associam elevados níveis dessas citocinas com os processos inflamatórios da doença periodontal, através do ELISA. Verificaram-se níveis de IL-1 β aumentados em tecido gengival de pacientes com doença periodontal do que em tecido de indivíduos sadios (Honing *et al.*, 1989), como também em sítios com lesões periodontais progressivas do que naqueles com lesões gengivais estáveis (Stashenko *et al.*, 1991). Além disso, demonstraram-se maiores concentrações de IL-1 β no fluido crevicular gengival (GCF) de pacientes com periodontite (Masada *et al.*, 1990; Preiss & Meyle, 1994; Tsai *et al.*, 1995; Engbretson *et al.*, 2002). Outros estudos verificaram concentrações elevadas de IL-6, IL-8 e TNF- α no GCF de sítios inflamados, por ELISA, indicando a sua utilização como potenciais marcadores da progressão da doença periodontal (Ebersole *et al.*, 1993; Marthur *et al.*, 1996). Ejeil *et al.* (2003), através da cultura de amostras de tecido gengival de 6 indivíduos controles (grupo 1), 6 pacientes com inflamação gengival leve (grupo 2), 6 pacientes com inflamação gengival moderada (grupo 3) e 6 pacientes com inflamação gengival severa (grupo 4), verificaram, por ELISA, em comparação ao grupo controle, um aumento significativo de IL-1 β nos sobrenadantes das culturas dos grupos 3 e 4 e de IL-6 e TNF- α do grupo 3; uma diminuição significativa de IL-4 (grupos 2, 3, 4) e de fator de crescimento transformador β (TGF- β) (- grupos 2 e 3); e nenhuma alteração do fator de crescimento epidérmico (EGF). A fração de área ocupada por fibras colágenas gengivais foi significativamente correlacionada com os níveis de IL-4 e TGF- β , porém inversamente com os níveis de IL-1 β para os 3 grupos inflamados e IL-6 e TNF- α para os grupos 2 e 3, sugerindo a possível utilização da IL-1 β como marcador de severidade nas lesões periodontais. Gróška *et al.* (2003), por sua vez, indicaram que a grande variabilidade nas concentrações de citocinas e a baixa frequência da sua detecção nas amostras de soro dos

pacientes com periodontite, torna-as incapazes de detectar a presença de doença, através de tal metodologia. Por outro lado, os níveis absolutamente elevados de IL-1 β , TNF- α , IL-2 e IFN- γ e das suas relações com IL-4 e IL-10 (citocinas anti-inflamatórias), encontrados nas biópsias de sítios inflamados de lesões de periodontite crônica, foram associados à severidade da doença periodontal. Kurtis *et al.* (2005) verificaram maiores concentrações significativas de TNF- α e MCP-1 no GCF de pacientes com periodontite agressiva e crônica comparados a pacientes controles, sem haver, entretanto diferenças entre os grupos com periodontite. Observaram-se ainda correlações positivas entre os níveis de ambas as citocinas, como também entre elas e os parâmetros clínicos que caracterizam a doença periodontal. Honda, *et al.* (2006), através de PCR em tempo real, demonstraram maior expressão das citocinas próinflamatórias IL-1 β , IFN- γ , ligante de receptor de ativador de fator nuclear-kappa B (RANKL) e da anti-inflamatória TGF- β_1 em biópsias de lesões de periodontite, não havendo diferenças na expressão de TNF- α , IL-12, bem como IL-10 e IL-4 entre as lesões estáveis de gengivite e as progressivas de periodontite, sugerindo ser a expressão das citocinas próinflamatórias preponderante sobre a das anti-inflamatórias, contribuindo para destruição tecidual progressiva nas lesões de periodontite. Gustafsson *et al.* (2006) evidenciaram a hiperreatividade de monócitos periféricos estimulados por LPS de *E. coli* e *S.aureus* provenientes de pacientes com periodontite crônica em relação a pacientes saudáveis, através da maior secreção de IL-1 β e uma maior tendência de secreção de TNF- α pelas células dos pacientes com periodontite, além de uma maior geração de radicais de oxigênio por neutrófilos periféricos dos mesmos pacientes. Dessa forma, estes estudos demonstram a associação das citocinas próinflamatórias com a severidade da doença periodontal, além da hiperativação de componentes do sistema imune inato, como os monócitos/macrófagos e neutrófilos.

A importância das citocinas na patogênese da doença periodontal vai além das suas ações na ativação da resposta imune inata e no processo inflamatório destrutivo. As citocinas conectam as respostas imune inata e adaptativa reguladas pelos linfócitos T (Preshaw *et al.*, 2007). Assim, a resposta imune induzida por infecção é regulada pelo equilíbrio entre as citocinas Th1 ou tipo 1, secretadas por linfócitos T helper 1 (Th1), e

citocinas Th2 ou tipo 2, secretadas por linfócitos T helper 2 (Th2). A principal função das citocinas Th1 (IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IFN- γ) é ativar a resposta imune celular, enquanto das citocinas Th2 (IL-3, IL-4, IL-10, IL-13) é suprimir a resposta imune celular, ativando, por outro lado, a resposta imune humoral mediada por anticorpos (Gemmell & Seymour, 2004). Seymour *et al.* (1993) propuseram uma hipótese em que as células e citocinas Th1 estariam mais associadas com as lesões estáveis periodontais (gingivite), enquanto a resposta Th2 estaria mais associada com a progressão da doença (lesões progressivas de periodontite). Dessa forma, durante a resposta Th1, fagocitose de bactérias por leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, ativada por IFN- γ , tenta conter a injúria tecidual, porém o processo inflamatório persiste devido à inabilidade da resposta imune inata de erradicar as injúrias advindas do biofilme subgingival. A resposta Th2, por sua vez, caracterizada pela ativação de linfócitos B e produção de anticorpos, seria capaz de erradicar a infecção, se os anticorpos produzidos forem efetivamente protetores, porém, se não o forem, a destruição tecidual progride, através da contínua ativação dos linfócitos B, resultando na produção crônica e excessiva, sobretudo, de IL-1 (Gemmell & Seymour, 2004; Southerland *et al.*, 2006). Por outro lado, há evidências que suportam a predominância de células e citocinas Th1 ou a redução da resposta Th2 em biópsias de lesões progressivas de periodontite, no GCF de sítios ou no sangue de pacientes com periodontite (Ejeil *et al.*, 2003; Gróska *et al.*, 2003; Seymour & Taylor, 2004; Kurtis *et al.*, 2005; Honda, *et al.*, 2006). O controle do equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 é, então, fundamental para a imunoregulação da doença periodontal, e parece que diferenças sutis entre o equilíbrio das citocinas Th1 ou Th2, pró ou anti-inflamatórias, podem resultar em diferentes expressões desta patologia. Esta imunoregulação pode ser influenciada por diversos fatores que incluem, além da natureza da resposta imune inata, a natureza dos antígenos, a natureza das células apresentadoras de antígeno, a afinidade dos receptores dos linfócitos T (TCR) e a genética (Gemmell & Seymour, 2004; Seymour & Taylor, 2004).

Diante do que foi exposto, parece racional propor que alterações substanciais em moléculas imunologicamente ativas, como o resultado da influência de um agente modificador sistêmico, como o diabetes tipo 2, pode perturbar o equilíbrio final das

interações entre as citocinas no periodonto, levando a alterações nas respostas imunes locais e na susceptibilidade às doenças periodontais (Naguib *et al.*, 2004).

2.3. Influência do diabetes tipo 2 na patogênese da doença periodontal crônica

A resistência insulínica associada à deficiência na secreção deste hormônio, características do Diabetes tipo 2, resultam no estado hiperglicêmico crônico, principal responsável pelo desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes, como a maior susceptibilidade a infecções, sobretudo àquelas periodontais, com um risco de 2.9 vezes mais para os pacientes diabéticos com pobre controle glicêmico (Tsai *et al.*, 2002; Southarland *et al.*, 2006; King, 2008). Desde que a periodontite têm sido sugerida como a sexta complicação clássica do diabetes (Løe, 1993), os mecanismos pelos quais o ambiente hiperglicêmico pode ativar a resposta imune inata no periodonto, são similares àqueles associados ao desenvolvimento de outras complicações diabéticas e incluem o aumento da formação dos produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) e suas ações; o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e suas ações; ativação do eixo proteína quinase C / diacilglicerol; ativação da via do poliol / aldose redutase (Mealey & Oates, 2006; Southarland *et al.*, 2006; Nassar *et al.*, 2007; King, 2008).

A desregulação metabólica no diabetes como resultado da exposição crônica a níveis elevados de glicose, pode culminar com a glicosilação não-enzimática de proteínas e lipídios encontrados nos tecidos, sangue e parede dos vasos. (Mealey & Oates, 2006; Southarland *et al.*, 2006; Nassar *et al.*, 2007). Estes produtos glicoprotéicos quimicamente estáveis e irreversíveis, denominados produtos finais da glicosilação avançada (AGES), têm sido fatores primordiais envolvidos no desenvolvimento das complicações associadas ao diabetes, como lesões vasculares, neuropatia, deficiência em funções imunológicas, demonstrando múltiplos efeitos nas interações célula-célula e célula-matriz (Mealey & Oates, 2006; Southarland *et al.*, 2006; Nassar *et al.*, 2007). A formação de AGES ocorre no

periodonto, de modo que se verificou um maior acúmulo de AGES no periodonto de indivíduos diabéticos que daqueles não-diabéticos (Schmidt *et al.*, 1996).

Em relação a seus efeitos nas interações célula-célula, os AGEs ativam seus receptores específicos (RAGES) localizados na superfície de vários tipos celulares tais como células musculares lisas, neurônios, monócitos/macrófagos, células endoteliais e células mesangiais glomerulares (Mealey & Oates, 2006; Southarland *et al.*, 2006; Nassar *et al.*, 2007). Estes receptores encontram-se no periodonto, de modo que foi identificado um aumento de 50% no RNAm dos RAGES no tecido gengival de diabéticos tipo 2 em comparação ao tecido dos controles não-diabéticos (Schmidt *et al.*, 1996). A interação dos AGEs com seus RAGES na superfície de monócitos/macrófagos aumenta o estresse oxidativo intracelular, através da geração de espécies reativas de oxigênio, como também ativa o NF- κ B, resultando em um fenótipo celular hipersecretor de citocinas próinflamatórias como IL-1 β e TNF- α . Os AGEs ainda aumentam a atividade respiratória dos neutrófilos, através da maior ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), conferindo a maior produção local de espécies reativas de oxigênio (Preshaw *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, os RAGES na superfície das células endoteliais parecem funcionar como receptores de adesão, ligando-se diretamente a β_2 - integrinas de leucócitos, além de, ativados pelos AGEs, aumentam a expressão nas células endoteliais de moléculas de adesão como o VCAM-1, estando diretamente envolvidos no recrutamento de células inflamatórias (Mealey & Oates, 2006; Southarland *et al.*, 2006). O aumento na produção das citocinas próinflamatórias contribui para a maior permeabilidade vascular e formação de trombos, bem como para um padrão de resposta imunoinflamatória mais exacerbada, caracterizada pela formação de fenótipos celulares mais destrutivos, produtores de metaloproteinases e indutores do estresse oxidativo local, culminando com a maior destruição tecidual periodontal evidenciada em pacientes diabéticos, sobretudo, naqueles com pobre controle glicêmico (Mealey & Oates, 2006). Esta interação AGE-RAGE explica, em parte, os maiores níveis de IL-1 β , TNF- α e prostaglandina E₂ (PGE₂) observados no fluido crevicular gengival de pacientes diabéticos com periodontite crônica em comparação com aqueles não-diabéticos (Engelbreton *et al.*, 2004). Paralelamente, o bloqueio da ativação dos RAGES pelo seu domínio extracelular solúvel (sRAGE), ligando-se às moléculas ligantes destes receptores de

superfície, em um modelo de indução de doença periodontal em ratos diabéticos, diminuiu os níveis de TNF- α , IL-6 e metaloproteinases no tecido gengival, o acúmulo de AGES nos tecidos periodontais, além da perda óssea alveolar induzida por *Porphyromonas gingivallis* (Lalla *et al.*, 2000).

Já em relação aos seus efeitos nas interações célula-matriz, a glicosilação do colágeno, aumentando as ligações cruzadas entre estas moléculas, resulta na formação de macromoléculas colágenas altamente estáveis e pouco solúveis, que se acumulam nos tecidos em virtude da sua resistência à degradação enzimática fisiológica e ao turnover tecidual (Mealey & Oates, 2006; Nassar *et al.*, 2007). O aumento da espessura da membrana basal das células endoteliais, pelo acúmulo de macromoléculas de colágeno tipo IV modificadas por AGES e pelo aumento da produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), indutor de neovascularização, pode ser verificado nos vasos sanguíneos do periodonto e tecido gengival, respectivamente, nos pacientes diabéticos, prejudicando as trocas metabólicas e aumentando o estresse oxidativo tecidual (Frantzis *et al.*, 1971; Unlu *et al.*, 2003).

A deficiência no reparo tecidual e no processo cicatricial representa uma complicação crônica importante nos pacientes diabéticos, prejudicando a sua capacidade de restauração da homeostase tecidual, tornando-os mais susceptíveis aos danos inerentes, sobretudo, dos processos infecciosos. Esta deficiente capacidade reparadora resulta, principalmente, da redução do turnover metabólico do colágeno, caracterizado, por uma redução na degradação da molécula recentemente sintetizada, já que as macromoléculas colágenas modificadas por AGES, altamente estáveis e pouco solúveis são resistentes a degradação enzimática fisiológica, como também pela redução na síntese celular de novas moléculas. Estes eventos contribuem para alterações no turnover normal do colágeno, no qual moléculas recentemente sintetizadas são rapidamente degradadas por níveis elevados de metaloproteinases ativas, ao mesmo tempo em que são rapidamente repostas por nova síntese. A redução de células produtoras de matriz, fundamentais para a manutenção da homeostase tecidual do periodonto frente à agressão bacteriana, incluindo fibroblastos e osteoblastos, decorre do aumento na taxa de apoptose celular em um ambiente hiperglicêmico em resposta a infecção por *P. gingivallis* (He *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006).

Além disso, fibroblastos humanos gengivais apresentam uma taxa de produção de colágeno e glicosaminoglicanos diminuída em ambientes com altas concentrações de glicose (Willershausen-Zonnchen *et al.*, 1991). Associado a uma redução na sua formação, o colágeno recentemente sintetizado é susceptível a degradação pelas metaloproteinases, como as collagenases, que se encontram elevadas nos tecidos de pacientes diabéticos, incluindo o periodonto (Sorsa *et al.*, 1992). Além disso, tem sido evidenciada uma deficiência no reparo e turnover ósseo associado à hiperglicemia, como resultado da inibição da proliferação e diferenciação de osteoblastos, bem como da sua produção de matriz colágena, contribuindo ainda para a menor qualidade das propriedades mecânicas do novo osso formado (Lu *et al.*, 2003). Estas evidências demonstram como os pacientes diabéticos são mais suscetíveis a apresentarem uma perda óssea e de inserção conjuntiva periodontal mais severa, resultante de um inadequado metabolismo tecidual conjuntivo e ósseo relativo a alterações nos processos de degradação e remodelação dos tecidos do aparato de inserção periodontal (Mealey & Oates, 2006). Assim, a formação dos AGES amplificada pelo diabetes, aumentando a produção e secreção de citocinas próinflamatórias e a atividade oxidativa dos neutrófilos, predispõe à inflamação crônica, destruição progressiva e diminuição da capacidade de reparo tecidual, tornando os pacientes diabéticos indivíduos hiperresponsivos, ativando respostas imuno-inflamatórias exacerbadas no tecido periodontal, sendo mais propensos a desenvolverem formas mais severas dessas doenças (Preshaw *et al.*, 2007).

Pela via do polioliol, a glicose é oxidada a sorbitol e, posteriormente a frutose, através, respectivamente, da aldose redutase e da sorbitol desidrogenase. As reações de oxidação utilizam NADPH oxidase como co-fator. O grande consumo de NADPH, devido ao excesso de influxo de glicose e a super ativação da via do polioliol, culmina com efeitos deletérios na homeostase celular, como a alteração do equilíbrio de oxi-redução, causando um aumento do estresse oxidativo intracelular. Estresse oxidativo, então, resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ação de mecanismos antioxidantes. A hiperglicemia pode ainda culminar com a produção de ROS por meio de outros processos, como aumento na formação dos AGES, disfunção na cadeia de transporte mitocondrial de elétrons e ativação do eixo proteína quinase C / diacilglicerol (Nassar *et al.*, 2007). A ativação patológica da proteína quinase C, especialmente da sua

isoforma β , parece ocorrer no diabetes como resposta à hiperglicemia através do aumento dos níveis de diacilglicerol, resultante, por sua vez, da interação AGE-RAGE na superfície das membranas celulares e do aumento do estresse oxidativo induzido pela ativação da via do poli-ol. A proteína quinase C ativada parece regular a ativação da NADPH oxidase na membrana plasmática celular, aumentando a produção de ROS e, assim, o estresse oxidativo (Nassar *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2007). As espécies reativas de oxigênio produzidas, como ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, resultam em danos em várias moléculas biológicas, tais como DNA, lipídios e proteínas. Além disso, sua prolongada existência e ação promovem uma severa destruição tecidual e morte celular (Nassar *et al.*, 2007). Em vista disso, foi examinada a geração de superóxido bem como a atividade da proteína quinase C em neutrófilos de 50 pacientes diabéticos, de modo que neutrófilos de pacientes diabéticos com controle glicêmico moderado ou ruim secretaram significativamente mais superóxido do que aqueles de pacientes diabéticos com bom controle glicêmico ou de indivíduos controles saudáveis. Além disso, estas células exibiram aumento da atividade da proteína quinase C, elevados níveis de diacilglicerol, bem como aumento na atividade da NADPH oxidase, sugerindo que a hiperglicemia é capaz de ativar neutrófilos, enquanto o aumento da atividade da proteína quinase C resulta em aumento do estresse oxidativo (Karima *et al.*, 2005).

Por outro lado, neutrófilos de pacientes diabéticos apresentaram redução na quimiotaxia, fagocitose e na inibição da apoptose induzida por lipopolissacarídeo, culminando com o aumento da evasão destas células pelos patógenos agressores (Preshaw *et al.*, 2007; Nassar *et al.*, 2007). Dessa forma, verifica-se que a ativação exacerbada, bem como a deficiência da atividade dos componentes da resposta imune inata do hospedeiro, predis põem os indivíduos a uma maior destruição tecidual periodontal, como resultado da desregulação imunoinflamatória presente no diabetes.

2.4. A influência da doença periodontal na inflamação crônica de baixo grau característica do diabetes tipo 2

Apesar de a literatura atual fornecer evidências consistentes de que o diabetes representa um fator de risco para a maior prevalência e severidade das várias formas de doença periodontal, tais como as gengivites e periodontites (Mealey & Oates, 2006; Salvi *et al.*, 2008), o impacto das doenças periodontais no controle glicêmico e patogênese do diabetes ainda não está bem elucidado, assim como os mecanismos através dos quais essa influência possa ocorrer (Mealey & Oates, 2006; Lalla, 2007). Assim, as doenças periodontais crônicas, caracterizadas pela ativação de uma resposta imunoinflamatória crônica induzida por citocinas, podem servir como estímulo e/ou perpetuação do estado sistêmico inflamatório crônico, associado à patogênese do diabetes tipo 2, constituindo um fator de risco para um controle metabólico inadequado nestes pacientes, através do aumento da resistência insulínica, como também para o desenvolvimento das complicações diabéticas (Taylor *et al.*, 1996; Salvi *et al.*, 2008; Mealey & Rose, 2008).

Através da análise de dados do terceiro levantamento para exame nutricional e de saúde pública (NHANES III), demonstrou-se que a prevalência do diabetes, de 12.5% em indivíduos periodontalmente comprometidos (N=1293), foi o dobro em comparação com a de 6.3% verificada naqueles indivíduos periodontalmente saudáveis (N=12,178). Ao mesmo tempo, analisando-se mulheres não-diabéticas japonesas, verificou-se uma associação entre a maior severidade da doença periodontal e o desenvolvimento do estado pré-diabético de intolerância à glicose e com a presença de sinais de síndrome metabólica (Saito *et al.*, 2004; Shimazaki *et al.*, 2007). Além disso, observou-se que diabéticos tipo 2 com periodontite severa apresentaram maiores níveis de HbA1C e complicações cardiovasculares em comparação aos indivíduos diabéticos periodontalmente saudáveis (Jansson *et al.*, 2006).

O conhecimento acerca dos mecanismos pelos quais as doenças periodontais podem influenciar o estado diabético é limitado. Em uma condição de periodontite severa não tratada, a área de superfície correspondente ao epitélio ulcerado das bolsas periodontais

tem sido estimada, medindo entre 8 a 20 cm², medida esta aproximada do tamanho da palma da mão de um adulto (Hujuel *et al.*, 2001). Esta área epitelial inflamada e ulcerada subgingival das bolsas periodontais constitui uma porta de entrada importante, de modo a conferir um grande potencial para as bactérias periodontopatogênicas, seus produtos (endotoxinas como os LPS) e mediadores inflamatórios estimulados, atingirem à circulação sistêmica (Loos, 2005; Mealey & Rose, 2008). Bacteremia e endotoxemia podem ser induzidas por procedimentos dentários, assim como por atividades cotidianas, como a mastigação, sendo capazes de induzir um estado inflamatório, caracterizado pela presença de níveis aumentados de marcadores inflamatórios na corrente circulatória, detectados no soro plasmático (Geerts *et al.*, 2002; Mealey & Oates, 2006; Mealey & Rose, 2008). Assim, mediadores e citocinas próinflamatórias produzidos localmente no periodonto, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂, são lançados na corrente circulatória, e conseqüentemente, podem causar efeitos em tecidos diversos e distantes, tais como células sanguíneas (leucócitos e eritrócitos), endoteliais e hepatócitos, da mesma maneira que outras infecções ou processos inflamatórios crônicos, resultando na indução da resposta de fase aguda através da ativação do sistema imune inato, caracterizada pela produção e presença sérica das proteínas de fase aguda (Loos, 2005). Estudos têm demonstrado níveis aumentados de mediadores inflamatórios em indivíduos com periodontite (Loos *et al.*, 2000; Loss, 2005), de modo que, particularmente aqueles colonizados por bactérias periodontopatogênicas Gram – negativas, como *Porphyromonas gingivallis*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, apresentam níveis significativamente aumentados de proteína-C-reativa, IL-6 e fibrinogênio em comparação com indivíduos sem periodontite (Noack *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2000; Loss, 2005). Em culturas de sangue total de indivíduos saudáveis, *Porphyromonas gingivallis*, principal periodontopatógeno, induziu uma população mista de leucócitos a produzir elevados níveis de citocinas, como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ , e quimiocinas como IL-8, MCP-1, demonstrando a capacidade da infecção periodontal de, ativando células imune circulatórias, contribuir para o estado inflamatório crônico sistêmico (Bodet *et al.*, 2005). O tratamento periodontal, por sua vez, não só promove a redução inflamatória clínica local, mas tem sido associado com a subsequente diminuição sérica de IL-6 e

proteína-C-reativa, demonstrando que as doenças peridontais possuem efeitos sistêmicos que transpõem o local do ambiente periodontal (D'Aiuto *et al.*, 2004).

A inflamação crônica, através da ação dos mediadores inflamatórios, é o principal fator associado ao desenvolvimento da resistência insulínica, também influenciada por fatores genéticos, bem como por fatores modificadores ambientais, incluindo diminuição da atividade física, erro alimentar, obesidade e infecção (Donath *et al.*, 2003; King, 2008). Baseado nos conhecimentos prévios já apresentados acerca dos mecanismos que promovem o desenvolvimento da resistência insulínica, verifica-se que tanto os componentes bacterianos Gram-negativos (LPS), como as citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6, advindas da infecção periodontal, podem, através da ligação com receptores específicos, ativar mecanismos intracelulares associados à resistência insulínica, tais como os eixos da I-kappa-B (IkB) quinase- β (IKK β) / fator nuclear-kappaB (NF-k β) e da proteína quinase c-Jun-NH₂-terminal (JNK), tanto localmente, como sistemicamente, por alcançar a corrente circulatória, ativando-os nos adipócitos, hepatócitos, células imune (macrófagos/monócitos) e endoteliais (Shoelson *et al.*, 2006). Assim, estes processos intracelulares inflamatórios, uma vez ativados pela infecção periodontal, autoperpetuam-se através de um feedback positivo induzido pelas próprias citocinas inflamatórias produzidas, contribuindo para o estado sistêmico inflamatório crônico subclínico, resultando no aumento da resistência insulínica e piora do controle glicêmico nos indivíduos diabéticos tipo 2 (Shoelson *et al.*, 2006; Southerland *et al.*, 2006; Mealey & Oates, 2006; Preshaw *et al.*, 2007; Mealey & Rose, 2008). Isto pode explicar porque a presença de peridontite aumenta os riscos para um controle metabólico inadequado em diabéticos tipo 2 (Taylor *et al.*, 1996). Ao nível tecidual, é possível, então, que a infecção periodontal, através dos seus produtos inflamatórios resultantes da ativação da resposta imune inata, possa estimular monócitos circulantes, bem como macrófagos residentes nos tecidos, como as células de Kupffer no tecido hepático, bem como aqueles que são recrutados tanto para o tecido adiposo como para o hepático, a produzirem elevados níveis de TNF- α , IL-6, contribuindo para o aumento da resistência insulínica em ambos os tecidos. Estas citocinas, ativando ou sendo produzidas por adipócitos e hepatócitos, células sensíveis à ação da insulina, contribuem para a resistência insulínica não só local destes tecidos, mas também sistêmica,

podendo afetar músculo esquelético e outros tecidos. A IL-6 também estimula os hepatócitos a produzirem as proteínas de fase aguda, como a proteína-C-reativa, perpetuando a ativação do sistema imune inato (Gabay & Kushner, 1999; Southerland *et al.*, 2006). A obesidade, principal responsável pelo quadro de resistência insulínica do diabetes tipo 2, por sua vez, tem sido associada à doença periodontal, já que a análise dos dados do terceiro levantamento para exame nutricional e de saúde pública (NHANES III) relacionados a pacientes não diabéticos, revelou uma associação positiva entre o índice de massa corpórea (IMC) e a severidade da perda de inserção periodontal. Indivíduos com sobrepeso (IMC ≥ 27 kg/m²) e uma maior resistência insulínica apresentaram um risco de 1.48 vezes maior para doença periodontal mais severa comparados aos indivíduos com sobrepeso, porém sem resistência insulínica. Além disso, indivíduos no quartil superior de IMC (IMC ≥ 30.8 kg/m²) apresentaram níveis séricos significativamente elevados de TNF- α e de seus receptores comparados àqueles no quartil inferior de IMC (IMC < 24.6 kg/m²), indicando que a obesidade está associada tanto à inflamação sistêmica como à doença periodontal, sendo a resistência insulínica a possível mediadora desta inter-relação (Genco *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo, Losche *et al.* (2000) verificaram maiores níveis significativos de colesterol total, de lipoproteína de baixa densidade (LDL), de triglicérides e de glicose em jejum em 39 indivíduos não-diabéticos com periodontite de leve a moderada comparados a 40 indivíduos pareados por sexo e idade não-diabéticos periodontalmente saudáveis, demonstrando uma possível interferência da inflamação crônica periodontal no metabolismo lipídico, favorecendo à resistência insulínica.

As periodontites podem contribuir para a elevação dos mediadores inflamatórios séricos por, principalmente três processos (Engebretson *et al.*, 2007). O primeiro mecanismo seria a elevação da produção *in vitro* de citocinas e mediadores inflamatórios por monócitos de pacientes diabéticos com periodontite, indicando uma resposta inflamatória inata exacerbada por monócitos de pacientes diabéticos frente ao desafio bacteriano. Salvi *et al.* (1997, 1998), analisando pacientes diabéticos tipo 1 e não-diabéticos divididos em 2 subgrupos de acordo com a severidade da doença periodontal (Grupo A- pacientes com gengivite e periodontite leve e Grupo B- pacientes com periodontite moderada a severa), verificaram uma produção significativamente maior de

PGE₂ (4.2 vezes maior), de IL-1 β (4.4 vezes maior) e de TNF- α (4.6 vezes maior) por monócitos dos pacientes diabéticos estimulados por LPS de *P. gingivalis* quando comparados aos pacientes não-diabéticos controles com estados periodontais similares. Dentre os diabéticos, os monócitos do grupo B apresentaram uma secreção 3 vezes maior de PGE₂ e 6.2 vezes maior de TNF- α do que aqueles do grupo A, porém sem diferenças em relação à secreção de IL-1 β . Além disso, os diabéticos apresentaram níveis significativamente maiores de PGE₂ e IL-1 β no fluido crevicular gengival quando comparados aos não diabéticos controles com estados periodontais similares, porém, dentre os diabéticos, os níveis destes mediadores no fluido gengival foram 2 vezes maior no grupo B quando comparados ao grupo A, não havendo diferenças nos níveis de TNF- α . Araya *et al.* (2003), por sua vez, utilizando culturas de células totais de sangue periférico, estimuladas ou não por LPS de *Escherichia coli*, verificaram que não houve diferença entre a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 pelas células dos diabéticos tipo 1 com ou sem periodontite agressiva, ou destes comparados aos indivíduos controles saudios. Já os níveis de PGE₂ foram significativamente maiores nas culturas dos pacientes diabéticos em relação aos controles, não havendo diferenças entre os grupos diabéticos com ou sem periodontite agressiva. Ao mesmo tempo Pérez *et al.* (2004), através de culturas de células totais do sangue periférico, observaram que as concentrações de TNF- α nas culturas não estimuladas por LPS não diferiram entre os grupos de pacientes com periodontite agressiva, com diabetes tipo 1 e periodontite agressiva e apenas com diabetes tipo 1, quando comparados ao grupo controle sadio. Porém as concentrações de TNF- α nas culturas estimuladas de pacientes com periodontite agressiva foram significativamente maiores do que as dos grupos de diabéticos e também em relação aos controles saudios. Já os níveis de TNF- α séricos foram 3 vezes maiores nos grupos de pacientes quando comparados aos indivíduos controles.

O segundo e terceiro mecanismos seriam, por sua vez, a translocação das espécies Gram-negativas e de seus produtos provenientes do biofilme periodontal (Geerts *et al.*, 2002; Engebretson *et al.*, 2007) bem como das citocinas do espaço periodontal (fluido crevicular gengival) na corrente circulatória (Engebretson *et al.*, 2007). Em relação a este

último mecanismo, estudos demonstraram uma associação entre a piora do controle glicêmico com o aumento dos níveis de IL-1 β no fluido crevicular gengival, em indivíduos diabéticos tipo 2 com e sem periodontite crônica (Cutler *et al.*, 1999; Engebretson *et al.* 2004). Cutler *et al.* (1999), comparando ainda indivíduos diabéticos com adequado e inadequado controle metabólico, apresentando ou não periodontite crônica, observaram maiores níveis de IL-1 β no fluido gengival de pacientes diabéticos com periodontite crônica em ambos os níveis de controle metabólico. Engebretson *et al.* (2007), avaliando 46 pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica, demonstraram uma correlação significativa e positiva entre os níveis séricos de TNF- α e a perda de inserção clínica, os níveis plasmáticos de endotoxina, os níveis de IL-1 β no fluido crevicular gengival, porém, uma ausência de correlação com o IMC e os níveis séricos de glicose e HbA1c. Além disso, uma relação dose-dependente foi verificada entre o grau de severidade da destruição periodontal e os níveis séricos de TNF- α , sugerindo que a infecção e inflamação periodontal podem ser um fatores importantes para a elevação desta citocina, estreitamente relacionada com a resistência insulínica nos pacientes diabéticos tipo 2.

O tratamento periodontal, por sua vez, reduzindo a infecção e inflamação periodontal, pode ajudar a restaurar a sensibilidade insulínica, resultando em uma melhora do controle metabólico em pacientes com diabetes tipo 2 (Mealey & Oates, 2006; Mealey & Rose, 2008). Esta hipótese tem sido suportada por estudos intervencionistas, cujos resultados vêm demonstrando diminuição dos níveis sistêmicos dos mediadores inflamatórios e melhora do controle metabólico após a terapia periodontal. Foi demonstrado que a terapia periodontal não cirúrgica associada à utilização local adjunta de 10 mg de minociclina nas bolsas periodontais de pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica, reduziu os níveis circulatórios de TNF- α (Iwamoto *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2003), de modo que, esta redução foi acompanhada de uma diminuição significativa nos valores médios de HbA1c, de 8% para 7.1% , bem como nos níveis de insulina em jejum ($p < 0.03$) e índices de resistência insulínica ($p < 0.03$) dos pacientes que não utilizavam insulina para o tratamento do diabetes (Iwamoto *et al.*, 2001). Entretanto, os níveis séricos de TNF- α não foram significativamente afetados 4 semanas (Lalla *et al.*, 2007) e 12 semanas (Talbert *et*

al., 2006; O'Connell *et al.*, 2008) após terapia periodontal não-cirúrgica. Lalla *et al.* (2007), em um estudo piloto, submeteu 10 pacientes com diabetes tipo 1 ou 2 e periodontite moderada a severa a um debridamento subgingival em duas sessões dentro de 2 semanas, de modo que foram colhidas amostras sanguíneas no baseline e 4 semanas pós tratamento, para análise sérica de mediadores inflamatórios bem como para determinar a capacidade próinflamatória de células mononucleares, cultivadas sob o estímulo ou não de LPS ou ionomicina/éster de forbol, analisadas por citometria de fluxo. Após 4 semanas da terapia periodontal, houve uma redução significativa de 47% na porcentagem de monócitos CD14⁺ ($p < 0.05$) e de 78% de macrófagos produtores de TNF- α , sem estímulo, ($p < 0.05$), apesar de não ter havido diferença na porcentagem destas células quando estimuladas. Dentre os mediadores inflamatórios testados, houve reduções significativas de 37% de proteína-C-reativa e de 16.6% de E-selectina. O'Connell *et al.* (2008), em um estudo duplo-cego, placebo-controlado, comparando o tratamento não cirúrgico com e sem terapia adjunta antibiótica com doxiciclina sistêmica, 100mg/d, por 14 dias, em 30 pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica, não verificaram diferenças entre ambos os tratamentos em relação à melhora clínica periodontal dos pacientes, bem como à melhora do controle metabólico, apesar do tratamento com doxiciclina ter reduzido significativamente a HbA1c em 1.5% ($p < 0.01$), 3 meses pós terapias. Reduções significativas nos níveis séricos de IL-6, proteína 10 induzida por interferon (IP-10), porções solúveis do ligante fas (sFasL), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), RANTES e IL-12 (p70), também foram detectadas após 3 meses de ambos os tratamentos.

Resultados de uma meta-análise, por sua vez, envolvendo 10 estudos intervencionistas, incluindo 456 indivíduos com diabetes tanto tipo 1 como tipo 2, demonstraram que, após terapia periodontal não-cirúrgica, houve uma redução de aproximadamente 0.38% nos níveis de HbA1c para todos os estudos, de 0.66% para aqueles que envolveram apenas os indivíduos diabéticos tipo 2 e de 0.71% quando foram utilizados antibióticos como terapias adjuntas, porém ser atingir significância estatística (Janket *et al.*, 2005). Alguns estudos clínicos randomizados e controlados confirmaram os resultados da meta-análise, verificando que, após 3 e 4 meses respectivamente, a terapia periodontal não-cirúrgica associada à utilização sistêmica de doxiciclina 100mg/d por 14

dias não foi capaz de promover reduções significativas nos níveis de HbA1c de indivíduos diabéticos tipo 2 com periodontite crônica (teste:HbA1C $-0.19\pm 0.74\%$) / (teste:HbA1C -0.65%) quando comparados aos indivíduos com as mesmas condições diabética e periodontal sem tratamento (controle:HbA1C $+0.12\pm 1.05\%$) / (controle:HbA1C -0.51%), ($p>0.05$ / $p=0.47$) (Promsudthi *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007). Outras pesquisas, por outro lado, demonstraram melhorias significativas no controle metabólico quando compararam a terapia periodontal mecânica em estágio único (HbA1C -0.86%) com a ausência de tratamento (HbA1C $+0.31\%$) em pacientes diabéticos tipo 2 com a mesma condição periodontal ($p=0.033$) (Kiran *et al.*, 2005), como também quando avaliaram os efeitos da terapia periodontal mecânica convencional em pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica moderada generalizada, 3 (baseline / 3 meses: $7.6\pm 1.5\%$ a $6.3\pm 1.1\%$, $p<0.05$) e 6 (baseline / 6 meses: $7.6\pm 1.5\%$ a $5.8\pm 0.6\%$, $p<0.003$) meses pós terapia (Faria-Almeida *et al.*, 2006). Rodrigues *et al.* (2003), comparando os efeitos da desinfecção em estágio único associada ou não a 875 mg de amoxicilina + ácido clavulânico, 2 vezes ao dia por 2 semanas, em 30 pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica, verificaram uma redução da HbA1c após 3 meses de ambos os tratamentos, porém sendo significativo apenas com o tratamento sem antibiótico ($8.8\pm 1.8\%$ para $7.6\pm 1.4\%$; $p<0.05$). Navarro-Sanchez *et al.* (2007), também verificaram melhoria no controle metabólico após 3 (baseline / 3 meses: $-0.7\pm 1.1\%$, $p<0.016$) e 6 (baseline / 6 meses: $-1.3\pm 1.4\%$, $p<0.016$) meses da terapia periodontal não-cirúrgica convencional, em indivíduos diabéticos tipo 2 com periodontite crônica moderada generalizada, ao comparar sua eficiência em indivíduos não-diabéticos com o mesmo status periodontal. Além disso, houve reduções significantes nos níveis de IL-1 β e TNF- α no fluido crevicular gengival, bem como no seu volume total, em ambos os grupos após 3 e 6 meses do tratamento periodontal, sem diferenças entre os mesmos.

Assim, apesar da dificuldade de interpretação dos resultados conflitantes destes estudos intervencionistas, uma forte evidência científica suporta a hipótese de que as infecções periodontais podem servir como agravantes da resistência insulínica em uma maneira similar à obesidade, através do aumento da ativação da resposta imune inata

crônica sistêmica induzida por citocinas (inflamação crônica de baixo grau) nos pacientes diabéticos tipo 2, contribuindo para o agravamento do controle metabólico nestes pacientes.

3. Proposição

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo clínico foi avaliar a influência sistêmica da periodontite crônica severa frente ao controle metabólico bem como do tratamento periodontal na resposta imunológica de pacientes diabéticos tipo 2, através da análise da secreção protéica e da expressão gênica de citocinas em células mononucleares aderentes de sangue periférico.

3.2. Objetivos específicos

- 1- Avaliar a influência sistêmica da periodontite crônica severa, frente ao controle metabólico adquirido por internação hospitalar, na resposta imunológica de pacientes diabéticos tipo 2, através da análise da secreção protéica, por ELISA, bem como da expressão gênica, por PCR em tempo real, das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 por células mononucleares aderentes de sangue periférico, estimuladas ou não por LPS, cultivadas antes e após a obtenção do controle metabólico.
- 2- Avaliar a influência do tratamento periodontal na resposta imunológica de pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica severa, através da análise da secreção protéica, por ELISA, bem como da expressão gênica, por PCR em tempo real, das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 por células mononucleares aderentes de sangue periférico, estimuladas ou não por LPS, cultivadas 4 a 6 semanas após a finalização do tratamento periodontal.
- 3- Avaliar a influência do controle metabólico e do tratamento periodontal nos parâmetros clínicos e laboratoriais, como peso, IMC, HbA1c, glicemia em jejum, colesterol total, LDL, HDL, triglicérides, bem como em provas

inflamatórias e mediadores inflamatórios, tais como velocidade de hemossedimentação, proteína-C-reativa e α -ácido glicoproteína, obtidos dos indivíduos diabéticos tipo 2 com e sem periodontite crônica antes e após a obtenção do controle metabólico, bem como daqueles com periodontite crônica severa 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal.

- 4- Avaliar o efeito do tratamento periodontal nos parâmetros clínicos periodontais, como índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, nível de inserção clínico relativo, obtidos dos pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica severa 3 meses após o tratamento periodontal.

4. Material e Métodos

4.1. Seleção dos pacientes

Foram selecionados 20 pacientes no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, entre 30 e 70 anos de idade, com peso corpóreo acima de 50 Kg, de ambos os gêneros, portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, apresentando controle metabólico inadequado, com e sem doença periodontal crônica. A seleção dos pacientes obedeceu aos seguintes critérios de exclusão, que pudessem influenciar o status periodontal bem como seu estado metabólico: possuir menos de 15 dentes; tempo de diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 maior que 10 anos; história de qualquer doença que comprometa severamente a função imunológica ou terapia imunossupressora; síndrome genética; história de outras doenças infecciosas que não a periodontite; doenças hematológicas; gravidez e lactação; complicações crônicas microvasculares e macrovasculares do Diabetes Mellitus como retinopatia proliferativa, nefropatia avançada, neuropatia autonômica e presença de sinais avançados de aterosclerose; história de tabagismo atual ou período de abstinência de até 5 anos; alcoolismo ou ingestão de drogas ilícitas; antibioticoterapia no último mês; tratamento periodontal nos últimos 6 meses; terapia crônica com anti-inflamatórios não esteroidais ou esteroidais. Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob processo HCRP n° 13130/2006 para pesquisas em humanos. Os pacientes foram informados sobre a natureza da pesquisa através de um documento de solicitação para participação da mesma, de modo que aqueles que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento. Para os pacientes que não apresentavam instrução suficiente para entendimento, foi feita explanação verbal após leitura deste documento.

4.2. Delineamento do estudo

Os 20 pacientes selecionados para a pesquisa foram divididos em 2 grupos: 10 pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica, com controle metabólico (CM) inadequado (grupo teste); 10 pacientes diabéticos tipo 2 sem periodontite crônica, com controle metabólico inadequado (grupo controle). A reatividade dos monócitos provenientes do sangue periférico destes pacientes foi avaliada através da verificação da secreção protéica, bem como da expressão gênica de citocinas em ambos os grupos antes (Tempo 0) e após a compensação metabólica (Tempo 1), permanecendo inalterada a condição periodontal durante esta fase do experimento. Esta compensação se deu através de uma internação hospitalar. Após isto, aqueles pacientes portadores de periodontite crônica severa foram tratados, para que a reatividade de seus monócitos fosse novamente avaliada 4 a 6 semanas após a terapia periodontal (Tempo 2) (figura 4).

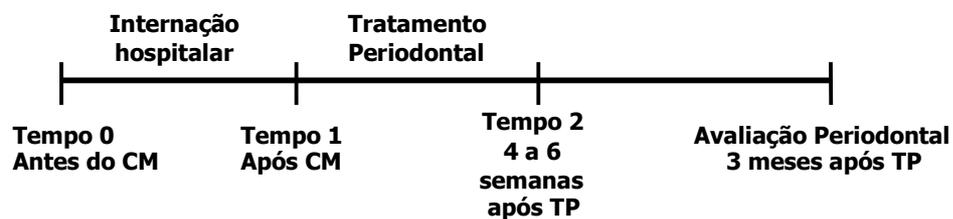


Figura 4 - Delineamento do estudo

4.3. Diagnóstico e classificação das doenças periodontais

Os pacientes foram submetidos a uma anamnese detalhada e avaliados clinicamente e radiograficamente por um mesmo periodontista, previamente calibrado ($Kappa > 0.8$), o qual registrou para cada paciente os seguintes parâmetros clínicos: ausência ou presença do biofilme, verificada dicotomicamente (adaptado de Løe, 1967); sangramento à sondagem (SS), verificado dicotomicamente; profundidade de sondagem (PS) – distância da margem gengival livre à base da bolsa; posição da margem gengival – localização da margem gengival livre em relação à posição da junção cimento-esmalte

(Medidas positivas para posições apicais à junção cimento-esmalte e negativas para posições coronais à mesma junção). A soma das medidas da PS e da localização da margem gengival foi utilizada para representar o nível de inserção clínico relativo (NIC). Tais parâmetros foram registrados em seis sítios por dente (MV, V, DV, ML, L, DL), utilizando-se uma sonda manual (PCPUNC 15, Hu-Friedy, Jacarepaguá – RJ, Brasil). Com base na perda de inserção prévia, os pacientes foram classificados nos seguintes grupos (critérios de inclusão):

Grupo teste - Pacientes diabéticos tipo 2 com controle metabólico inadequado e periodontite crônica severa (pelo menos 8 sítios distribuídos em 8 dentes com PS \geq 5 mm, NIC \geq 5 mm e sangramento à sondagem . Destes, no mínimo, 2 sítios devem ter profundidade de sondagem \geq 6mm e mais 2 devem ter profundidade de sondagem \geq 7mm) (adaptado de Wennström *et al.*, 2001) (figura 5 e 5A).

Grupo controle - Pacientes diabéticos tipo 2 com controle metabólico inadequado e sem periodontite (profundidade de sondagem \leq 3mm, sem perda de inserção, ou em periodonto reduzido, podendo apresentar ou não sangramento à sondagem) (Armitage, 1999) (figura 6).



Figura 5 - Aspecto clínico periodontal da paciente J.E., sexo feminino, 36 anos, portadora de periodontite crônica severa (grupo teste).



Figura 5A - Sextante 5 da paciente J.E.: bolsa periodontal com PS = 9mm, sangramento e supuração.



Figura 6 - Aspecto clínico periodontal da paciente M.C.N.A., sexo feminino, 45 anos, não portadora de peridontite (grupo controle).

4.4. Diagnóstico clínico e avaliação do controle metabólico do Diabetes Mellitus

O diagnóstico clínico e a caracterização dos pacientes incluídos na pesquisa foram obtidos a partir dos dados clínicos (anamnese e exame físico). Foram adotados os seguintes critérios de diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2: glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dL ou maior ou igual que 200 mg/dL 2 horas após a ingestão de 75 gramas de glicose anidra, confirmadas pela repetição do teste em outro dia, a menos que houvesse hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas de hiperglicemia (poliúria, polidipsia e perda de peso repentina), como também a presença de uma glicemia ao acaso ≥ 200 mg/dL associada aos sintomas de hiperglicemia (American Diabetes Association, 2009). Também foi avaliada a presença de alterações do

metabolismo lipídico através da dosagem de colesterol total (Rautela & Leidtke, 1978) e frações HDL (Warnick & Wood, 1995) e LDL (estimado pela fórmula de Friederickson) e triglicérides (Tietz, 1990).

Em relação ao controle metabólico, os pacientes foram avaliados segundo os seguintes exames: glicemia de jejum, determinada por método enzimático (Kenolab 60I, Weiner lab, Rosário – Argentina); glicosúrias fracionadas de 24 horas, determinadas por método colorimétrico (Metrolab 2300 Plus, Weiner lab, Rosário – Argentina); hemoglobina glicada total (HbA1c), determinada por método de cromatografia de troca iônica, cuja variação interensaio foi menor que 5% e a intra-ensaio menor que 2% (Trivelli *et al.*, 1971). Os pacientes diabéticos foram considerados com controle metabólico inadequado quando a glicemia em jejum era maior que 150 mg/dl e a hemoglobina glicada A1c maior que 7%. Vale ressaltar que os pacientes selecionados para o estudo deveriam apresentar um controle metabólico inadequado crônico, ou seja, possuírem ao menos as últimas três hemoglobinas glicadas maiores que 7%.

4.5. Avaliação das complicações crônicas do Diabetes Mellitus tipo 2

As complicações crônicas do Diabetes Mellitus foram avaliadas através de dados objetivos e subjetivos de macroangiopatia, microangiopatia (retinopatia e nefropatia) e neuropatia diabéticas. Aqueles pacientes que apresentassem qualquer tipo de complicação diabética crônica em grau avançado, como insuficiência renal crônica, retinopatia proliferativa, perda de sensibilidade dolorosa e comprometimento do sistema nervoso autônomo, foram excluídos do estudo.

A análise objetiva incluiu:

- Exame de fundo de olho com pupila dilatada e, quando necessário, angiografia fluoresceínica da retina, realizados por oftalmologistas da equipe de trabalho, especializados em retina. Não foram excluídos pacientes portadores de retinopatia diabética de base (não proliferativa), os quais apresentassem microaneurismas e/ou hemorragias, porém sendo excluídos

aqueles portadores de retinopatia proliferativa, os quais apresentassem áreas de neovascularização retiniana.

- Determinação de proteinúria 24h, por método de tubodimetria (Metrolab 2300 Plus, Weiner lab, Rosário – Argentina), sendo considerado nefropatia diabética valores superiores a 300 mg/24h, na ausência de outras causas de proteinúria.
- Exame neurológico, sendo considerado como critério mínimo para a presença de polineuropatia sensitivo-motora, queixas de parestesias ou dor nas extremidades, diminuição ou ausência de reflexos profundos e/ou diminuição da sensibilidade superficial e profunda. A presença de neuropatia autonômica foi estabelecida pela verificação de um ou mais dos seguintes sinais/sintomas: hipotensão postural, gastroparesia diabética, alterações da função intestinal, incontinência fecal e bexiga neurogênica. Impotência sexual isolada não foi considerada.
- O diagnóstico de macroangiopatia foi estabelecido através de sintomas de insuficiência arterial periférica, coronariopatia ou doença cérebro-vascular, associadas a alterações nos pulsos periféricos e outros sinais de insuficiência vascular periférica e anormalidades eletrocardiográficas isquêmicas.

4.6. Intervenção clínica I: Internação hospitalar para obtenção do controle metabólico

Os pacientes com controle metabólico inadequado foram hospitalizados por um período de 8 a 10 dias na Enfermaria da Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, com o objetivo de adquirir um controle metabólico. Antes da internação, os pacientes foram submetidos a uma investigação clínica da presença de doenças infecciosas ou inflamatórias assintomáticas, além da doença periodontal,

realizando-se avaliações hematológica (hemograma completo – por método de impedância e fotometria, Pentra 60, Montpellier – França) e urinária (sumário de urina tipo 1 – por método de colorimetria, Urisys 2400, Roche, Mannheim – Alemanha), assim como dosagem de proteína-C-reativa (PCR) por imunoturbidimetria (Dimension®, Dade Behring Inc. Newark, USA), α -ácido glicoproteína por imunoturbidimetria (Turbiquant®, Dade Behring Inc. Newark, USA) e velocidade de hemossedimentação (VHS). Estas últimas três provas inflamatórias foram repetidas ao final da internação. Os seguintes parâmetros laboratoriais, como glicemia de jejum, HbA1C, colesterol total, frações HDL, LDL e triglicérides, foram dosados antes da internação, tanto para o diagnóstico como para a avaliação do controle metabólico do diabetes, como também ao final da internação. No primeiro e último dia de internação, parâmetros clínicos dos pacientes, como peso e IMC foram registrados. Durante o período de internação foi realizado controle metabólico intensivo com dosagem de glicemia capilar em horário fixos (7, 11, 17 e 23 horas), e correção com insulina regular até que fosse atingida uma queda de no mínimo 100 mg/dL entre a média glicêmica diária inicial e final, de modo que foram utilizadas as médias glicêmicas diárias do primeiro e último dia de internação como parâmetros para a avaliação deste controle metabólico hospitalar. Esta correção foi realizada sempre que a glicemia capilar estivesse acima de 150 mg/dL para a manutenção de um equilíbrio glicêmico até a segunda coleta sanguínea.

4.7. Intervenção clínica II: Tratamento Periodontal

Após a obtenção do controle metabólico com a internação, os seguintes parâmetros clínicos periodontais, ausência ou presença do biofilme e sangramento à sondagem, ambos verificados dicotomicamente, foram novamente registrados de todos os pacientes do estudo (grupos controle e teste). Além disso, após a internação, os pacientes portadores de periodontite crônica severa (grupo teste) foram submetidos ao tratamento periodontal que constou de: instrução de higiene oral; raspagem e alisamento radiculares subgingivais dos quatro quadrantes em uma única sessão (com duração em média de 4

horas: 1 hora por quadrante), ou em duas sessões de 2 horas (2 quadrantes por sessão) dentro de 24 a 36 horas, sem a utilização de clorexidina (Quirynen et al., 2000), com a utilização de curetas de Gracey (Hu-Friedy, Jacarepaguá – RJ, Brasil) e ultra-som (Profi II, Dabi-Atlante, Ribeirão-Preto – SP, Brasil); utilização de antibioticoterapia sistêmica composta de Amoxicilina 500mg e Metronidazol 400 mg 3xd por 10 dias. Foram também registrados os seguintes parâmetros clínicos e laboratoriais 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal: glicemia em jejum; peso; IMC; HbA1C; colesterol total; frações HDL, LDL; triglicérides; VHS; PCR; α -ácido glicoproteína. Os pacientes com periodontite crônica severa (grupo teste) tiveram ainda seus parâmetros clínicos periodontais registrados novamente 3 meses após o tratamento periodontal.

4.8 Coleta de sangue para a cultura de células mononucleares aderentes do sangue periférico

Após a triagem dos pacientes para a sua inclusão na pesquisa, consentimento por escrito para participação no estudo, realização do exame clínico e radiográfico periodontal, bem como dos exames laboratoriais pré-internação e marcação da mesma, foram coletadas amostras de sangue periférico de cada participante da pesquisa, no primeiro e último dias da internação hospitalar para a compensação metabólica do diabetes mellitus. Para o grupo teste, a coleta sanguínea também foi realizada 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal, ao qual foi submetido após a compensação metabólica. A coleta das amostras sanguíneas foi, em sua maioria, realizada em jejum, no período da manhã. Foi feita, inicialmente, a assepsia do local com algodão embebido em álcool iodado, para, em seguida, realizar-se punção venosa com sistema BD Vacutainer (Beliver Industrial Estate, Plymouth – UK) e coleta de 18 a 20 mL de sangue em tubos heparinizados, em condições de esterilidade. O material coletado foi encaminhado para o laboratório de cultura de células para que se processasse o isolamento e culturas das células mononucleares aderentes do sangue periférico de cada indivíduo envolvido na pesquisa.

4.9. Cultura das células mononucleares aderentes do sangue periférico

As culturas foram desenvolvidas segundo protocolo já estabelecido no laboratório de Cultura de Células do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP para células mononucleares de sangue periférico descrito a seguir: Após a coleta de aproximadamente 18 a 20 mL de sangue em 2 tubos heparinizados de 10 mL, diluiu-se o sangue total com igual volume de salina estéril a 37°C e homogeneizou-se suavemente com pipeta de Pasteur. Em seguida, foi utilizado o gradiente de Ficoll-Hypaque^R (Sigma, St. Louis – MO – USA) para a separação das células mononucleares, procedimento no qual o sangue diluído foi aplicado delicadamente às paredes dos tubos de polipropileno contendo Ficoll-Hypaque^R. Após centrifugação a 400g (1600 rpm) - durante 30 minutos, à temperatura ambiente, verificou-se a formação das camadas distintas, sendo que a superior foi formada por plasma e solução fisiológica; a interface, por células mononucleares; a média, por gradiente Ficoll-Hypaque e a inferior, por granulócitos e hemácias. A camada de células mononucleares foi cuidadosamente aspirada e colocada em tubo cônico estéril. As células foram re-suspensas com salina hipertônica e lavadas duas vezes. Após remoção dos sobrenadantes, as células foram re-suspensas em 2 ou 3 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, St. Louis – MO – USA) para a realização da contagem das mesmas. Esta foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico, diluindo 20 µL da suspensão em 380 µL de corante Turk, que lisa hemácias e cora os núcleos dos glóbulos brancos para facilitar a contagem (diluição 1:20). As células encontradas nos quatro quadrantes foram somadas e multiplicadas por 50 (mm³), acrescentando-se três zeros para se estimar o número de células por mL. A suspensão de células foi diluída para uma concentração de 2,5 x 10⁶ células/mL com o mesmo meio de cultura contendo 2,5% de Soro Bovino Fetal para a realização das culturas de células mononucleares aderentes. Nas placas de cultura de 24 poços foram preparados, no mínimo, 4 poços, para conter tanto as células estimulas como as não-estimuladas, para cada paciente, colocando-se 1,0 ml da suspensão de células mononucleares de sangue periférico, com concentração final de 2,5 x 10⁶ células/mL em cada poço. A suspensão de 2,5 x 10⁶ de células/mL foi colocada na placa de cultura e

incubada durante 2 horas a 37⁰C com 5% de CO₂ para promover a aderência das células mononucleares. Após um período de 2 horas as células não aderentes foram removidas por meio da lavagem dos poços com meio de cultura por três vezes. As células aderentes foram incubadas segundo o protocolo:

- Condição Basal – sem estímulo - No mínimo, quadruplicatas com 1 mL de meio de cultura.
- Condição estimulada - No mínimo, quadruplicatas contendo LPS 5 µg/mL em meio de cultura.

As células foram incubadas a 37°C em ambiente úmido e com CO₂ a 5% por 24 horas, quando então, 500 µl de sobrenadante das culturas tanto basais como com LPS foram coletados em duplicatas e armazenados a -20°C para quantificação de TNF-α, IL-1β, IL-8 e IL-6 por ELISA. Após a remoção dos sobrenadantes, a extração de RNA das células cultivadas em monocamadas foi realizada fazendo-se passar 1 mL de TRIzol[®] Reagent (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville – MD – USA) em, no mínimo de 4 poços cultivados tanto para as células estimuladas como para as não estimuladas, para cada paciente, prosseguindo a extração de acordo com as instruções do fabricante, objetivando a verificação da expressão gênica destas mesmas citocinas.

4.10. Detecção de citocinas TNF-α, IL-1β, IL-8 e IL-6 em sobrenadantes de culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico:

Foi utilizado o sistema de imunoenensaio enzimático (ELISA) (BD Biosciences Pharmigen, San Diego – CA – USA) que, através de sets específicos*, foi capaz de determinar quantitativamente as concentrações das seguintes citocinas em humanos: TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-6. Os sets de imunoenseaios empregaram a técnica quantitativa em formato de sanduíche, utilizando, para tanto, anticorpos de captura purificados; anticorpos biotinizados específicos para cada citocina, como anticorpo de detecção; reagente enzimático (enzima peroxidase conjugada a estreptavidina); os padrões (IL-1β e IL-6 humanas recombinante liofilizados e TNF-α humana recombinante expresso em

baculovírus liofilizado). Para a detecção de IL-8 não foi utilizado um set específico, porém componentes adquiridos separadamente tais como: anticorpo de captura monoclonal purificado de rato anti-IL-8 humana, produzido por Echerichia Coli; anticorpo de detecção monoclonal biotinizado de rato anti-IL-8 humana, produzido por Echerichia Coli.

Sets para as citocinas*	Catalog number*
BD OptEIA set human TNF- α	555212
BD OptEIA set human IL-1 β	558848
IL-8 capture antibody	554716
IL-8 detection antibody	554718
BD OptEIA set human IL-6	555220

Uma placa de microtitulação (Cat# 3590, Costar, Corning – USA) de poliestireno com 96 poços foi utilizada para o procedimento. A enzima peroxidase conjugada a estreptavidina foi adicionada às placas e a cor foi desenvolvida após a adição do substrato O-Phenylenediamine-2HCl (OPD) (Sigma, St Louis – MO – USA), para IL-8, e do substrato Tetramethylbenzidine (TMB), para IL-1 β , IL-6, TNF- α . Após esta fase foi adicionado uma solução stop (50 μ L/poço de 2 N H₂SO₄) e a intensidade da cor foi medida em espectrofotômetro a 490 nm.

4.10.1. Preparo da curva padrão

Partiu-se de soluções estoque de IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-6, que variaram de 20 μ g/mL a 67 ng/mL, as quais foram diluídas para a realização de curvas padrão. Para isto, foram realizadas diluições seriadas produzindo concentrações padrões específicas para cada citocina, de acordo com a sensibilidade máxima de cada imuno-ensaio utilizado: IL-8 (2500 - 39 pg/mL); TNF- α (500 - 7,8 pg/mL); IL-6 (600 - 9,4 pg/mL); IL-1 β (500 - 7,8 pg/mL).

4.10.2. Técnica do ELISA

Foram adicionados 100 μL /poço dos anticorpos de captura, diluídos nas concentrações indicadas pelo fabricante para as respectivas citocinas, em placas de microtitulação. Estas foram, então, vedadas e incubadas overnight a 4°C. Após este período de incubação, as soluções dos anticorpos de captura foram desprezadas, as placas lavadas três vezes com PBS/Tween, e foram adicionados 200 μL de tampão de bloqueio (PBS contendo 10% soro bovino fetal). As placas foram novamente incubadas em temperatura ambiente por 2 horas, sendo, após este período, lavadas por três vezes com PBS/Tween.

As curvas-padrão foram preparadas segundo padronização previamente descrita e adicionadas às placas, em um volume de 100 μL por poço. Nos poços restantes, foram adicionados 100 μL de sobrenadante, referentes às amostras, diluídas, se necessário. Nesta fase, as moléculas das citocinas presentes em cada amostra ligaram-se aos anticorpos imobilizados no fundo da placa. As placas foram novamente vedadas e incubadas overnight a 4°C, sendo, posteriormente, lavadas cinco vezes com PBS/Tween.

Em uma mesma etapa, foram adicionados os anticorpos de detecção biotinizados, preparados conjuntamente com a enzima peroxidase conjugada a estreptavidina (Working detector), em 100 μL /poço, e incubados em temperatura ambiente por 1 hora. Após esta fase, as placas foram lavadas por seis vezes com PBS/Tween.

Foram adicionados 100 μL /poço de substrato para cada citocina, permanecendo as placas incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente para a formação da cor para detecção fotolorimétrica. Após este período, foram adicionados 50 μL /poço de solução Stop, para a realização da leitura da densidade óptica (O.D.) da placa em sistema computadorizado ajustado para 490nm.

4.11. Avaliação da expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 por células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas ou não por LPS

4.11.1. Extração do RNA total

Após 24 horas de incubação, o RNA total foi extraído de no mínimo 4 poços das culturas de células mononucleares aderentes estimuladas ou não por LPS, após a coleta dos sobrenadantes dos mesmos. Esta extração de RNA foi realizada utilizando-se TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad – CA – USA), de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, realizou-se a passagem de 1 mL de Trizol pelos poços das culturas celulares em monocamadas, sendo o conteúdo acondicionado em um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL, permanecendo em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Após isto adicionaram-se 200 μ L de clorofórmio e 10 μ L de glicogênio (20 μ g/ μ L), agitando-se vigorosamente por 15 segundos e incubado-se por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) das amostras foi transferida para outro tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL e a precipitação do RNA realizada com a adição de 500 μ L de isopropanol 100% gelado sob leve homogeneização, seguido de incubação overnight a -70°C.

Posteriormente as amostras foram descongeladas em gelo e centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o isopropanol foi removido e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75% gelado e centrifugados novamente a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a remoção do etanol, o precipitado foi deixado em repouso para secagem e posteriormente re-suspenso em 15 μ L de água estéril tratada previamente com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma, St. Louis – MO – USA). A quantificação do RNA foi realizada pela leitura em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware – USA) em comprimento de onda de 260 nm, considerando que 1 unidade de DO₂₆₀ equivale a 40 μ g/mL de RNA. A integridade das amostras foi também

verificada pela visualização das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S em gel de agarose 1,2% corado com solução de brometo de etídeo 0,5% (figura 7).

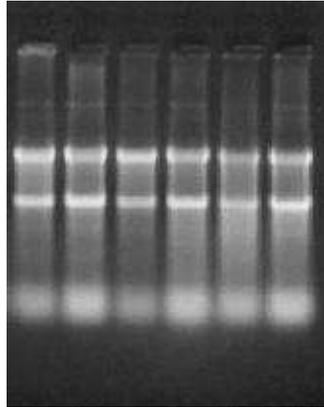


Figura 7 - Aspecto das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S em gel de agarose 1,2% corado com solução de brometo de etídeo 0,5% das amostras de RNA extraídas.

4.11.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) - Reação de transcrição reversa

A reação de transcrição reversa das 100 amostras de RNA de culturas de células mononucleares aderentes crescidas em monocamadas (1 amostra referente à cultura estimulada e outra referente à cultura não estimulada, para os 20 pacientes antes e após a internação hospitalar e para os 10 pacientes do grupo teste após o tratamento periodontal) foi realizada utilizando-se 500 ng de RNA, 1,5 μL 10X Buffer, 2,2 μL MgCl_2 , 2,0 μL de dNTPs 100mM, 0,2 μL RNase Inhibitor, 0,5 μL de Randow primers, 0,25 μL de MultiScribe[®] (TaqMan[®] RT reagents, Applied Biosystems, Branchburg – NJ – USA) e água para um volume final de 15 μL . As reações foram incubadas a 16°C for 30 minutos, 42°C for 30 minutos, 85°C for 5 minutos. Após o término da incubação, as amostras foram diluídas 1:8 em água DEPC e armazenadas a -20°C.

4.11.3. PCR em tempo real (q-PCR)

Após a síntese de cDNA das amostras, o produto foi diluído (1:8) para sua utilização nos ensaios de qPCR, para validação da expressão dos genes responsáveis pela transcrição dos RNAm das respectivas citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α . As reações foram feitas em duplicatas, utilizando placas de 96 poços com 0,62 μ L do produto contido em cada reação TaqMan[®] do ensaio específico para cada gene* e para o controle endógeno**, 6,25 μ L de Master mix, 4,0 μ L de cDNA e 1,6 μ L de água destilada. Todos os ensaios para expressão gênica TaqMan[®] dos genes correspondentes às citocinas específicas estudadas, bem como do controle endógeno foram compradas na Applied Biosystem (Foster City – CA – USA) e obtidas no seu site. As reações foram submetidas a uma temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, seguida de uma desnaturação a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos sucessivos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, em um ciclador ABI7700 (Applied Biosystems). A detecção da fluorescência foi realizada a cada ciclo, sendo que ao final da corrida, obteve-se um gráfico da variação da fluorescência (*Rn*) pelo número de ciclos (*Cycle Number*) (Figura 8).

Citocinas	Part number
IL-1 β *	Hs 00174097_m1
IL-6*	Hs 00174131_m1
IL-8*	Hs 00174103_m1
TNF- α *	Hs 00174128_m1
GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase**)	4333764F

Após a finalização da corrida, as curvas de amplificação foram visualizadas pelo software ABI Prism[®] 7500 que armazena informações experimentais de cada amostra e

analisa os dados de acordo com a fluorescência do sistema. A interpretação dos resultados se inicia pelo estabelecimento da linha de base (*Baseline*) que deve compreender os ciclos iniciais da reação onde a intensidade de sinal ainda não é superior ao ruído. Geralmente, o software estabelece o ciclo 3 como inicial, cabendo o ajuste do fim da linha de base 2 a 3 ciclos antes do início da fase de aumento da intensidade de sinal.

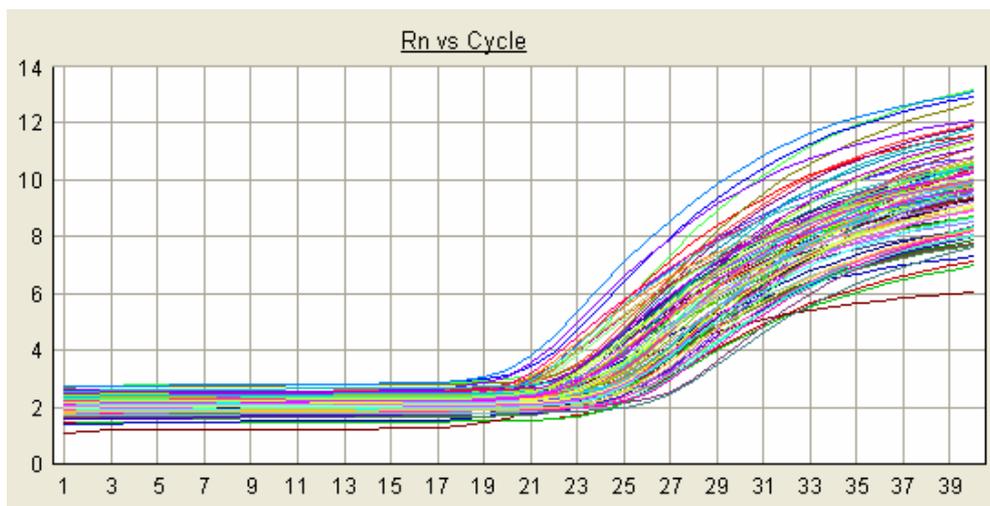


Figura 8 - Curva representativa da amplificação pela reação de qPCR para IL-8 das amostras das culturas de células mononucleares aderentes estimuladas e não-estimuladas.

O próximo passo é o ajuste do limiar de detecção de fluorescência (*Threshold*), que deve ser estabelecido na fase exponencial do gráfico, em escala logarítmica, demonstrativo da curva de amplificação. O *Threshold* deve estar acima do ruído (*Background*) e abaixo da fase de platô das curvas de amplificação. Este limiar serve como ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente, teoricamente correspondente à mesma quantidade de produto de PCR. A identificação do *Threshold* determina o estabelecimento do *cycle threshold* (Ct) que é o ciclo em que cada curva (representativa de cada amostra) de amplificação atravessa o limiar, servindo como base para comparação entre amostras.

O estabelecimento dos parâmetros *Baseline* e *Threshold* foi obtido pelo software ABI Prism 7500, utilizando a planilha de análise *Relative Quantification (ddCt) Plate* (Figura 9). Após o estabelecimento do Ct de cada amostra, os dados foram

exportados em tabelas compatíveis com o software Excel, contendo valores médios dos Cts de cada amostra e respectivos desvios padrão.

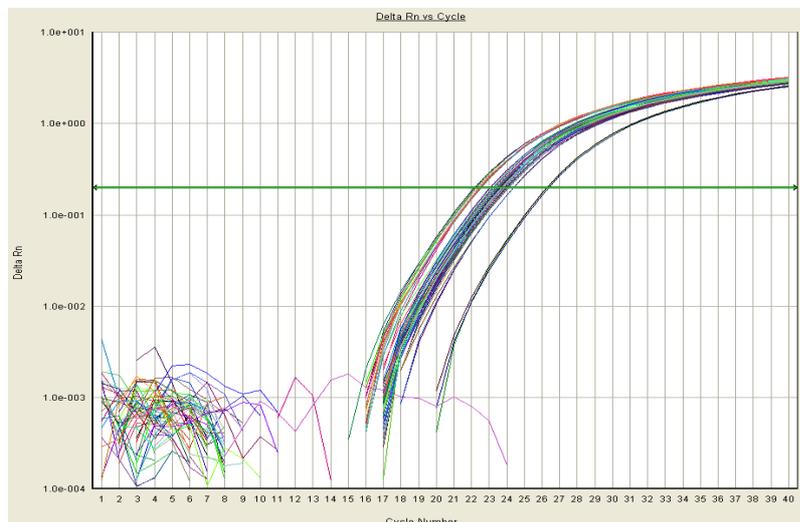


Figura 9 - Curva representativa da amplificação pela reação de qPCR para IL-8 das amostras das culturas de células mononucleares aderentes estimuladas e não-estimuladas após análise pela planilha *Relative Quantification (ddCt) Plate*.

A normalização dos resultados de cada amostra foi realizada pela subtração do Ct para o gene candidato (alvo) pelo Ct do controle endógeno (*GAPDH*), utilizado nos experimentos. Este cálculo é conhecido como ΔCt :

$$\Delta Ct = Ct \text{ amostra (alvo)} - Ct \text{ amostra (controle endógeno)}$$

Os resultados normalizados (ΔCt) foram, posteriormente, submetidos à etapa de calibração, onde se escolhe o ΔCt de uma amostra, ou a mediana do ΔCt de várias amostras de um grupo no experimento, para servir como amostra calibradora. Nesta pesquisa, como foram realizadas várias comparações tanto entre células em condições específicas (estimuladas e não estimuladas) como também pertencentes a grupos distintos (teste e controle) e em diferentes tempos do estudo, a amostra calibradora dependeu de que

comparação foi feita e entre quais grupos de amostras. Com isso, temos a realização do cálculo para obtenção do $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(amostra)} - \Delta Ct_{(calibrador)} \text{ (mediana dos } \Delta Ct \text{ das amostras pertencentes ao grupo calibrador)}$$

Com a obtenção do valor de $\Delta\Delta Ct$, a comparação da expressão relativa de determinado gene nas amostras foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001). A mediana do valor obtido de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras de um determinado grupo foi comparado com o valor da mediana dos valores obtidos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras de outro grupo, obtendo o valor que revela o número de vezes (*fold*) que este gene candidato em uma condição específica está hiper ou hipotranscrito em relação a uma outra condição específica.

4.12. Análise Estatística

Em relação à caracterização clínica da amostra, para as comparações entre os grupos das variáveis idade e duração do diabetes foi utilizado o modelo estatístico ANOVA. Já para a análise estatística das variáveis gênero, uso ou não de insulina e presença ou não de antecedentes familiares para o diabetes, entre os grupos, foi utilizado o teste exato de Fisher. Os parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados ao controle metabólico, bem como os valores obtidos por meio das provas inflamatórias foram comparados estatisticamente em relação aos tempos e aos grupos através do modelo linear de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Este modelo é utilizado na análise de dados onde as respostas de um mesmo indivíduo estão agrupadas e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada. Neste modelo, foram considerados como efeito aleatório os indivíduos e, como efeitos fixos, o grupo, o tempo e a interação entre os mesmos. A análise descritiva das variáveis em relação à caracterização clínica da amostra foi feita através das médias e desvios padrões.

Em relação à caracterização periodontal da amostra, para a comparação dos dados referentes à profundidade de sondagem e o nível de inserção relativo entre os grupos e tempos, foi utilizado o modelo linear de efeitos mistos. A análise descritiva se deu, utilizando-se as médias e desvios padrões. Além disso, para comparar os grupos e os

tempos em relação às variáveis porcentagem de sítios com placa, porcentagem de sítios com sangramento à sondagem, porcentagem de sítios com profundidade de sondagem ≥ 5 mm, bem como porcentagem de sítios com nível de inserção clínico ≥ 5 mm, foi utilizado um modelo linear de efeitos mistos, porém tendo sido feito ajustes através da análise Bayesiana. Esta consiste na obtenção de medidas resumos ou distribuições *a posteriori* para os parâmetros de interesse. Estas medidas ou distribuições foram obtidas combinando informações *a priori* sobre os parâmetros de interesse (distribuição *a priori*) e informações contidas na amostra (função de verossimilhança). Para satisfazer alguns pressupostos do modelo foi necessário aplicar o logaritmo nas variáveis respostas, por isso a estimativa média e os intervalos de credibilidade estão em logaritmo, não havendo *p*-valor para esta análise. Assim, verificou-se se o valor de 0 estava contido nos intervalos. Caso não estivesse, houve indícios de diferença entre o que estava sendo comparado. Para a obtenção de amostras da distribuição *a posteriori* conjunta dos parâmetros de interesse, foram utilizados métodos de simulação de Monte Carlo em Cadeias de Markov. Para isso, foram geradas amostras das distribuições condicionais, utilizando o algoritmo *Gibbs Sampling* ou o algoritmo de *Metropolis-Hastings* quando essas distribuições condicionais não são conhecidas. Foi utilizado um “burn-in” de 5000, e foram geradas 50000 amostras da distribuição *a posteriori* conjunta. Com base nessas amostras foram obtidos os sumários *a posteriori*. As análises foram feitas utilizando o software WinBugs.

Para a análise dos resultados obtidos da quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico, através do ELISA, comparando-os entre os grupos, tempos e tipos celulares (células estimuladas e não estimuladas por LPS), foi utilizado o modelo linear de efeitos mistos. Já a análise descritiva dos valores referentes às quantificações das citocinas nos sobrenadantes foi realizada através das médias e erros padrões.

A análise estatística da quantificação relativa da expressão gênica referente às citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico, foi realizada através do modelo linear de efeitos mistos, comparando-se os valores de ΔCt e de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras de RNA extraídas destas culturas celulares

estimuladas ou não por LPS, obtidas em todos os tempos observacionais do estudo e de ambos os grupos, para cada gene alvo. A análise descritiva, por sua vez, foi feita através das médias e desvios padrões.

Todas as análises estatísticas, com exceção daquelas já descritas para algumas variáveis clínicas periodontais, foram realizadas através do software SAS versão 9.0, fixando-se o nível de significância de 5%. Para a utilização do modelo linear de efeitos mistos, existem algumas pressuposições que devem ser respeitadas, como o resíduo do modelo, ou seja, a diferença do observado da amostra e do estimado pelo modelo tenha distribuição normal com média zero e variância constante. Quando este pressuposto não foi atendido, transformação na variável resposta foi utilizada, de modo que o ajuste do modelo foi realizado através do procedimento PROC MIXED do software SAS versão 9.0.

5. Resultados

5.1. Caracterização clínica da amostra

As características demográficas bem como aquelas relacionadas ao diabetes dos indivíduos participantes deste estudo estão apresentadas na tabela 1. O grupo teste foi comparável ao grupo controle em relação a idade ($p=0,09$), gênero ($p=1,00$) e duração do diabetes ($p=0,93$). A idade dos indivíduos foi de em média $42,9 \pm 11,09$ no grupo controle e de $51 \pm 9,32$ anos, no grupo teste, enquanto que a amostra foi composta em ambos os grupos de 3 pacientes do gênero masculino (30%) e 7 do gênero feminino (70%). A duração do diabetes foi de cerca de $6,63 \pm 5,09$ anos no grupo controle em comparação à média de $6,8 \pm 2,97$ anos no grupo teste. Todos os pacientes do grupo controle apresentavam antecedentes pessoais positivos para o diabetes ($N=10/10$), enquanto apenas 70% ($N=7/10$) dos pacientes do grupo teste demonstravam a mesma relação. Cerca de 80% ($N=8/10$) da amostra de ambos os grupos faziam uso de insulina, verificando-se, entretanto, uma maior utilização de insulina NPH ($57,63 \pm 29,82$ UI) e insulina Regular ($6,50 \pm 7,55$ UI) no grupo teste do que no grupo controle, respectivamente $53,25 \pm 33,86$ UI e $1,0 \pm 2,0$ UI, porém sem diferença significativa. Em ambos os grupos todos os pacientes utilizavam antidiabéticos sensibilizadores ($N=20/20$), como a metformina, sendo que a quantidade total utilizada era maior no grupo teste ($2005 \pm 889,90$ mg) do que no grupo controle ($1.635 \pm 826,66$ mg), antes da internação, entretanto também sem diferença significativa.

Nenhum paciente apresentava complicações crônicas micro ou macrovasculares em graus moderados ou graves, conforme apresentado nos apêndices 1 e 2.

TABELA 1 - Média, desvio padrão, intervalo de confiança (IC) e valores de *p* para as comparações entre os grupos controle e teste em relação às características demográficas e relacionadas ao diabetes da amostra selecionada.

Variável	N	Grupo controle Média ± DP	N	Grupo teste Média ± DP	IC	<i>p</i>
Idade (anos)	10	42,9 ± 11,09	10	51 ± 9,32	-17,72 / 1,52	0,09
Gênero	10	F 7 (70%) M 3 (30%)	10	F 7 (70%) M 3 (30%)		1,00
ΔT Diabetes (anos)	10	6,63 ± 5,09	10	6,8 ± 2,97	-4,09 / 3,75	0,93
Antecedentes familiares	10	Sim 10 (100%) Não 0 (0%)	10	Sim 7 (70%) Não 3 (30%)		1,00
Insulinoterapia	10	Sim 8 (80%) Não 2 (20%)	10	Sim 8 (80%) Não 2 (20%)		1,00
Insulina NPH (UI/dia)	8	53,25± 33,86	8	57,63 ± 29,82	-39,09 / 30,34	0,79
Insulina Regular (UI/dia)	4	1,0 ± 2,0	4	6,50 ± 7,55	-5,50 / - 15,26	0,22
Metformina (mg/dia)	10	1.635 ± 826,66	10	2005± 889,90	-1081,73 / 341,73	0,29

Analisando-se os parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados ao controle metabólico, antes da internação hospitalar, os grupos controle e teste não apresentaram diferenças significativas em relação à glicemia em jejum, peso, IMC, HbA1c, colesterol total, LDL (tabela 2). Entretanto, a glicemia em jejum apresentou-se discretamente elevada no grupo teste (249,50±117,15) em relação ao controle (222,20±120,78), o contrário sendo

demonstrado com o colesterol total (teste: $176,5 \pm 31,63$ / controle: $204,10 \pm 64,06$), porém sem significância estatística. Ao mesmo tempo, no grupo controle, o IMC ($31,41 \pm 3,76$) caracterizou os pacientes como portadores de obesidade grau I ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$), ao passo que no grupo teste (IMC: $29,92 \pm 7,51$), o mesmo caracterizou-os como portadores de sobrepeso ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $< 30 \text{ kg/m}^2$). Além disso, verificaram-se significativamente maiores níveis de triglicérides ($494,60 \pm 487,01$) e menores níveis do HDL ($38,3 \pm 6,09$) no grupo controle em relação ao grupo teste (Triglicérides: $141,80 \pm 119,69$ / HDL: $51 \pm 18,28$), evidenciando-se a presença de dislipidemia no grupo controle (valores normais de referência para o método empregado: Colesterol total - $< 200 \text{ mg/dL}$ / Triglicérides - $< 150 \text{ mg/dL}$ / LDL - $< 130 \text{ mg/dL}$ / HDL - $> 35 \text{ mg/dL}$) (tabela 2). Os níveis elevados de triglicérides impossibilitaram o cálculo do LDL colesterol pela fórmula de Friedewald em 4 e 1 indivíduos dos grupos controle e teste respectivamente. Tanto as médias das glicemias em jejum (valor referente a um adequado controle metabólico em pacientes diabéticos: 70 a 130 mg/dL – American Diabetes Association, 2009), como das HbA1c (valor normal de referência do método empregado: 4.3% a 6.1%) de ambos os grupos evidenciaram o estado de descompensação glicêmica em que se encontravam os pacientes, antes da internação hospitalar. Em relação às provas inflamatórias, não houve diferença significativa entre os grupos para proteína-C-reativa e α -ácido glicoproteína, que se apresentaram dentro dos níveis de normalidade para os métodos empregados (PCR até $0,5 \text{ mg/dL}$ e α -AG: 50-120 $\mu\text{g/dL}$). Entretanto, apesar de também não ter havido diferenças significativas entre os grupos para o VHS, este se apresentou elevado em ambos os grupos (controle: $25 \pm 16,91$ teste: $26,5 \pm 8,24$) (valor de normalidade para o método empregado até $8 \text{ mm/primeira hora}$, para homens e até $10 \text{ mm/primeira hora}$ para mulheres) (tabela 2).

TABELA 2 - Média, desvio padrão, intervalo de confiança e valores de *p* para as características clínicas e laboratoriais relacionadas ao controle metabólico bem como às provas inflamatórias, comparando-se o grupo teste e controle, antes da internação hospitalar.

Variável	Tempo	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança	<i>p</i>																																																																																																																				
Glicemia em Jejum	0	Controle	10	222,20	120,78	-102,30 / 47,70	0,46																																																																																																																				
		Teste	10	249,50	117,15			Peso	0	Controle	10	82,05	16,20	-16,44 / 21,78	0,78	Teste	10	79,38	25,39	IMC	0	Controle	10	31,41	3,76	-3,74 / 6,71	0,56	Teste	10	29,92	7,51	HbA1c	0	Controle	10	10,87	3,0	-1,85 / 2,71	0,70	Teste	10	10,44	2,68	Col	0	Controle	10	204,10	64,03	-16,77 / 71,97	0,21	Teste	10	176,5	31,63	Triglicérides	0	Controle	10	494,60	487,01	133,17 / 572,43	<0,01*	Teste	10	141,80	119,69	HDL	0	Controle	10	38,3	6,09	-23,64 / - 1,76	0,02*	Teste	10	51,0	18,28	LDL	0	Controle	6	115,50	49,30	-34,56 / 38,99	0,90	Teste	9	100,33	26,59	VHS	0	Controle	10	25,00	16,91	-14,01 / 11,01	0,81	Teste	10	26,50	8,24	PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70	Teste	10	0,53	0,48	αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10
Peso	0	Controle	10	82,05	16,20	-16,44 / 21,78	0,78																																																																																																																				
		Teste	10	79,38	25,39			IMC	0	Controle	10	31,41	3,76	-3,74 / 6,71	0,56	Teste	10	29,92	7,51	HbA1c	0	Controle	10	10,87	3,0	-1,85 / 2,71	0,70	Teste	10	10,44	2,68	Col	0	Controle	10	204,10	64,03	-16,77 / 71,97	0,21	Teste	10	176,5	31,63	Triglicérides	0	Controle	10	494,60	487,01	133,17 / 572,43	<0,01*	Teste	10	141,80	119,69	HDL	0	Controle	10	38,3	6,09	-23,64 / - 1,76	0,02*	Teste	10	51,0	18,28	LDL	0	Controle	6	115,50	49,30	-34,56 / 38,99	0,90	Teste	9	100,33	26,59	VHS	0	Controle	10	25,00	16,91	-14,01 / 11,01	0,81	Teste	10	26,50	8,24	PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70	Teste	10	0,53	0,48	αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10	Teste	10	69,50	23,25								
IMC	0	Controle	10	31,41	3,76	-3,74 / 6,71	0,56																																																																																																																				
		Teste	10	29,92	7,51			HbA1c	0	Controle	10	10,87	3,0	-1,85 / 2,71	0,70	Teste	10	10,44	2,68	Col	0	Controle	10	204,10	64,03	-16,77 / 71,97	0,21	Teste	10	176,5	31,63	Triglicérides	0	Controle	10	494,60	487,01	133,17 / 572,43	<0,01*	Teste	10	141,80	119,69	HDL	0	Controle	10	38,3	6,09	-23,64 / - 1,76	0,02*	Teste	10	51,0	18,28	LDL	0	Controle	6	115,50	49,30	-34,56 / 38,99	0,90	Teste	9	100,33	26,59	VHS	0	Controle	10	25,00	16,91	-14,01 / 11,01	0,81	Teste	10	26,50	8,24	PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70	Teste	10	0,53	0,48	αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10	Teste	10	69,50	23,25																				
HbA1c	0	Controle	10	10,87	3,0	-1,85 / 2,71	0,70																																																																																																																				
		Teste	10	10,44	2,68			Col	0	Controle	10	204,10	64,03	-16,77 / 71,97	0,21	Teste	10	176,5	31,63	Triglicérides	0	Controle	10	494,60	487,01	133,17 / 572,43	<0,01*	Teste	10	141,80	119,69	HDL	0	Controle	10	38,3	6,09	-23,64 / - 1,76	0,02*	Teste	10	51,0	18,28	LDL	0	Controle	6	115,50	49,30	-34,56 / 38,99	0,90	Teste	9	100,33	26,59	VHS	0	Controle	10	25,00	16,91	-14,01 / 11,01	0,81	Teste	10	26,50	8,24	PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70	Teste	10	0,53	0,48	αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10	Teste	10	69,50	23,25																																
Col	0	Controle	10	204,10	64,03	-16,77 / 71,97	0,21																																																																																																																				
		Teste	10	176,5	31,63			Triglicérides	0	Controle	10	494,60	487,01	133,17 / 572,43	<0,01*	Teste	10	141,80	119,69	HDL	0	Controle	10	38,3	6,09	-23,64 / - 1,76	0,02*	Teste	10	51,0	18,28	LDL	0	Controle	6	115,50	49,30	-34,56 / 38,99	0,90	Teste	9	100,33	26,59	VHS	0	Controle	10	25,00	16,91	-14,01 / 11,01	0,81	Teste	10	26,50	8,24	PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70	Teste	10	0,53	0,48	αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10	Teste	10	69,50	23,25																																												
Triglicérides	0	Controle	10	494,60	487,01	133,17 / 572,43	<0,01*																																																																																																																				
		Teste	10	141,80	119,69			HDL	0	Controle	10	38,3	6,09	-23,64 / - 1,76	0,02*	Teste	10	51,0	18,28	LDL	0	Controle	6	115,50	49,30	-34,56 / 38,99	0,90	Teste	9	100,33	26,59	VHS	0	Controle	10	25,00	16,91	-14,01 / 11,01	0,81	Teste	10	26,50	8,24	PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70	Teste	10	0,53	0,48	αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10	Teste	10	69,50	23,25																																																								
HDL	0	Controle	10	38,3	6,09	-23,64 / - 1,76	0,02*																																																																																																																				
		Teste	10	51,0	18,28			LDL	0	Controle	6	115,50	49,30	-34,56 / 38,99	0,90	Teste	9	100,33	26,59	VHS	0	Controle	10	25,00	16,91	-14,01 / 11,01	0,81	Teste	10	26,50	8,24	PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70	Teste	10	0,53	0,48	αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10	Teste	10	69,50	23,25																																																																				
LDL	0	Controle	6	115,50	49,30	-34,56 / 38,99	0,90																																																																																																																				
		Teste	9	100,33	26,59			VHS	0	Controle	10	25,00	16,91	-14,01 / 11,01	0,81	Teste	10	26,50	8,24	PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70	Teste	10	0,53	0,48	αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10	Teste	10	69,50	23,25																																																																																
VHS	0	Controle	10	25,00	16,91	-14,01 / 11,01	0,81																																																																																																																				
		Teste	10	26,50	8,24			PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70	Teste	10	0,53	0,48	αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10	Teste	10	69,50	23,25																																																																																												
PCR	0	Controle	10	0,46	0,3	-0,43 / 0,29	0,70																																																																																																																				
		Teste	10	0,53	0,48			αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10	Teste	10	69,50	23,25																																																																																																								
αAG	0	Controle	10	84,60	14,94	-3,05 / 33,25	0,10																																																																																																																				
		Teste	10	69,50	23,25																																																																																																																						

Glicemia em jejum (mg/dL); Peso (kg); IMC: índice de massa corpórea (kg/m²); HbA1c (%); COL: colesterol total (mg/dL); TG: triglicérides (mg/dL); HDL: lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL: lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); VHS: velocidade de hemossedimentação (mm/primeira hora); PCR: proteína C reativa (mg/dL); αAG: α-ácido glicoproteína (μg/dL). *Estatisticamente significativo.

Após a internação hospitalar, comparando-se os grupos teste e controle em relação aos mesmos parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados ao controle metabólico, avaliados anteriormente, não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à glicemia em jejum, peso, IMC, HbA1c, colesterol total, triglicérides, LDL (tabela 3). Entretanto, os níveis de HDL continuaram significativamente mais elevados no grupo teste (44,40±11,95) em relação ao grupo controle (33,50±7,04; *p*=0,05), indicando que, apesar dos níveis de colesterol total (180,40±60), triglicérides (239,40±93,32) e LDL

(98,90±50,35) terem diminuído, os pacientes do grupo controle permaneceram dislipidêmicos, às custas de uma elevação de triglicérides e uma diminuição do HDL, alteração comumente encontrada em pacientes diabéticos tipo 2 obesos. Em relação às provas inflamatórias, não houve diferença significativa entre os grupos para proteína-C-reativa e α -ácido glicoproteína, que se apresentaram dentro dos níveis de normalidade para os métodos empregados após a internação. Entretanto, apesar de também não ter havido diferenças significativas entre os grupos para o VHS, este se apresentou elevado em ambos os grupos (controle: 26,40±15,24 teste: 29,80±9,78) em relação ao valor de normalidade para o método empregado (tabela 3).

TABELA 3 - Média, desvio padrão, intervalo de confiança e valores de *p* para as características clínicas e laboratoriais relacionadas ao controle metabólico bem como às provas inflamatórias, comparando-se o grupo teste e controle, após da internação hospitalar.

Variável	Tempo	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança	<i>p</i>
Glicemia em Jejum	1	Controle	10	101,40	21,89	-86,40 / 63,60	0,76
		Teste	10	112,80	48,16		
Peso	1	Controle	10	80,39	14,79	-16,63 / 21,59	0,79
		Teste	10	77,91	24,16		
IMC	1	Controle	10	30,38	2,76	-4,27 / 6,18	0,71
		Teste	10	29,43	7,01		
HbA1c	1	Controle	10	9,91	2,15	-1,75 / 2,81	0,64
		Teste	10	9,38	2,34		
Col	1	Controle	10	180,40	60,0	-18,97 / 69,77	0,25
		Teste	10	155,00	31,24		
Triglicérides	1	Controle	10	239,40	93,32	-107,53 / 331,73	0,30
		Teste	10	127,30	86,01		
HDL	1	Controle	10	33,50	7,04	-21,84 / 0,04	0,05*
		Teste	10	44,40	11,95		
LDL	1	Controle	10	98,90	50,35	-20,32 / 48,12	0,41
		Teste	10	85,00	20,80		
VHS	1	Controle	10	26,40	15,24	-15,91 / 9,11	0,58
		Teste	10	29,80	9,78		
PCR	1	Controle	9	0,40	0,47	-0,42 / 0,31	0,77
		Teste	10	0,43	0,39		
α AG	1	Controle	8	81,00	17,52	-10,95 / 26,76	0,40
		Teste	10	73,70	20,76		

Glicemia em jejum (mg/dL); Peso (kg); IMC: índice de massa corpórea (kg/m^2); HbA1c (%); COL: colesterol total (mg/dL); TG: triglicérides (mg/dL); HDL: lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL: lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); VHS: velocidade de hemossedimentação (mm/primeira hora); PCR: proteína C reativa (mg/dL); α AG: α -ácido glicoproteína ($\mu\text{g/dL}$). *Estatisticamente significativo.

Durante o período de internação foi realizado controle metabólico intensivo com dosagem de glicemia capilar em horários fixos (7, 11, 17 e 23 horas), e correção com insulina regular, em cada um desses horários, sempre que a glicemia capilar estivesse acima de 150 mg/dL. Assim, o controle metabólico dos dois grupos de diabéticos foi avaliado pela média glicêmica diária durante este período. Comparando-se as médias glicêmicas diárias iniciais (do primeiro dia de internação) (controle: $233,87 \pm 71,01$; teste: $209,88 \pm 62,97$) com as finais (do último dia de internação) (controle: $128,28 \pm 30,67$; teste: $128,41 \pm 25,54$), de ambos os grupos ($p < 0,01$), verificou-se que o tratamento intensivo promoveu redução significativa nestas médias glicêmicas, indicando uma eficiência do controle metabólico. Porém, não houve diferença significativa entre as médias glicêmicas iniciais e aquelas finais, comparando-se os grupos controle e teste, antes e após a internação (tabela 4).

TABELA 4 - Média, desvio padrão, intervalo de confiança e valores de p para as comparações intragrupo como intergrupo das médias glicêmicas iniciais e finais obtidas durante a internação.

Variável	Grupo	Tempo	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança	p
Média glicêmica	Controle	0	10	233,87	71,01	68,96 / 142,21	<0,01*
		1	10	128,28	30,67		
Média glicêmica	Teste	0	10	209,88	62,97	44,84 / 118,09	<0,01*
		1	10	128,41	25,54		
Média glicêmica	Controle	0	10	233,87	71,01	-24,38 / 72,36	0,31
	Teste	0	10	209,88	62,97		
Média glicêmica	Controle	1	10	128,28	30,67	-48,50 / 48,24	1,00
	Teste	1	10	128,41	25,54		

Média glicêmica (mg/dL). *Estatisticamente significativo.

Em relação ao efeito do controle metabólico sobre as variáveis clínicas e laboratoriais analisadas, tanto no grupo controle como no grupo teste houve uma diminuição significativa da glicemia em jejum (controle: $222,20 \pm 120,78$ / $101,40 \pm 21,89$;

teste: $249,50 \pm 117,15$ / $112,80 \pm 48,16$; $p < 0,01$) e da HbA1c (controle: $10,87 \pm 3$ / $9,91 \pm 2,15$, $p = 0,04$; teste: $10,44 \pm 2,68$ / $9,38 \pm 2,34$, $p = 0,03$) indicando, em associação com a diminuição das médias glicêmicas iniciais e finais das internações, a obtenção de um controle glicêmico eficiente (tabelas 5 e 6) (figuras 10, 11 e 12). No grupo controle, houve ainda reduções significativas do IMC ($31,41 \pm 3,76$ / $30,38 \pm 2,76$; $p = 0,03$), colesterol total ($204,10 \pm 64,03$ / $180,40 \pm 60$; $p = 0,03$) e triglicérides ($494,60 \pm 87,01$ / $239,40 \pm 93,32$; $p < 0,01$) e uma tendência de diminuição do HDL, enquanto que no grupo teste houve uma tendência de redução do colesterol total, além de reduções significativas do HDL ($51 \pm 618,28$ / $44,40 \pm 11,95$; $p = 0,01$) e LDL ($100,33 \pm 26,59$ / $85 \pm 20,8$ $p = 0,02$) (tabelas 5 e 6). Estas reduções nos parâmetros laboratoriais lipídicos de ambos os grupos demonstraram a eficiência do controle metabólico alcançado não só ao nível do metabolismo glicêmico, mas do metabolismo lipídico. Em relação às provas inflamatórias, o controle metabólico não influenciou os níveis de PCR, α -ácido glicoproteína e VHS em ambos os grupos, apesar desta última prova continuar apresentando níveis elevados em ambos os grupos, após a internação (controle: $26,40 \pm 15,24$ teste: $29,80 \pm 9,78$) em relação ao valor de normalidade para o método empregado (tabelas 5 e 6).

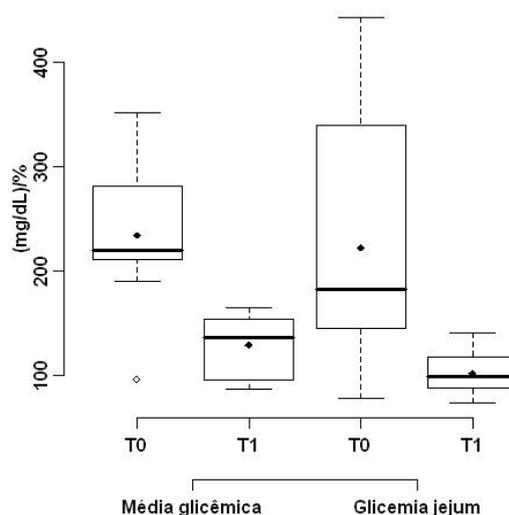


Figura 10 - Comparações entre os valores das médias glicêmicas e glicemia em jejum tidos antes (T0) e após (T1) do controle metabólico, no grupo controle. (MG: $p < 0,01$; GJ: $p < 0,01$).

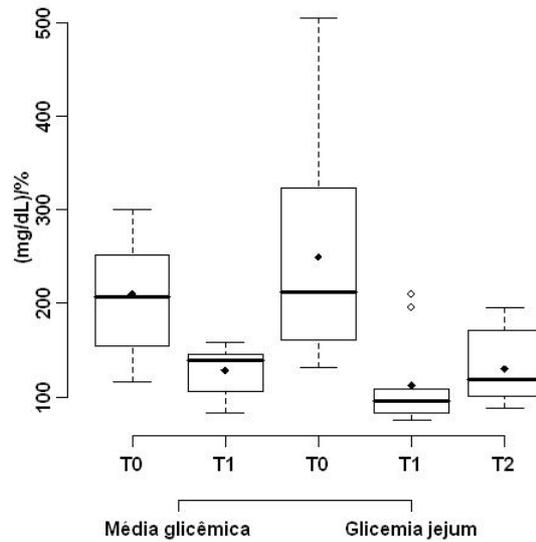


Figura 11 - Comparações entre os valores das médias glicêmicas e glicemia em jejum obtidos antes da internação hospitalar (T0), após o controle metabólico (T1) e 3 a 6 semanas após tratamento periodontal (T2), no grupo teste. (MG: $p < 0,01$); (GJ T0 / T1: $p < 0,01$; GJ T0 / T2: $p < 0,01$; GJ T1 / T2: $p = 0,65$).

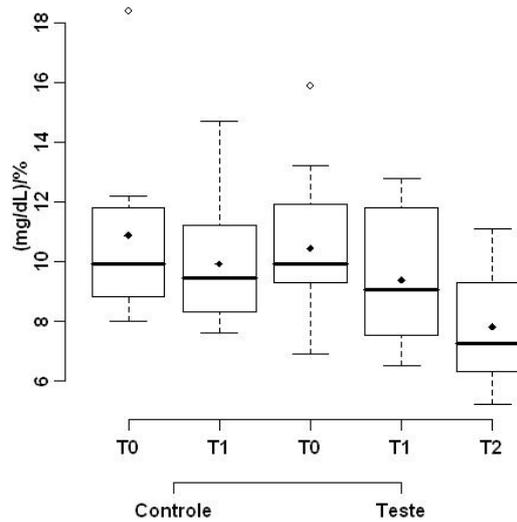


Figura 12 - Comparações entre os valores da HbA1c obtidos antes da internação hospitalar (T0) e após o controle metabólico (T1) nos grupos controle e teste, e 3 a 6 semanas após tratamento periodontal (T2) no grupo teste. (Grupo controle - HbA1c: T0 / T1: $p = 0,04$) / (Grupo teste - HbA1c: T0 / T1: $p = 0,03$; GJ T0 / T2: $p < 0,01$; GJ T1 / T2: $p < 0,01$).

TABELA 5 - Média, desvio padrão, intervalo de confiança e valores de *p* para o efeito do controle metabólico sobre as características clínicas e laboratoriais relacionadas ao controle metabólico bem como às provas inflamatórias, no grupo controle.

Variável	Grupo	Tempo	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança	<i>p</i>
Glicemia em Jejum	Controle	0	10	222,20	120,78	51,36 / 190,24	<0,01*
		1	10	101,40	21,89		
Peso	Controle	0	10	82,05	16,20	-0,64 / 3,96	0,15
		1	10	80,39	14,79		
IMC	Controle	0	10	31,41	3,76	0,08 / 1,97	0,03*
		1	10	30,38	2,76		
HbA1c	Controle	0	10	10,87	3,00	0,04 / 1,88	0,04*
		1	10	9,91	2,15		
Col	Controle	0	10	204,10	64,03	1,81 / 45,59	0,03*
		1	10	180,40	60,0		
Triglicérides	Controle	0	10	494,60	487,01	89,35 / 421,05	<0,01*
		1	10	239,40	93,32		
HDL	Controle	0	10	38,3	6,09	-0,40 / 10,00	0,07
		1	10	33,50	7,04		
LDL	Controle	0	6	115,50	49,3	-13,19 / 28,29	0,46
		1	10	98,90	50,35		
VHS	Controle	0	10	25	16,91	-6,50 / 3,70	0,58
		1	10	26,40	15,24		
PCR	Controle	0	10	0,46	0,30	-0,15 / 0,32	0,48
		1	9	0,40	0,47		
αAG	Controle	0	10	84,60	14,94	-9,37 / 15,37	0,62
		1	8	81,00	17,5		

Glicemia em jejum (mg/dL); Peso (kg); IMC: índice de massa corpórea (kg/m²); HbA1c (%); COL: colesterol total (mg/dL); TG: triglicérides (mg/dL); HDL: lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL: lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); VHS: velocidade de hemossedimentação (mm/primeira hora); PCR: proteína C reativa (mg/dL); αAG: α-ácido glicoproteína (μg/dL). *Estatisticamente significativo.

Tabela 6 - Média, desvio padrão, intervalo de confiança e valores de *p* para o efeito do controle metabólico sobre as características clínicas e laboratoriais relacionadas ao controle metabólico bem como às provas inflamatórias, no grupo teste.

Variável	Grupo	Tempo	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança	<i>p</i>
Glicemia em Jejum	Teste	0	10	249,50	117,15	67,26 /	<0,01*
		1	10	112,80	48,16	206,14	
Peso	Teste	0	10	79,38	25,39	-0,83 / 3,77	0,20
		1	10	77,91	24,16		
IMC	Teste	0	10	29,92	7,51	-0,50 / 1,49	0,32
		1	10	29,43	7,01		
HbA1c	Teste	0	10	10,44	2,68	0,09 / 2,03	0,03*
		1	10	9,38	2,34		
Col	Teste	0	10	176,50	31,63	-0,39 /	0,06
		1	10	155,00	31,24	43,39	
Triglicérides	Teste	0	10	141,80	119,69	-160,62 /	0,87
		1	10	127,30	86,01	189,62	
HDL	Teste	0	10	51,00	18,28	1,40 / 11,80	0,01*
		1	10	44,40	11,95		
LDL	Teste	0	9	100,33	26,5	3,24 / 35,27	0,02*
		1	10	85,00	20,80		
VHS	Teste	0	10	26,50	8,24	-8,40/ 1,80	0,19
		1	10	29,80	9,78		
PCR	Teste	0	10	0,53	0,48	-0,13 / 0,32	0,37
		1	10	0,43	0,39		
αAG	Teste	0	10	69,50	23,25	-15,49 /	0,45
		1	10	73,70	20,76	7,09	

Glicemia em jejum (mg/dL); Peso (kg); IMC: índice de massa corpórea (kg/m^2); HbA1c (%); COL: colesterol total (mg/dL); TG: triglicérides (mg/dL); HDL: lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL: lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); VHS: velocidade de hemossedimentação (mm/primeira hora); PCR: proteína C reativa (mg/dL); αAG: α-ácido glicoproteína ($\mu\text{g/dL}$). *Estatisticamente significativo.

Somando-se o efeito do tratamento periodontal ao do controle metabólico sobre as variáveis clínicas e laboratoriais analisadas e, dessa forma, comparando-se os valores obtidos antes do controle metabólico (Tempo 0) com aqueles obtidos 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal (Tempo 2), no grupo teste, verificaram-se reduções significativas na glicemia em jejum ($249,50 \pm 117,15 / 129,73 \pm 39,57$; $p < 0,01$) e na HbA1c ($10,44 \pm 2,68 / 7,81$; $p < 0,01$), os quais alcançaram limiares mais recomendáveis para a manutenção de um adequado controle glicêmico em indivíduos diabéticos (glicemia em jejum de 70 a 130

mg/dL / HbA1c < 7,0%; American Diabetes Association, 2009) (tabela 7) (figura 11, 12). Não foram verificadas, porém, diferenças significativas nas demais variáveis, tais como, peso, IMC, colesterol total, triglicérides, HDL e LDL (tabela 7). Em relação à dosagem dos níveis das proteínas inflamatórias, apesar destes terem se mantido dentro dos níveis de normalidade para os métodos empregados, verificou-se uma diminuição significativa nos níveis de PCR ($0,53\pm 0,48$ / $0,33\pm 0,23$; $p=0,03$), através da ação conjunta do controle metabólico e do tratamento periodontal, o mesmo não sendo evidenciado para α -ácido glicoproteína e VHS (tabela 7).

Observando-se apenas o efeito do tratamento periodontal sobre as variáveis analisadas, no grupo teste, comparando-se os resultados obtidos após a internação (Tempo 1) com aqueles obtidos 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal (Tempo 2), verificou-se uma redução significativa na HbA1c ($9,38\pm 2,34$ / $7,81\pm 1,99$; $p<0,01$), o mesmo não sendo observado na glicemia em jejum ($112,80\pm 48,16$ / $129,73\pm 39,57$; $p=0,65$), porém esta última ainda se mantendo dentro dos valores para a manutenção de um controle glicêmico adequado (tabela 8) (figura 11, 12). Ao mesmo tempo, houve uma tendência de aumento no colesterol total e aumentos significativos no HDL ($44,40\pm 11,95$ / $52,11\pm 15,12$; $p=0,01$) e LDL ($85\pm 20,80$ / $104,56\pm 26,25$; $p=0,02$) (tabela 8). Apesar das alterações lipêmicas verificadas, observou-se que estes parâmetros mantiveram-se dentro dos valores considerados adequados para a manutenção de um bom controle metabólico em pacientes diabéticos (colesterol total: < 200 mg/dL; triglicérides: <150 mg/dL; HDL: > 40mg/dL; LDL: <100 mg/dL; American Diabetes Association, 2009). Em relação às provas inflamatórias, o tratamento periodontal diminuiu discretamente os níveis de PCR, porém não influenciou os níveis de α -ácido glicoproteína, permanecendo ambos dentro dos níveis de normalidade para os métodos empregados. Apesar de também não ter havido diferenças significativas para o VHS, este se manteve elevado, comparando-se os tempos 1 e 2 (tempo 1: $29,80\pm 9,78$ / tempo 2: $26,43\pm 14,29$) em relação ao valor de normalidade para o método empregado (tabela 8).

TABELA 7 - Média, desvio padrão, intervalo de confiança e valores de *p* para o efeito do controle metabólico associado ao do tratamento periodontal sobre as características clínicas e laboratoriais relacionadas ao controle metabólico bem como às provas inflamatórias, no grupo teste.

Variável	Grupo	Tempo	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança	<i>p</i>
Glicemia em Jejum	Teste	0	10	249,50	117,15	49,23 /	<0,01*
		2	9	129,73	39,57	192,39	
Peso	Teste	0	10	79,38	25,39	-1,98 / 2,62	0,78
		2	10	79,06	25,42		
IMC	Teste	0	10	29,92	7,51	-0,89 / 1,10	0,82
		2	10	29,81	7,45		
HbA1c	Teste	0	10	10,44	2,68	1,66 / 3,60	<0,01*
		2	10	7,81	1,99		
Col	Teste	0	10	176,50	31,63	-24,76 /	0,95
		2	9	178,78	34,04	23,25	
Triglicérides	Teste	0	10	141,80	119,69	-147,75 /	0,71
		2	9	111,22	49,76	214,61	
HDL	Teste	0	10	51,00	18,28	-5,97/ 4,85	0,83
		2	9	52,11	15,12		
LDL	Teste	0	9	100,33	26,59	-16,51 /	0,99
		2	9	104,56	26,25	16,80	
VHS	Teste	0	10	26,50	8,24	-5,38 / 5,64	0,96
		2	7	26,43	14,29		
PCR	Teste	0	10	0,53	0,48	0,02 / 0,49	0,03*
		2	8	0,33	0,23		
αAG	Teste	0	10	69,50	23,25	-13,43 /	0,84
		2	8	74,25	22,28	11,01	

Glicemia em jejum (mg/dL); Peso (kg); IMC: índice de massa corpórea (kg/m^2); HbA1c (%); COL: colesterol total (mg/dL); TG: triglicérides (mg/dL); HDL: lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL: lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); VHS: velocidade de hemossedimentação (mm/primeira hora); PCR: proteína C reativa (mg/dL); αAG: α-ácido glicoproteína ($\mu\text{g}/\text{dL}$). *Estatisticamente significativo.

TABELA 8 - Média, desvio padrão, intervalo de confiança e valores de *p* para o efeito do tratamento periodontal sobre as características clínicas e laboratoriais relacionadas ao controle metabólico bem como às provas inflamatórias, no grupo teste.

Variável	Grupo	Tempo	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança	<i>p</i>
Glicemia em Jejum	Teste	1	10	112,80	48,16	-87,47 / 55,69	0,65
		2	9	129,73	39,57		
Peso	Teste	1	10	77,91	24,16	-3,45 / 1,15	0,31
		2	10	79,06	25,42		
IMC	Teste	1	10	29,43	7,01	-1,38/ 0,61	0,44
		2	10	29,81	7,45		
HbA1c	Teste	1	10	9,38	2,34	0,60 / 2,54	<0,01*
		2	10	7,81	1,99		
Col	Teste	1	10	155,00	31,24	-44,99 / 0,48	0,06
		2	9	178,78	34,04		
Triglicérides	Teste	1	10	127,30	86,01	-162,25 / 200,11	0,83
		2	9	111,22	49,76		
HDL	Teste	1	10	44,40	11,95	-12,26 / - 2,06	0,01*
		2	9	52,11	15,12		
LDL	Teste	1	10	85,00	20,80	-35,12 / - 3,09	0,02*
		2	9	104,56	26,25		
VHS	Teste	1	10	29,80	9,78	-2,41 / 9,27	0,24
		2	7	26,43	14,29		
PCR	Teste	1	10	0,43	0,39	-0,09 / 0,40	0,20
		2	8	0,33	0,23		
αAG	Teste	1	10	73,70	20,76	-9,23 / 15,21	0,62
		2	8	74,25	22,28		

Glicemia em jejum (mg/dL); Peso (kg); IMC: índice de massa corpórea (kg/m^2); HbA1c (%); COL: colesterol total (mg/dL); TG: triglicérides (mg/dL); HDL: lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL: lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); VHS: velocidade de hemossedimentação (mm/primeira hora); PCR: proteína C reativa (mg/dL); αAG: α-ácido glicoproteína ($\mu\text{g}/\text{dL}$). *Estatisticamente significativo.

5.2. Caracterização periodontal da amostra

As características clínicas periodontais dos pacientes diabéticos tipo 2 tanto do grupo controle, bem como do grupo teste, nos períodos observacionais do estudo estão demonstradas na tabela 9. A média de número de dentes no grupo controle foi semelhante

ao do grupo teste, respectivamente $23,2 \pm 5,8$ e $21,2 \pm 5,5$. Comparando-se os grupos controle e teste, no baseline (tempo 0 – antes da internação), a média de porcentagem de sítios com placa foi significativamente menor (C: $58 \pm 23\%$ / T: $55 \pm 18\%$; IC: $-2,12 / -0,44$), enquanto que a média de porcentagem de sítios com sangramento foi significativamente maior no grupo teste em relação ao grupo controle (C: $47 \pm 12\%$ / T: $57 \pm 16\%$; IC: $-2,17 / -0,49$). Apesar dessas diferenças, foram verificados um quadro clínico de inflamação periodontal e um baixo nível de higiene oral, evidenciados pelas altas porcentagens de sítios com biofilme e SS em ambos os grupos. Em relação à severidade da doença periodontal, desde que o grupo teste caracterizou-se por apresentar periodontite crônica severa, enquanto o grupo controle por não apresentar periodontite, verificou-se que a média da PS foi significativamente maior no grupo teste ($4,18 \pm 1,06\text{mm}$) em relação ao controle ($2,54 \pm 0,19\text{mm}$) [$p < 0,01$ (IC: $-2,26 / -1,01$)], o mesmo ocorrendo com a média do NIC no grupo teste ($5,46 \pm 1,07\text{mm}$) em relação ao controle ($2,65 \pm 0,27\text{mm}$) [$p < 0,01$ (IC: $-3,49 / 2,13$)]. Além disso, a porcentagem de sítios com PS $\geq 5\text{mm}$, bem como com NIC $\geq 5\text{mm}$ foi significativamente maior no grupo teste em relação ao controle. Da mesma forma o número de sítios com PS $\geq 5\text{mm}$, bem como com NIC $\geq 5\text{mm}$ foi superior no grupo teste em relação ao controle. [(%PS - C: $2 \pm 2\%$ / T: $29 \pm 20\%$; IC: $-3,72 / -2,01$) (N.PS - C: $3,70 \pm 3,43$ / T: $55,60 \pm 37,79$)] [(%NIC - C: $3 \pm 3\%$ / T: $41 \pm 17\%$; IC: $-3,04 / -1,34$) (N.NIC - C: $6 \pm 5,35$ / T: $78,7 \pm 32,3\%$)] (tabela 9).

Após a primeira intervenção clínica para obtenção do controle metabólico (tempo 1), através da internação hospitalar, os seguintes parâmetros clínicos periodontais, ausência ou presença do biofilme e sangramento à sondagem, ambos verificados dicotomicamente, foram novamente registrados em ambos os grupos, controle e teste. Assim, comparando-se os tempos 0 e 1, não foram evidenciadas diferenças significativas na porcentagem de sítios com placa nem com SS no grupo controle [(%Placa – T0: $58 \pm 23\%$ / T1: $55 \pm 15\%$; IC: $-20,75 / 19,24$) (%SS – T0: $47 \pm 12\%$ / T1: $42 \pm 16\%$; IC: $-20,78 / 19,17$)], porém, verificou-se uma diminuição significativa de ambos os parâmetros clínicos no grupo teste [(%Placa – T0: $55 \pm 18\%$ / T1: $49 \pm 21\%$; IC: $-1,50 / -0,43$) (%SS – T0: $57 \pm 16\%$ / T1: $49 \pm 12\%$; IC: $-1,54 / -0,47$)]. Após a obtenção do controle metabólico, o grupo teste

apresentou menor porcentagem de sítios com placa, porém maior porcentagem de sítios com SS, significativos, em relação ao grupo controle [(%Placa – C: 55±15% / T: 49±21%; IC: -2,11 / -0,43) (%SS – C: 42±16% / T: 49±12%; IC: -2,16 / -0,47)] (tabela 9).

O tratamento periodontal não cirúrgico associado à antibioticoterapia sistêmica, ao qual foi submetido o grupo teste, após a obtenção do controle metabólico com a internação hospitalar, resultou em uma melhora significativa em quase todos os parâmetros clínicos periodontais avaliados 3 meses após o tratamento (tempo 2). Comparando-se com os níveis registrados no baseline, houve reduções significativas nas porcentagens de sítios com placa e SS aproximadamente de 25,5% e 30%, respectivamente, 3 meses após a segunda intervenção clínica [(%Placa – T0: 55±18% / T2: 41±19%; IC: -1,66 / -0,53) (%SS – T0: 57±16% / T2: 40±9%; IC: -1,70 / -0,58)]. Porém, houve reduções menores, mas ainda significativas, nas porcentagens de sítios com placa e SS aproximadamente de 16% e 18%, respectivamente, 3 meses após o tratamento periodontal em relação ao momento pós internação [(%Placa – T1: 49±21% / T2: 41±19%; IC: -1,64 / -0,54) (%SS – T1: 49±12% / T2: 40±9%; IC: -1,69 / -0,58)]. Em relação ao baseline, houve uma redução média significativa de 1mm na PS (T0: 4,18±1,06mm / T2: 3,19±0,50mm – $p < 0,01$, IC: 0,60 / 1,39), associada a um ganho de inserção clínica de 0,4mm, porém não significativo (T0: 5,46±1,07mm / T2: 5,03±0,64 – $p = 0,07$, IC: -0,04 / 0,89). Além disso, houve diminuição significativa de 62% e redução de 64%, respectivamente, na porcentagem e número de sítios com PS ≥ 5 mm, bem como de aproximadamente 10% na porcentagem e número de sítios com NIC ≥ 5 mm, 3 meses após o tratamento periodontal em relação aos níveis registrados no baseline [(%PS- T0: 29±20% / T2: 11±8%; IC: -3,25 / -2,10) (N.PS- T0: 55,60±37,79 / T2: 20,20±15,84)] [(%NIC- T0: 41±17% / T2: 37±14%; IC: -2,58 / -1,43) (N.NIC- T0: 78,70±32,30 / T2: 71,40±26,25%)] (tabela 9).

TABELA 9 - Médias e desvio padrão para as características clínicas periodontais da amostra selecionada nos tempos observacionais do estudo.

Parâmetros Periodontais	Grupo Controle		Grupo Teste		
	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2
Porcentagem de sítios com placa	58±23% *	55±15% #	55±18% * ¶ §	49±21% # ¶ Ω	41±19% § Ω
Porcentagem de sítios com sangramento a sondagem	47±12% *	42±16% #	57±16% * ¶ §	49±12% # ¶ Ω	40±9% § Ω
PS, mm	2,54±0,19 *	NM	4,18±1,06 * §	NM	3,19±0,50 §
N. de sítios com PS ≥ 5mm	3,70±3,43	NM	55,60±37,79	NM	20,20±15,84
Porcentagem de sítios com PS ≥ 5mm	2±2% *	NM	29±20% * §	NM	11±8% §
NIC, mm	2,65±0,27 *	NM	5,46±1,07 *	NM	5,03±0,64
N. de sítios com NIC ≥ 5mm	6,00±5,35	NM	78,70±32,30	NM	71,40±26,15
Porcentagem de sítios com NIC ≥ 5mm	3±3% *	NM	41±17% * §	NM	37±14% §

PS: profundidade de sondagem (mm); NIC: nível de inserção clínico (mm); NM: não medido; *diferença significativa para comparações controle / teste – tempo 0

diferença significativa para comparações controle / teste – tempo 1

¶ diferença significativa para comparações Tempo 0 / Tempo 1 – teste

§ diferença significativa para comparações Tempo 0 / Tempo 2 – teste

Ω diferença significativa para comparações Tempo 1 / Tempo 2 – teste

5.3. Quantificação de citocinas em sobrenadantes de culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico (método ELISA)

5.3.1. Análise dos resultados obtidos da quantificação das citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas e não estimuladas por LPS

Os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 nos sobrenadantes de culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico, obtidos da maioria dos pacientes diabéticos tipo 2 do grupo teste e do grupo controle, na ausência do estímulo pelo LPS, não foram suficientes para a detecção pelo método empregado. Assim, serão apenas apresentados os resultados das culturas estimuladas. Justifica-se ainda a utilização apenas dos resultados das culturas estimuladas para as análises, pelo fato de que os níveis das quatro citocinas citadas anteriormente, em quase todos os tempos observados do estudo (antes e após a internação hospitalar para a obtenção do controle metabólico e após 4 a 6 semanas do tratamento periodontal, respectivamente tempos 0, 1, 2), levando-se ou não em consideração a divisão dos grupos, encontraram-se significativamente maiores nas culturas estimuladas (LPS) em comparação às sem estímulo (BAS) (apêndices 3, 4, 5, 6) (figuras 13, 13A, 14, 14A, 15, 15A, 16, 16A)

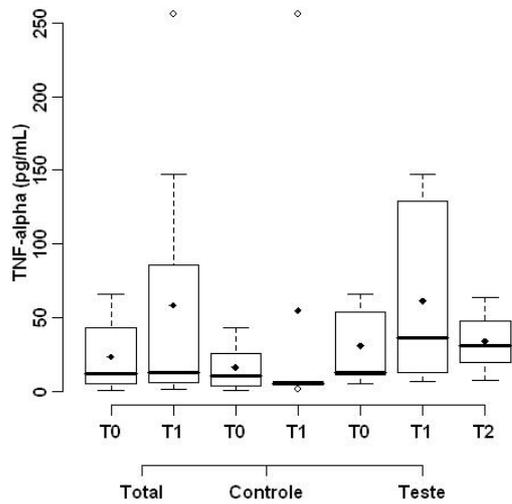


Figura 13

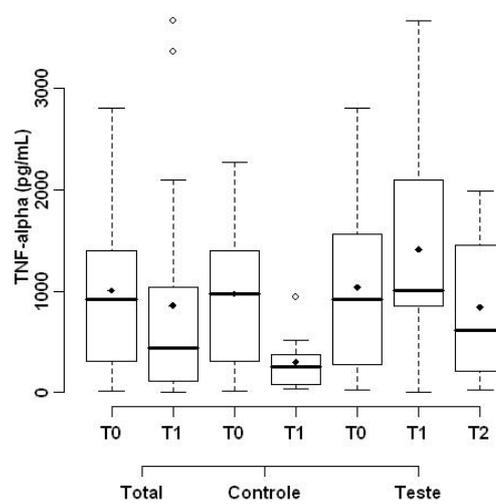


Figura 13A

Figura 13 e 13A - Comparações entre os níveis de TNF- α nos sobrenadantes das células não-estimuladas (BAS- figura 13) e estimuladas (LPS- figura 13A), levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo. Valores de p : N total T0 ($p < 0,01$); N total T1 ($p = 0,01$); Controle T0 ($p < 0,01$); Controle T1 ($p = 0,51$); Teste T0 ($p < 0,01$); Teste T1 ($p < 0,01$), Teste T2 ($p = 0,03$).

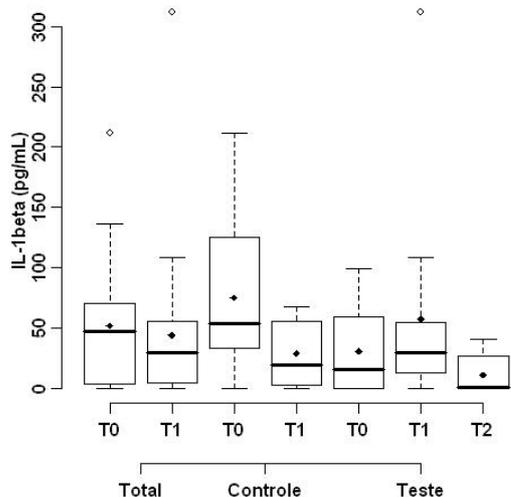


Figura 14

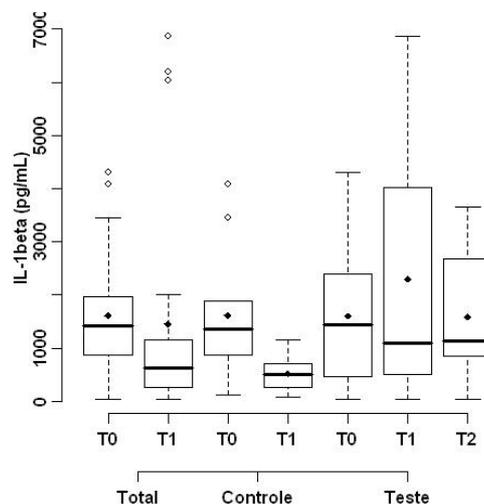


Figura 14A

Figura 14 e 14A - Comparações entre os níveis de IL-1 β nos sobrenadantes das células não-estimuladas (BAS – figura 14) e estimuladas (LPS – figura 14A), levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo. Valores de p : N total T0 ($p < 0,01$); N total T1 ($p < 0,01$); Controle T0 ($p < 0,01$); Controle T1 ($p = 0,38$); Teste T0 ($p = 0,01$); Teste T1 ($p < 0,01$), Teste T2 ($p = 0,01$).

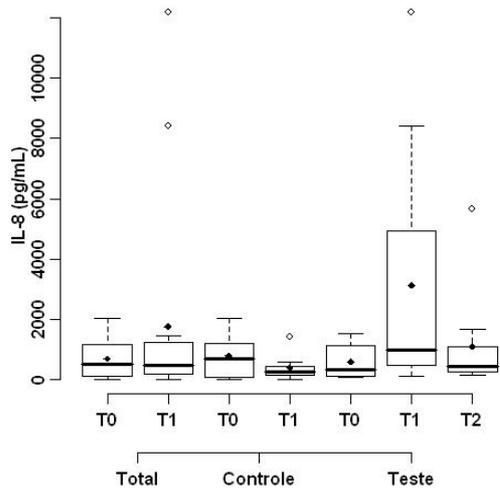


Figura 15

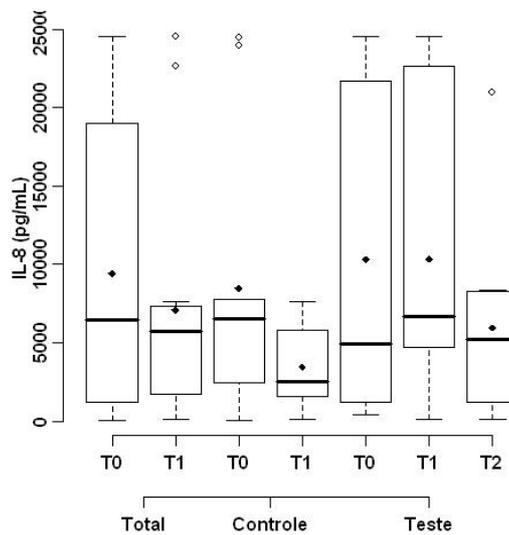


Figura 15A

Figura 15 e 15A - Comparações entre os níveis de IL-8 nos sobrenadantes das células não-estimuladas (BAS – figura 15) e estimuladas (LPS – figura 15A), levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem

como em todos os tempos observacionais do estudo. Valores de p : N total T0 ($p<0,01$); N total T1 ($p=0,01$); Controle T0 ($p<0,01$); Controle T1 ($p=0,24$); Teste T0 ($p<0,01$); Teste T1 ($p=0,01$), Teste T2 ($p=0,04$).

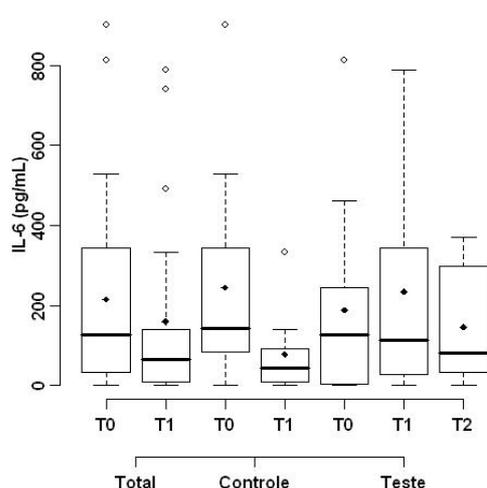


Figura 16

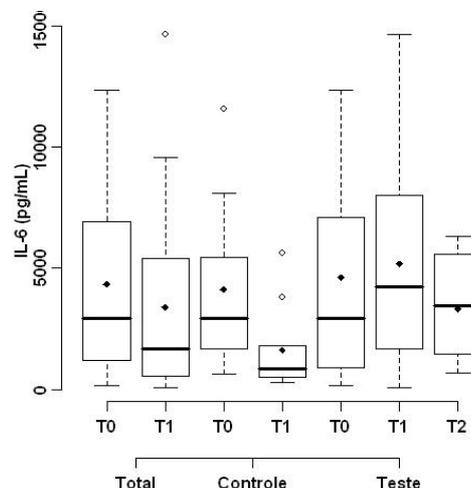


Figura 16A

Figura 16 e 16A - Comparações entre os níveis de IL-6 nos sobrenadantes das células não-estimuladas (BAS – figura 16) e estimuladas (LPS – figura 16A), levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo. Valores de p : N total T0 ($p<0,01$); N total T1 ($p<0,01$); Controle T0 ($p<0,01$); Controle T1 ($p=0,13$); Teste T0 ($p<0,01$); Teste T1 ($p<0,01$), Teste T2 ($p<0,01$).

Comparando-se os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 (pg/mL) nos sobrenadantes das células não estimuladas com daquelas estimuladas, obtidas de pacientes do grupo controle, após a primeira intervenção clínica através da internação hospitalar para obtenção do controle metabólico, verificaram-se também maiores concentrações destas citocinas secretadas pelas células estimuladas, embora sem significância estatística [TNF- α (BAS: $54,71\pm 51,2$; LPS: $299,42\pm 85,5$; $p=0,51$); IL-1 β (BAS: $36,52\pm 10,2$; LPS: $524,87\pm 114,3$; $p=0,38$); IL-8 (BAS: $437,98\pm 173,2$; LPS: $3448,15\pm 884,44$; $p=0,24$); IL-6 (BAS: $85,56\pm 34,16$; LPS: $1613,50\pm 550,02$; $p=0,13$]. Por outro lado, no grupo teste, após a obtenção do controle metabólico, evidenciaram-se níveis significativamente maiores destas citocinas nos sobrenadantes das culturas estimuladas em comparação com as não-estimuladas [TNF- α (BAS: $70,92\pm 28,7$; LPS: $1429,06\pm 445,35$; $p<0,01$); IL-1 β (BAS: $75,59\pm 35,95$; LPS: $2455,95\pm 864,9$; $p<0,01$); IL-8 (BAS: $3523,38\pm 1836,3$; LPS: $10716,04\pm 3415,2$; $p=0,01$); IL-6 (BAS: $339,94\pm 125,8$; LPS: $4908,27\pm 1650,9$; $p<0,010$],

indicando que no grupo controle, o controle metabólico foi capaz de modular a secreção protéica das citocinas por parte das células estimuladas e não-estimuladas, o mesmo não ocorrendo no grupo teste, onde estas células mantiveram a sua alta capacidade reativa (apêndices 3, 4, 5, 6) (figuras 13, 13A, 14, 14A, 15, 15A, 16, 16A).

5.3.2. *Análise dos resultados das quantificações das citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas por LPS*

5.3.2.1. *Comparações das quantificações das citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico considerando-se a amostra total, sem a divisão entre os grupos*

Ao analisar os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 (pg/mL) nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico, estimuladas por LPS, levando-se em consideração apenas o efeito da primeira intervenção clínica através da internação hospitalar para obtenção do controle metabólico, verificou-se uma diminuição, porém não significativa, na secreção de todas as citocinas após a obtenção de tal controle (TNF- α : p=0,56; IL-1 β : p=0,76; IL-8: p=0,33; IL-6: p=0,26) (tabela 10 e figura 17).

TABELA 10 - Média, erro padrão, intervalo de confiança e valores de p para as comparações dos níveis das citocinas nos sobrenadantes das células estimuladas antes e após a internação hospitalar para controle metabólico, levando-se em consideração a amostra total.

Grupo	Tempo	Média (pg/mL)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	p
N Total	0	961,62	177,3	-310,18 /	0,56
TNF- α	1	834,52	245,5	562,39	
N Total	0	1604,62	298,7	-631,23 /	0,76
IL-1 β	1	1490,41	480,4	859,65	
N Total	0	8953,32	2109,2	-1851,08 /	0,33
IL-8	1	7082,10	1944,4	5494,69	
N Total	0	4018,10	810,6	-650,74 /	0,26
IL-6	1	3174,18	889,18	2373,37	

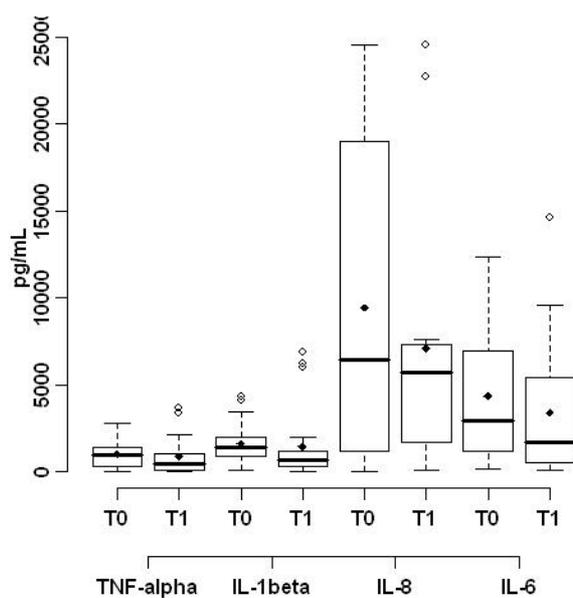


Figura 17 - Comparações entre os níveis das citocinas nos sobrenadantes das células estimuladas obtidas antes (T0) e após a internação hospitalar para controle metabólico (T1), levando-se em consideração a amostra total.

5.3.2.2. Comparações das quantificações das citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico considerando-se os grupos estudados e os tempos observacionais analisados em relação às intervenções realizadas

Ao analisar a quantificação de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 (pg/mL) nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas por LPS, dos pacientes diabéticos tipo 2, sob a influência da primeira intervenção clínica através da internação hospitalar para obtenção do controle metabólico, verificou-se uma diminuição significativa na concentração destas citocinas nos sobrenadantes das culturas das células dos pacientes do grupo controle [TNF- α (T0: 973,29 \pm 231,1 / T1:299,42 \pm 85,5; $p=0,02$); IL-1 β (T0: 1618,99 \pm 395,8 / T1: 524,87 \pm 114,3; $p=0,03$); IL-8 (T0: 8482,17 \pm 2717,2 / T1: 3448,15 \pm 884,44; $p=0,04$); IL-6 (T0: 4032,34 \pm 1089,6 / T1: 1613,50 \pm 550,02; $p=0,02$], verificando-se, por outro lado, no grupo teste, um discreto aumento, porém não significativo, na expressão protéica destas citocinas pelas células estimuladas (tabela 11 e figura 18). Particularmente, em relação ao TNF- α (T0: 949,96 \pm 278,9 / T1:1429,06 \pm 445,3; $p=0,09$) e IL-1 β (T0: 1590,25 \pm 464,6 / T1:2455,95 \pm 864,9; $p=0,08$), o controle metabólico promoveu uma tendência de aumento na secreção de ambas citocinas pelas células estimuladas do grupo teste (tabela 11).

TABELA 11 - Média, erro padrão, intervalo de confiança e valores de p para as comparações dos níveis das citocinas nos sobrenadantes das células estimuladas antes e após a internação hospitalar para controle metabólico, levando-se em consideração a divisão dos grupos.

Citocina	Grupo	Tempo	Média (pg/mL)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	p
TNF- α	Controle	0	973,29	231,1	127,86 /	0,02*
		1	299,42	85,5	1219,86	
	Teste	0	949,96	278,9	-1044,79 /	0,09
		1	1429,06	445,3	802,08	
IL-1 β	Controle	0	1618,99	395,8	128,31 /	0,03*
		1	524,87	114,3	2059,94	
	Teste	0	1590,25	464,6	-1831,51 /	0,08
		1	2455,95	864,9	100,12	
IL-8	Controle	0	8482,17	2717,2	109,16 /	0,04*
		1	3448,15	884,44	100048,00	
	Teste	0	9424,47	3337,4	-6394,82 /	0,57
		1	10716,0	3415,18	3536,62	
IL-6	Controle	0	4032,34	1089,6	407,68 /	0,02*
		1	1613,50	550,02	4429,99	
	Teste	0	4003,85	1247,5	-2936,15 /	0,41
		1	4908,27	1650,9	1206,96	

*Estatisticamente significativo.

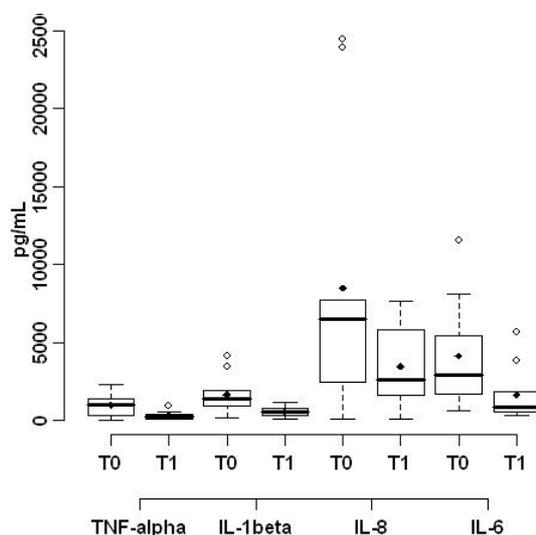


Figura 18 - Comparações entre os níveis das citocinas nos sobrenadantes das células estimuladas obtidas antes (T0) e após (T1) a internação hospitalar para controle metabólico, no grupo controle.

Houve uma secreção de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 significativamente maior nos sobrenadantes das células estimuladas dos pacientes do grupo teste em relação ao grupo controle, após a primeira intervenção clínica através da internação hospitalar para obtenção do controle metabólico [TNF- α (C: 299,42 \pm 85,5 / T: 1429,06 \pm 445,3; p <0,01); IL-1 β (C: 524,87 \pm 114,3 / T: 2455,95 \pm 864,9; p <0,01); IL-8 (C: 3448,15 \pm 884,44 / T: 10716,04 \pm 3415,18; p =0,01); IL-6 (C: 1613,50 \pm 550 / T: 4908,27 \pm 1650,85; p <0,01)], porém sem diferença significativa nas quantificações das citocinas, entre ambos os grupos, antes de tal intervenção (tabela 12 e figura 19).

TABELA 12 - Média, erro padrão, intervalo de confiança e valores de p para as comparações dos níveis das citocinas nos sobrenadantes das células estimuladas entre os grupos controle e teste antes e após a internação hospitalar para controle metabólico.

Citocina	Tempo	Grupo	Média (pg/mL)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	p
TNF- α	0	Controle	973,29	231,1	-566,65 / 613,31	0,94
		Teste	949,96	278,9		
	1	Controle	299,42	85,5	-1738,11 / -527,54	<0,01*
		Teste	1429,06	445,3		
IL-1 β	0	Controle	1618,99	395,8	-1015,66 / 1073,15	0,96
		Teste	1590,25	464,6		
	1	Controle	524,87	114,3	-2975,48 / -886,67	<0,01*
		Teste	2455,95	864,9		
IL-8	0	Controle	8482,17	2717,8	-6176,82 / 4292,22	0,72
		Teste	9424,47	3337,4		
	1	Controle	3448,15	884,44	-12953,00 / -1946,43	0,01*
		Teste	10716,04	3415,18		
IL-6	0	Controle	4032,34	1089,6	-2116,28 / 2173,26	0,98
		Teste	4003,85	1247,5		
	1	Controle	1613,50	550,0	-5456,45 / -1053,44	<0,01*
		Teste	4908,27	1650,85		

*Estatisticamente significativo.

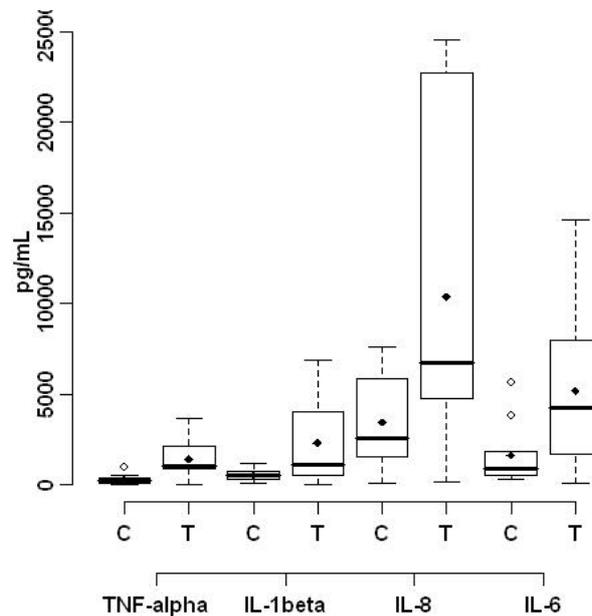


Figura 19 - Comparações entre os níveis das citocinas nos sobrenadantes das células estimuladas obtidos dos grupos controle (C) e teste (T), após a internação hospitalar para controle metabólico.

Em relação à quantificação das citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares aderentes 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal, segunda intervenção clínica à qual foi submetido apenas os pacientes diabéticos com periodontite crônica severa (grupo teste), houve uma discreta diminuição não significativa da secreção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células estimuladas em relação aos níveis quantificados antes da internação hospitalar para obtenção do controle metabólico. Entretanto, houve uma diminuição significativa da secreção do TNF- α pelas células estimuladas nos sobrenadantes 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal ($841,26 \pm 229,08$), comparando ao momento após a obtenção do controle metabólico ($1429,06 \pm 445,3$; $p=0,04$). Já em relação à IL-1 β (T1: $2455,95 \pm 864,9$ / T2: $1589,63 \pm 368,3$; $p=0,08$) e à IL-8 (T1: $10716,04 \pm 3415,18$ / T2: $5947,88 \pm 1880,7$; $p=0,06$), houve uma tendência de diminuição da expressão protéica destas citocinas comparando-se os mesmos

períodos acima. Em relação à IL-6 o tratamento periodontal contribuiu para uma discreta diminuição não significativa da secreção desta citocina pelas células estimuladas em relação ao momento após a obtenção do controle metabólico (tabela 13 e figura 20).

TABELA 13 - Média, erro padrão, intervalo de confiança e valores de *p* para as comparações dos níveis das citocinas nos sobrenadantes das células estimuladas no grupo teste, levando-se em consideração os valores obtidos antes e após o controle metabólico, bem como 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal.

Citocina	Grupo	Tempo	Média (pg/mL)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	<i>p</i>
TNF-α	Teste	0	949,96	278,9	-437,30 /	0,69
		2	841,26	229,8	654,71	
		1	1429,06	445,3	284,95 /	0,04*
		2	841,26	229,8	1153,49	
IL-1β	Teste	0	1590,25	464,6	-965,20 /	0,99
		2	1589,63	368,3	966,43	
		1	2455,95	864,9	-995,04 /	0,08
		2	1589,63	368,3	1832,13	
IL-8	Teste	0	9424,47	3337,4	-1343,41 /	0,15
		2	5947,88	1880,7	8296,60	
		1	10716,04	3415,18	-600,23 /	0,06
		2	5947,88	1880,7	9871,41	
IL-6	Teste	0	4003,85	1247,5	-1319,05 /	0,49
		2	3311,75	672,2	2703,26	
		1	4908,27	1650,9	-514,86 /	0,14
		2	3311,75	672,2	3628,25	

*Estatisticamente significativo.

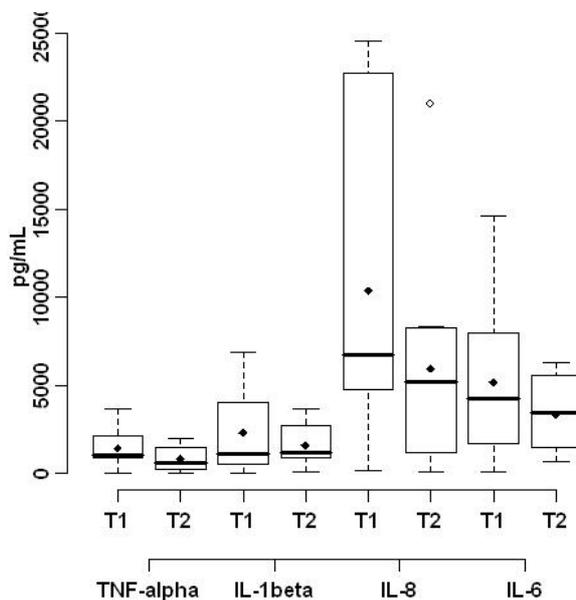


Figura 20 - Comparações entre os níveis das citocinas nos sobrenadantes das células estimuladas no grupo teste, obtidos 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal (T2) em relação àqueles obtidos após o controle metabólico (T1).

5.4. Quantificação relativa da expressão gênica de citocinas pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico em cultura (método PCR em tempo Real - qPCR)

5.4.1. Análise dos resultados da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico em culturas estimuladas e não estimuladas por LPS

A análise estatística da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6, responsáveis pela produção das respectivas citocinas pelas culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico, foi realizada utilizando-se os valores de ΔCt

das amostras de RNA extraídas destas culturas celulares estimuladas ou não por LPS, obtidas em todos os tempos observacionais do estudo (antes e após o controle metabólico obtido com a internação hospitalar, e 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal, respectivamente tempos 0, 1, 2), de ambos os grupos, para cada gene alvo. Uma vez verificada uma significância estatística entre as comparações realizadas com os valores de ΔCt , os valores dos “fold” (valor que revela o número de vezes que um gene candidato em uma condição específica está hiper ou hiporexpresso em relação a uma outra condição específica) foram calculados, através da razão entre as medianas obtidas dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras dos grupos submetidos a tais comparações. Nas tabelas a seguir, foram apresentados as médias dos valores de ΔCt das amostras pertencentes aos grupos, tempos e tipos celulares, os quais foram comparados através da análise estatística, seus respectivos desvios padrões e valores de p para tais comparações. Além disso, procederam-se com as etapas de calibração, obtenção dos valores de $\Delta\Delta Ct$ e obtenção dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para todas as comparações realizadas, como também para o cálculo dos valores dos “folds”, para aquelas que obtiveram significância estatística. Assim, também foram apresentados nas tabelas as médias dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e seus respectivos desvios padrões, das amostras pertencentes aos grupos, tempos e tipos celulares, os quais foram submetidos às comparações estatísticas. Os valores de ΔCt devem ser interpretados em um relação inversa com a quantidade de RNAm na amostra, bem como à expressão do gene alvo, enquanto que os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ devem ser interpretados em uma relação direta com tais características, de modo que quanto menor o valor de ΔCt e maior o de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, maior é a quantidade de RNAm na amostra ou grupo, bem como maior a expressão do gene alvo.

Comparando-se a expressão dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas culturas de células estimuladas por LPS com aquela pelas culturas sem estímulo (BAS), verificaram-se, em todos os tempos observados do estudo (tempos 0, 1, 2), levando-se ou não em consideração a divisão dos grupos, maiores níveis significativos de expressão gênica pelas culturas estimuladas (LPS) do que por aquelas sem estímulo (BAS) ($p < 0,01$). O número de vezes em que os genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 estão significativamente mais expressos nas culturas de células estimuladas em comparação às culturas de células

não-estimuladas estão representadas pelo “fold” nos respectivos apêndices e figuras, para cada gene alvo em cada situação experimental (apêndices 7, 8, 9, 10) (figuras 21, 21A, 22, 22A, 23, 23A, 24, 24A).

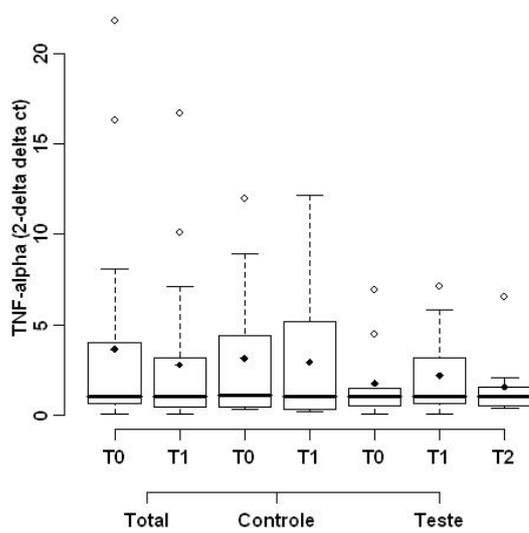


Figura 21

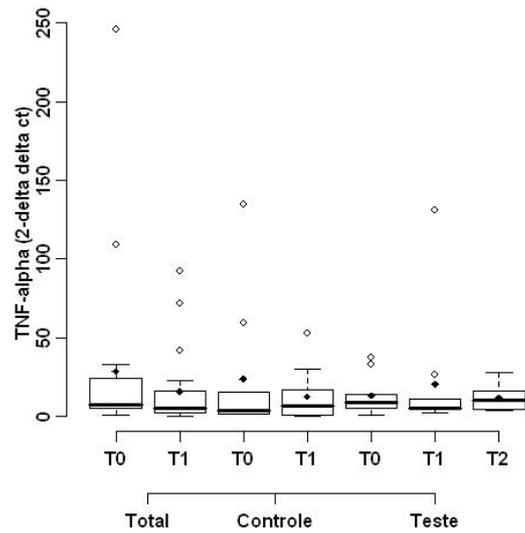


Figura 21A

Figura 21 e 21A - Comparações entre a expressão relativa do gene TNF- α ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pelas células estimuladas (LPS-figura 21A) em relação às células não-estimuladas (BAS-figura 21) levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo. Valores de p e “fold”: N total T0 (7,45 / $p < 0,01$); N total T1 (5,25 / $p < 0,01$); Controle T0 (3,50 / $p < 0,01$); Controle T1 (6,34 / $p < 0,01$); Teste T0 (8,84 / $p < 0,01$); Teste T1 (5,41 / $p < 0,01$), Teste T2 (10,27 / $p < 0,01$).

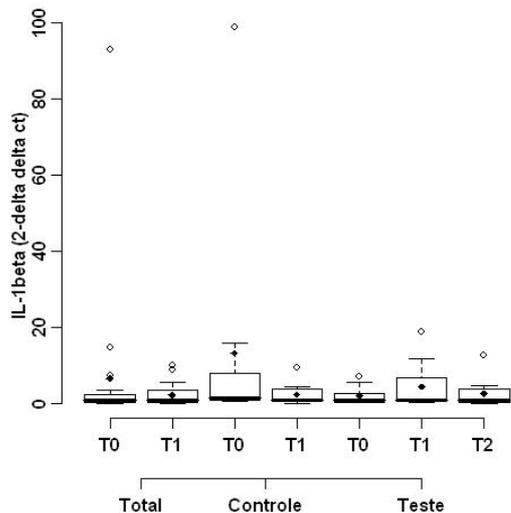


Figura 22

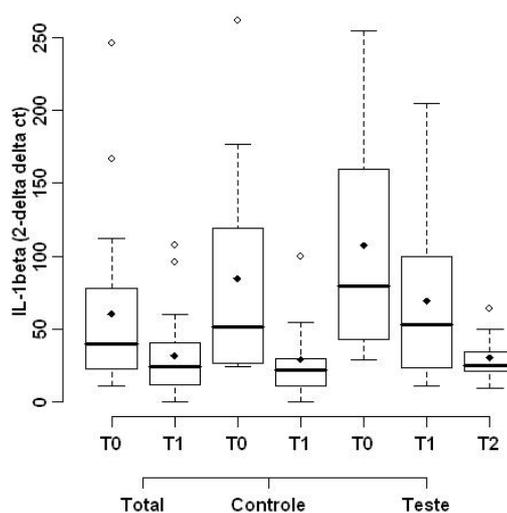


Figura 22A

Figura 22 e 22A - Comparações entre a expressão relativa do gene IL-1 β ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pelas células estimuladas (LPS-figura 22A) em relação às células não-estimuladas (BAS- figura 22) levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo. Valores de p e “fold”: N total T0 (39,96 / $p < 0,01$); N total T1 (23,82 / $p < 0,01$); Controle T0 (33,02 / $p < 0,01$); Controle T1 (22,43 / $p < 0,01$); Teste T0 (77,49 / $p < 0,01$); Teste T1 (52,95 / $p < 0,01$), Teste T2 (25,07 / $p < 0,01$).

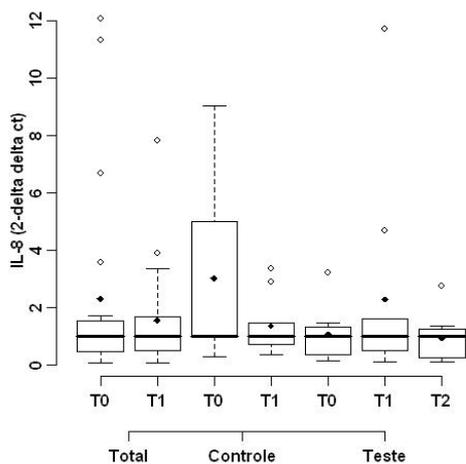


Figura 23

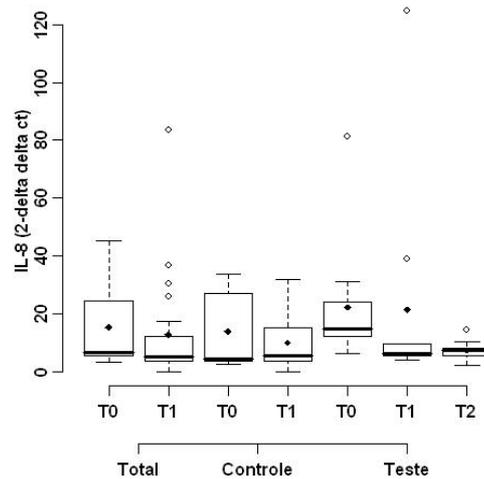


Figura 23A

Figura 23 e 23A - Comparações entre a expressão relativa do gene IL-8 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pelas células estimuladas (LPS- figura 23A) em relação às células não-estimuladas (BAS- figura 23) levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo. Valores de p e “fold”: N

total T0 (6,79 / $p < 0,01$); N total T1 (5,17 / $p < 0,01$); Controle T0 (4,66 / $p < 0,01$); Controle T1 (5,36 / $p < 0,01$); Teste T0 (14,71 / $p < 0,01$); Teste T1 (6,53 / $p < 0,01$), Teste T2 (7,57 / $p < 0,01$).

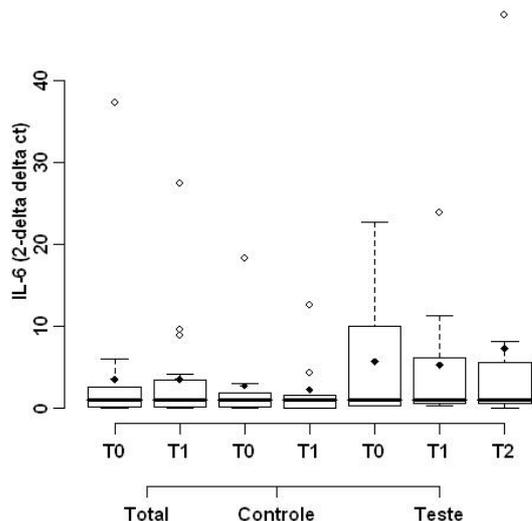


Figura 24

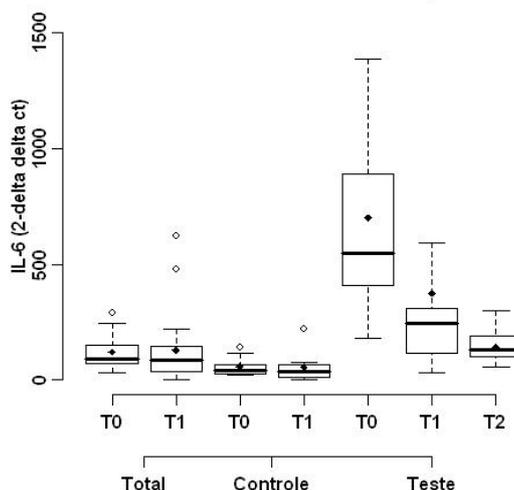


Figura 24A

Figura 24 e 24A - Comparações entre a expressão relativa do gene IL-6 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pelas células estimuladas (LPS- figura 24A) em relação às células não-estimuladas (BAS- figura 24) levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo. Valores de p e “fold”: N total T0 (88,90 / $p < 0,01$); N total T1 (83,84 / $p < 0,01$); Controle T0 (42,24 / $p < 0,01$); Controle T1 (33,31 / $p < 0,01$); Teste T0 (501,7 / $p < 0,01$); Teste T1 (246,7 / $p < 0,01$), Teste T2 (128,05 / $p < 0,01$).

5.4.2. Análise dos resultados da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico de culturas estimuladas ou não por LPS (culturas BAS e LPS), considerando-se a amostra total, sem a divisão entre os grupos

Ao analisar a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico, de culturas estimuladas ou não por LPS, dos pacientes diabéticos tipo 2, levando-se em consideração apenas o efeito da primeira intervenção clínica através da internação hospitalar para obtenção do controle metabólico, esta não influenciou a expressão relativa dos genes acima estudados, uma vez

que não se observaram diferenças significativas entre os valores de ΔCt correspondentes às expressões gênicas de todas as citocinas pelas culturas celulares, antes e após o controle metabólico ao qual os pacientes diabéticos foram submetidos (tabela 14) (figuras 25 e 26).

TABELA 14 - Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), desvio padrão e valores de p para as comparações entre a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células estimuladas e não-estimuladas, antes e após a internação hospitalar para controle metabólico, levando-se em consideração amostra total.

Grupo	Célula	Tempo	Média (ΔCt)	Desvio Padrão	Média ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Desvio Padrão	(p)
N Total	BAS	0	3,54	2,06	3,63	5,75	(0,26)
TNF-α		1	3,00	2,16	5,41	8,24	
N Total	LPS	0	0,76	1,95	3,80	7,86	(0,69)
TNF-α		1	0,57	2,28	4,32	6,79	
N Total	BAS	0	0,05	2,39	6,67	20,58	(0,39)
IL-1β		1	-0,44	1,91	3,44	4,28	
N Total	LPS	0	-5,17	1,22	1,51	1,48	(0,34)
IL-1β		1	-4,62	1,79	1,17	1,06	
N Total	BAS	0	-0,72	1,93	2,32	3,54	(0,30)
IL-8		1	-1,19	1,60	2,33	2,73	
N Total	LPS	0	-4,08	1,30	2,21	2,18	(0,76)
IL-8		1	-3,94	1,94	2,80	4,17	
N Total	BAS	0	9,71	2,75	3,42	8,37	(0,30)
IL-6		1	8,98	2,50	4,40	7,99	
N Total	LPS	0	2,66	0,90	1,33	0,84	(0,71)
IL-6		1	2,91	1,88	1,76	2,14	

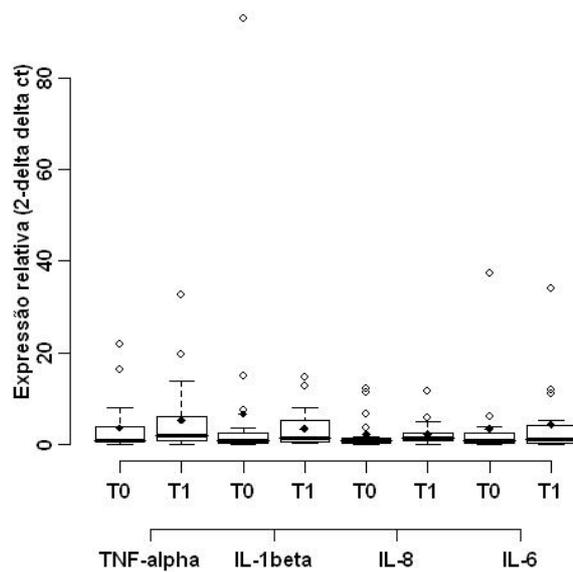


Figura 25 - Comparações entre a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) pelas células não-estimuladas (BAS), antes (T0) e após (T1) a internação hospitalar para controle metabólico, levando-se em consideração amostra total.

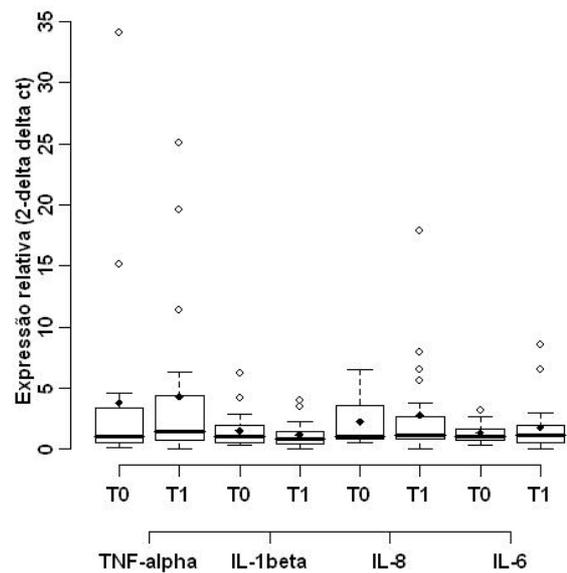


Figura 26 - Comparações entre a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) pelas células estimuladas (LPS), antes (T0) e após (T1) a internação hospitalar para controle metabólico, levando-se em consideração amostra total.

5.4.3. Análise dos resultados da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico de culturas não estimuladas por LPS (culturas BAS), considerando-se os grupos estudados e os tempos observacionais analisados em relação às intervenções realizadas

Avaliando-se a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico não estimuladas por LPS, dos pacientes diabéticos tipo 2, verificou-se que não houveram diferenças significativas entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão relativa dos respectivos genes alvos obtidos antes e após a primeira intervenção clínica para obtenção do controle metabólico, no grupo controle [(TNF- α : $p=0,76$); (IL-1 β : $p=0,55$); (IL-8: $p=0,62$); (IL-6: $p=0,99$)]. Porém, no grupo teste, o gene da IL-8 apresentou uma expressão relativa aproximadamente 2 vezes maior pelas células não estimuladas após o controle metabólico (ΔCt : $-0,73\pm 1,98$; $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: $4,28\pm 6,65$), em comparação ao período anterior (ΔCt : $0,52\pm 1,34$; $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: $1,08\pm 0,88$) ($p=0,04$) (figura 27). Em relação aos genes da IL-1 β e IL-6, no grupo teste, também verificaram-se tendências de aumentos de aproximadamente 2 vezes nas expressões relativas dos mesmos após o controle metabólico, porém sem significância estatística (IL-1 β , tempo 0 - ΔCt : $1,40\pm 1,65$; $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: $2,10\pm 2,43$ / tempo 1 - ΔCt : $-0,04\pm 2,10$; $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: $8,05\pm 11,24$; $p=0,06$) (IL-6, tempo 0 - ΔCt : $11,17\pm 2,69$; $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: $5,73\pm 8,28$ / tempo 1 - ΔCt : $9,48\pm 2,21$; $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: $13,85\pm 20,69$; $p=0,09$) (figura 27). A expressão gênica relativa do TNF- α no grupo teste, por sua vez, não sofreu influência da internação hospitalar para obtenção do controle metabólico, uma vez que não foram demonstradas diferenças significativas entre os valores de ΔCt entre os tempo 0 e 1 ($p=0,2$) (tabela 15) (figura 27). Assim, analisando-se as médias dos valores de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para as expressões relativas dos genes do TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6, pelas células BAS, enquanto, no grupo controle, observou-se uma manutenção ou discreta diminuição do padrão de expressão gênica após a obtenção do controle metabólico,

no grupo teste, verificou-se um padrão de aumento nos níveis de RNAm destas citocinas após a primeira intervenção clínica (tabela 15).

TABELA 15 - Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), desvio padrão (DP), valores de p e valores de “fold” (tempo 1 / tempo 0) para as comparações entre a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células não-estimuladas, antes e após a internação hospitalar para controle metabólico, levando-se em consideração a divisão em grupos.

Citocina	Grupo	Tempo	Média (ΔCt)	DP	Média ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	DP	Fold T1/T0 (p)
TNF-α	Controle	0	2,68	1,94	3,14	4,10	(0,76)
		1	2,48	2,19	4,28	5,97	
	Teste	0	4,39	1,89	1,75	2,18	(0,2)
		1	3,53	2,11	3,44	3,90	
IL-1β	Controle	0	-1,31	2,30	8,56	19,52	(0,55)
		1	-0,85	1,70	2,61	3,05	
	Teste	0	1,40	1,65	2,10	2,43	(0,06)
		1	-0,04	2,10	8,05	11,24	
IL-8	Controle	0	-1,96	1,62	3,03	3,30	(0,62)
		1	-1,66	1,01	1,77	1,29	
	Teste	0	0,52	1,34	1,08	0,88	2 (0,04)*
		1	-0,73	1,98	4,28	6,65	
IL-6	Controle	0	8,53	2,27	2,74	5,53	(0,99)
		1	8,54	2,78	3,02	5,10	
	Teste	0	11,17	2,69	5,73	8,28	(0,09)
		1	9,48	2,21	13,85	20,69	

*Estatisticamente significativo.

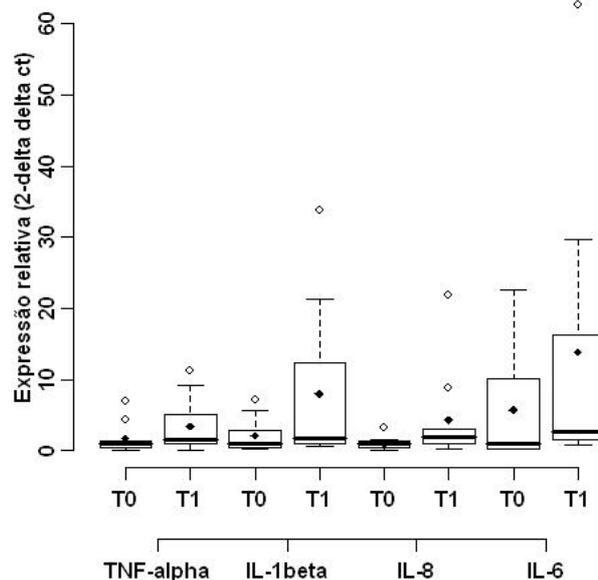


Figura 27 - Comparações entre a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pelas células não-estimuladas, antes (T0) e após (T1) a internação hospitalar para controle metabólico, no grupo teste.

Os genes responsáveis pelas expressões das respectivas citocinas IL-1 β , IL-8 e IL-6 encontraram-se hipoexpressos significativamente nas células não estimuladas do grupo teste [(IL-1 β - ΔCt : $1,40 \pm 1,65$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $0,55 \pm 0,63$); (IL-8 - ΔCt : $0,52 \pm 1,34$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $0,43 \pm 0,35$); (IL-6 - ΔCt : $11,17 \pm 2,69$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $0,49 \pm 0,71$)]; aproximadamente 4, 3 e 11 vezes em relação ao grupo controle [(IL-1 β - ΔCt : $-1,31 \pm 2,30$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $8,56 \pm 19,52$); (IL-8 - ΔCt : $-1,96 \pm 1,62$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $3,03 \pm 3,30$); (IL-6 - ΔCt : $8,53 \pm 2,27$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $2,74 \pm 5,53$)], antes da primeira intervenção clínica para obtenção do controle metabólico (IL-1 β $p < 0,01$; IL-8 $p < 0,01$ e IL-6 $p = 0,01$) (figura 28). O gene do TNF- α também apresentou uma tendência a hipoexpressão de aproximadamente 2 vezes pelas células do grupo teste (ΔCt : $4,39 \pm 1,89$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $0,83 \pm 1,04$) em relação ao grupo controle (ΔCt : $-2,68 \pm 1,94$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $3,14 \pm 4,10$), antes da obtenção do controle metabólico, porém sem significância estatística ($p = 0,06$) (figura 28). Por outro lado, após a internação hospitalar para obtenção do controle metabólico, não

foram verificadas diferenças significativas entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão relativa dos respectivos genes estudados, pelas células do grupo teste em relação ao grupo controle [(TNF- α : $p=0,24$); (IL-1 β : $p=0,32$); (IL-8: $p=0,18$); (IL-6: $p=0,32$)] (tabela 16). Assim, analisando-se as médias dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para as expressões relativas dos genes do TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6, pelas células não estimuladas, observou-se que a ausência de diferença significativa na expressão gênica verificada entre os grupos teste e controle após a internação hospitalar, deveu-se, sobretudo, ao aumento significativo das expressões relativas dos genes estudados, promovido pelo controle metabólico no grupo teste, do que à modulação negativa não significativa desta intervenção clínica na expressão gênica do grupo controle. Corroborando para esta hipótese, tem-se ainda o fato de que os genes encontravam-se significativamente hipoexpressos no grupo teste em relação ao controle, antes da instituição do controle metabólico (tabelas 15 e 16).

TABELA 16 - Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), desvio padrão (DP), valores de p e valores de “fold” (grupo teste / grupo controle) para as comparações da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células não-estimuladas, entre dos grupos controle e teste, antes e após a internação hospitalar para controle metabólico.

Citocina	Tempo	Grupo	Média (ΔCt)	DP	Média ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	DP	Fold T/C (p)
TNF- α	0	Controle	2,68	1,94	3,14	4,10	(0,06)
		Teste	4,39	1,89	0,83	1,04	
	1	Controle	2,48	2,19	2,91	4,05	(0,24)
		Teste	3,53	2,11	1,11	1,26	
IL-1 β	0	Controle	-1,31	2,30	8,56	19,52	4
		Teste	1,40	1,65	0,55	0,63	(<0,01)*
	1	Controle	-0,85	1,70	2,43	2,84	(0,32)
		Teste	-0,04	2,10	1,96	2,73	
IL-8	0	Controle	-1,96	1,62	3,03	3,30	3
		Teste	0,52	1,34	0,43	0,35	(<0,01)*
	1	Controle	-1,66	1,01	1,37	1,00	(0,18)
		Teste	-0,73	1,98	1,33	2,06	
IL-6	0	Controle	8,53	2,27	2,74	5,53	11
		Teste	11,17	2,69	0,49	0,71	(0,01)*
	1	Controle	8,54	2,78	2,27	3,84	(0,32)
		Teste	9,48	2,21	0,90	1,34	

*Estatisticamente significativo.

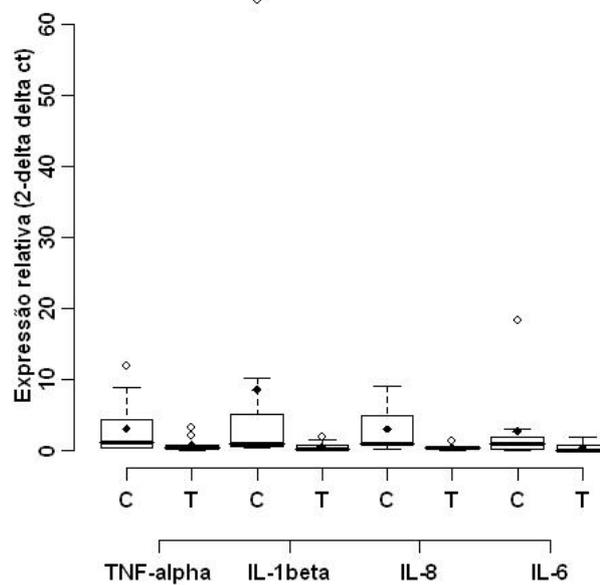


Figura 28 - Comparações da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pelas células não-estimuladas, entre dos grupos controle (C) e teste (T) antes da internação hospitalar para controle metabólico.

Em relação à expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes não estimuladas, 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal, segunda intervenção clínica à qual foi submetido apenas os pacientes diabéticos com periodontite crônica severa (grupo teste), houve uma hiperexpressão significativa dos genes IL-1 β e IL-6 de aproximadamente 6 e 5 vezes pelas células não estimuladas 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal [(IL-1 β - ΔCt : $-0,91 \pm 2,10$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $17,10 \pm 25,50$); (IL-6- ΔCt : $9,03 \pm 2,88$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $38,56 \pm 82,65$)] em relação à expressão dos mesmos antes do controle metabólico obtido com a internação [(IL-1 β - ΔCt : $1,40 \pm 1,65$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $2,10 \pm 2,43$); (IL-6- ΔCt : $11,17 \pm 2,69$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $5,73 \pm 8,28$)] [(IL-1 β : $p < 0,01$); (IL-6: $p < 0,01$)] (figura 29). Ao mesmo tempo, não houve diferenças significativas entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão relativa do TNF- α e IL-8 pelas células não estimuladas 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal, comparando-se ao momento antes do controle

metabólico [(TNF- α : $p=0,53$); (IL-8: $p=0,12$)] (tabela 17) (figura 29). Já em relação ao efeito do tratamento periodontal sobre a expressão relativa dos genes estudados, observou-se que, apesar de não terem sido demonstradas diferenças entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão gênica relativa dos mesmos [(TNF- α : $p=0,50$); (IL-1 β : 0,27); (IL-8: $p=0,63$); (IL-6: 0,64)], pelas células 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal em comparação àquelas verificadas no momento após o controle metabólico, houve um aumento nos níveis de RNAm de IL-1 β e IL-6, comparando-se as médias dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para as expressões relativas destes genes entre os tempos 1 e 2 (tabela 17).

TABELA 17 - Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), desvio padrão (DP), valores de p e valores de “fold” (Tempo 2 / Tempo 0) para as comparações da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células não-estimuladas, do grupo teste, levando-se em consideração os valores obtidos antes e após o controle metabólico, bem como após 4 a 6 semanas do tratamento periodontal.

Citocina	Grupo	Tempo	Média (ΔCt)	DP	Média ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	DP	Fold (T2/T0) (p)
TNF- α	Teste	0	4,39	1,89	1,75	2,18	(0,53)
		2	3,98	1,23	1,78	2,08	
		1	3,53	2,11	2,16	2,45	(0,50)
		2	3,98	1,23	1,12	1,31	
IL-1 β	Teste	0	1,40	1,65	2,10	2,43	6
		2	-0,91	2,10	17,10	25,50	(<0,01)*
		1	-0,04	2,51	4,50	6,28	(0,27)
		2	-0,91	2,10	9,55	14,25	
IL-8	Teste	0	0,52	1,34	1,08	0,88	(0,12)
		2	-0,43	1,47	2,23	1,88	
		1	-0,73	1,98	2,30	3,56	(0,63)
		2	-0,43	1,47	1,20	1,01	
IL-6	Teste	0	11,17	2,69	5,73	8,28	5
		2	9,03	2,88	38,56	82,65	(<0,01)*
		1	9,48	2,21	5,28	7,89	(0,64)
		2	9,03	2,88	14,71	31,53	

*Estatisticamente significativo.

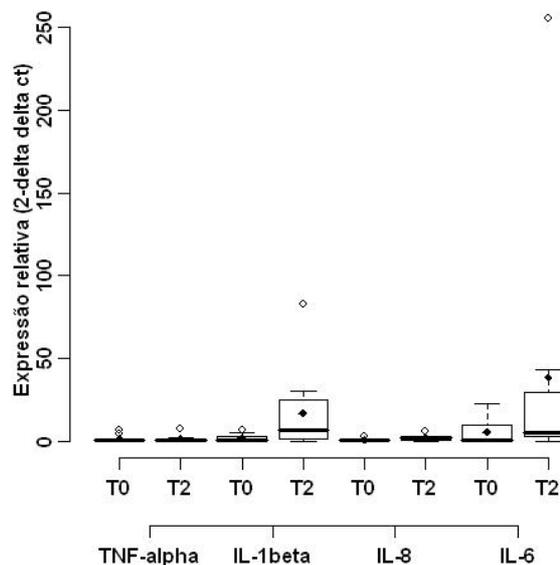


Figura 29 - Comparações da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pelas células não-estimuladas no grupo teste, 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal (T2) em relação ao momento antes do controle metabólico (T0).

5.4.4. Análise da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico de culturas estimuladas por LPS (culturas LPS), considerando-se os grupos estudados e os tempos observacionais analisados em relação às intervenções realizadas

Avaliando-se a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas por LPS, dos pacientes diabéticos tipo 2, não foram verificadas diferenças significativas entre os valores de ΔCt e de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ correspondentes à expressão relativa dos respectivos genes alvos, obtidos antes e após a primeira intervenção clínica para obtenção do controle metabólico, tanto no grupo controle [análise dos valores de ΔCt (TNF- α : $p=0,66$); (IL-1 β : $p=0,13$); (IL-8: $p=0,49$); (IL-6: $p=0,62$)] [análise dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (TNF- α : $p=0,62$); (IL-1 β : $p=0,25$);

(IL-8: $p=0,79$); (IL-6: $p=0,60$)] como no grupo teste [análise dos valores de ΔCt (TNF- α : $p=0,32$); (IL-1 β : $p=0,92$); (IL-8: $p=0,81$); (IL-6: $p=0,97$)] [análise dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ (TNF- α : $p=0,30$); (IL-1 β : $p=0,59$); (IL-8: $p=0,30$); (IL-6: $p=0,49$)] (tabela 18). Porém, analisando-se as médias dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ para as expressões relativas dos genes do TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6, pelas células estimuladas por LPS, enquanto que, no grupo controle, observou-se um padrão de diminuição da expressão gênica após a obtenção do controle metabólico, no grupo teste, verificou-se um padrão de aumento nos níveis de RNAm destas citocinas após esta primeira intervenção clínica (tabela 18).

TABELA 18 - Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta Ct}$), desvio padrão (DP) e valores de p para as comparações entre a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células estimuladas por LPS, antes e após a internação hospitalar para controle metabólico, levando-se em consideração a divisão em grupos.

Citocina	Grupo	Tempo	Média (ΔCt)	DP	Média ($2^{-\Delta Ct}$)	DP	(p)
TNF-α	Controle	0	0,34	2,22	6,22	11,21	(0,66)
		1	0,63	2,84	4,90	6,51	
	Teste	0	1,18	1,66	1,50	1,41	(0,32)
		1	0,51	1,72	3,68	7,11	
IL-1β	Controle	0	-5,60	1,21	1,65	1,54	(0,13)
		1	-4,44	2,21	0,96	0,94	
	Teste	0	-4,73	1,13	1,39	1,08	(0,92)
		1	-4,81	1,35	1,61	1,42	
IL-8	Controle	0	-4,24	1,57	3,01	2,89	(0,49)
		1	-3,82	2,34	2,81	3,01	
	Teste	0	-3,92	1,03	1,52	1,49	(0,81)
		1	-4,07	1,56	2,72	4,78	
IL-6	Controle	0	2,72	0,96	1,37	0,97	(0,62)
		1	3,18	2,22	1,69	2,00	
	Teste	0	2,60	0,89	1,28	0,75	(0,97)
		1	2,64	1,54	1,80	2,31	

Avaliando-se a expressão relativa dos genes responsáveis pela produção das respectivas citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6, pelas culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas por LPS, dos pacientes diabéticos tipo 2, não foram verificadas diferenças significativas entre os valores de ΔCt e de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ correspondentes à expressão relativa dos respectivos genes alvos, obtidos dos grupos teste e controle, antes da primeira intervenção clínica para obtenção do controle metabólico [análise dos valores de ΔCt (TNF- α : $p=0,35$); (IL-1 β : $p=0,28$); (IL-8: $p=0,65$); (IL-6: $p=0,90$)] [análise dos valores de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (TNF- α : $p=0,22$); (IL-1 β : $p=0,15$); (IL-8: $p=0,33$); (IL-6: $p=0,90$)]. Da mesma forma, os valores obtidos de ΔCt e de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ correspondentes à expressão relativa dos respectivos genes alvos não apresentaram diferenças significativas entre as amostras das culturas celulares estimuladas do grupo teste em relação ao grupo controle após a internação hospitalar para obtenção do controle metabólico [análise dos valores de ΔCt (TNF- α : $p=0,89$); (IL-1 β : $p=0,64$); (IL-8: $p=0,72$); (IL-6: $p=0,56$)] [análise dos valores de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (TNF- α : $p=0,80$); (IL-1 β : $p=0,95$); (IL-8: $p=0,77$); (IL-6: $p=0,77$)] (tabela 19). Entretanto, analisando-se as médias dos valores de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para as expressões relativas dos genes do TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6, pelas células estimuladas por LPS, observou-se que, enquanto o grupo teste apresentou um padrão de menor expressão gênica em relação ao grupo controle antes da intervenção clínica para obtenção do controle metabólico, após a obtenção do mesmo, o grupo teste apresentou um padrão de maior expressão gênica em relação ao grupo controle (tabela 19).

TABELA 19: Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta Ct}$), desvio padrão (DP) e valores de p para as comparações da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células estimuladas por LPS, entre os grupos controle e teste, antes e após a internação hospitalar para controle metabólico.

Citocina	Tempo	Grupo	Média (ΔCt)	DP	Média ($2^{-\Delta Ct}$)	DP	(p)
TNF-α	0	Controle	0,34	2,22	6,22	11,21	(0,35)
		Teste	1,18	1,66	1,66	1,55	
	1	Controle	0,63	2,84	1,84	2,45	(0,89)
		Teste	0,51	1,72	1,53	2,95	
IL-1β	0	Controle	-5,60	1,21	1,65	1,54	(0,28)
		Teste	-4,73	1,13	0,85	0,66	
	1	Controle	-4,44	2,21	1,32	1,29	(0,64)
		Teste	-4,81	1,35	1,35	1,20	
IL-8	0	Controle	-4,24	1,57	2,89	95,83	(0,65)
		Teste	-3,92	1,03	1,89	98,21	
	1	Controle	-3,82	2,34	1,78	1,91	(0,72)
		Teste	-4,07	1,56	2,18	3,83	
IL-6	0	Controle	2,72	0,96	1,37	0,97	(0,90)
		Teste	2,60	0,89	1,42	0,83	
	1	Controle	3,18	2,22	1,60	1,89	(0,56)
		Teste	2,64	1,54	1,89	2,43	

Analisando-se a expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas por LPS, não foram verificadas diferenças significativas entre os valores de ΔCt e de $2^{-\Delta Ct}$ correspondentes à expressão relativa dos respectivos genes alvos, obtidos 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal, segunda intervenção clínica à qual foi submetido apenas os pacientes diabéticos com periodontite crônica severa (grupo teste), em relação aos valores quantificados antes da internação hospitalar para obtenção do controle metabólico [análise dos valores de ΔCt (TNF- α : $p=0,60$); (IL-1 β : $p=0,15$); (IL-8: $p=0,90$); (IL-6: $p=0,84$)] [análise dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ (TNF- α : $p=0,99$); (IL-1 β : $p=0,06$); (IL-8: $p=0,55$); (IL-6: $p=0,67$)]. Da mesma forma, os valores obtidos de ΔCt e de $2^{-\Delta Ct}$ correspondentes à expressão relativa dos respectivos genes alvos não apresentaram diferenças significativas entre as amostras das culturas celulares estimuladas do grupo teste obtidas 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal em relação ao momento após o controle metabólico [análise

dos valores de ΔCt (TNF- α : $p=0,63$); (IL-1 β : $p=0,18$); (IL-8: $p=0,72$); (IL-6: $p=0,81$)] [análise dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (TNF- α : $p=0,37$); (IL-1 β : $p=0,15$); (IL-8: $p=0,34$); (IL-6: $p=0,60$)] (tabela 20). No entanto, avaliando-se as médias dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para as expressões relativas dos genes do TNF- α , IL-8 e IL-6, observou-se que, 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal, as culturas estimuladas do grupo teste apresentaram um padrão de manutenção ou discreta diminuição da expressão gênica em relação ao momento anterior à internação hospitalar para obtenção do controle metabólico. Além disso, verificou-se um padrão de discreta diminuição das médias dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para as expressões relativas dos genes do TNF- α , IL-8 e IL-6 pelas células estimuladas do grupo teste 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal em relação ao momento após o controle metabólico. Em relação às médias dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a expressão relativa da IL-1 β pelas culturas estimuladas do grupo teste, observou-se um padrão de aumento na sua expressão gênica, comparando-se os tempos 0 e 2 ($p=0,06$), padrão este mantido, comparando-se os tempo 1 e 2 ($p=0,15$) (tabela 20).

TABELA 20: Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), desvio padrão (DP) e valores de p para as comparações da expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células estimuladas por LPS, do grupo teste, levando-se em consideração os valores obtidos antes e após o controle metabólico, bem como 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal.

Citocina	Grupo	Tempo	Média (ΔCt)	DP	Média ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	DP	(p)
TNF-α	Teste	0	1,18	1,66	1,50	1,41	(0,60)
		2	0,83	1,04	1,51	1,01	
		1	0,51	1,72	3,68	7,11	(0,63)
		2	0,83	1,04	1,51	1,01	
IL-1β	Teste	0	-4,73	1,13	1,39	1,08	(0,15)
		2	-5,84	0,78	2,58	1,37	
		1	-4,81	1,35	1,37	1,21	(0,18)
		2	-5,84	0,78	2,20	1,17	
IL-8	Teste	0	-3,92	1,03	1,52	1,49	(0,90)
		2	-3,85	0,70	1,20	0,54	
		1	-4,07	1,56	3,31	5,80	(0,72)
		2	-3,85	0,70	1,46	0,66	
IL-6	Teste	0	2,60	0,89	1,28	0,75	(0,84)
		2	2,42	0,74	1,39	0,71	
		1	2,64	1,54	1,53	1,96	(0,81)
		2	2,42	0,74	1,18	0,60	

6. Discussão

Diabetes Mellitus tipo 2 e as doenças periodontais representam doenças crônicas que apresentam influências mútuas entre si. Apesar da literatura demonstrar evidências consistentes de que o diabetes representa fator de risco para a maior prevalência e severidade das várias formas de doença periodontal, como as gengivites e periodontites (Mealey & Oates, 2006; Salvi *et al.*, 2008), a influência das doenças periodontais crônicas severas no controle metabólico, bem como na patogênese do diabetes ainda não está bem esclarecido, assim como os mecanismos imunocelulares através dos quais essa influência possa ocorrer (Mealey & Oates, 2006; Lalla, 2007). Como a ativação da resposta inflamatória se dá de maneira similar em ambas as doenças em muitos aspectos, resultando da modulação da resposta imune do hospedeiro, através da hiperativação de fenótipos celulares imunoinflamatórios, elevação de citocinas próinflamatórias e destruição tecidual, torna-se evidente que a resposta de fase aguda caracterizada por alterações no padrão de secreção e expressão gênica de citocinas e ativação do sistema imune inato, parece constituir a base da susceptibilidade cruzada entre doenças crônicas relacionadas à obesidade, como o diabetes tipo 2, e doenças crônicas inflamatórias, como as doenças periodontais. Assim, as doenças periodontais crônicas severas, capazes de ativar uma resposta imunológica crônica local ou sistemicamente, podem induzir ou perpetuar o estado sistêmico inflamatório crônico subclínico, associado à patogênese do diabetes mellitus tipo 2, constituindo fator de risco, em uma maneira similar à obesidade, ao agravamento da resistência insulínica e piora do controle metabólico nestes pacientes, como também para o desenvolvimento das complicações diabéticas (Taylor *et al.*, 1996; Mealey & Oates, 2006; Salvi *et al.*, 2008; Mealey & Rose, 2008).

Monócitos circulantes e macrófagos humanos, importantes mediadores da resposta imune inata e fontes de citocinas, responsáveis tanto pelos processos inflamatórios locais e sistêmicos associados à resistência insulínica e destruição periodontal, como pelas alterações imunocelulares envolvidas no desenvolvimento das complicações crônicas diabéticas, como a maior susceptibilidade a infecções, têm servido como modelo de

avaliação da resposta imunológica de pacientes diabéticos e com periodontite, através do padrão de secreção e expressão gênica de citocinas próinflamatórias (Salvi *et al.*, 1997; Hatanaka *et al.*, 2006; Foss-Freitas *et al.*, 2006; Tsiotra *et al.*, 2007; Giuliatti *et al.*, 2007). Diante do fato de que as alterações no comportamento imunocelular dos pacientes diabéticos tipo 2 frente a agentes moduladores deste, como o controle metabólico, ainda não estão bem elucidadas, assim como a influência da periodontite e de seu tratamento neste comportamento, é que este estudo avaliou a influência sistêmica da periodontite crônica severa, frente ao controle metabólico, bem como do tratamento periodontal, na resposta imunológica de indivíduos diabéticos tipo 2, por meio da análise do potencial próinflamatório das células mononucleares aderentes de sangue periférico, utilizando-se técnicas moleculares de avaliação da quantificação protéica e da expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6.

Na primeira fase do estudo, relacionada à primeira intervenção clínica para obtenção do controle metabólico por meio de internação hospitalar, os parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados ao controle metabólico, os parâmetros clínicos periodontais, assim como a reatividade próinflamatória das células mononucleares aderentes provenientes do sangue periférico, dos pacientes diabéticos tipo 2 de ambos os grupos, foram avaliados antes (Tempo 0) e após a compensação metabólica (Tempo1). Os parâmetros clínicos periodontais registrados para ambos os grupos no “baseline”, revelaram uma caracterização de acordo com critérios de inclusão propostos pelo estudo, na medida em que, o grupo teste, sendo portador de periodontite crônica severa apresentou, apesar de um menor percentual de acúmulo de biofilme, maiores níveis de inflamação e de severidade de doença periodontal, demonstrando maiores níveis de porcentagem de SS, de PS, de NIC e de porcentagem e número de sítios com PS \geq 5mm e NIC \geq 5mm em comparação ao grupo controle. Para este grupo, os parâmetros periodontais também se revelaram condizentes aos critérios de inclusão propostos, na medida em que caracterizaram estes pacientes como portadores de gengivite em um periodonto reduzido ou sem perda de inserção, demonstrando um quadro de inflamação gengival com elevados percentuais de acúmulo de biofilme e de SS, porém níveis de PS e de NIC compatíveis com saúde periodontal, além de baixos níveis de porcentagem e número de sítios com PS \geq 5mm e NIC \geq 5mm,

compatíveis com falsas bolsas periodontais e periodontos previamente reduzidos. Salvo a verificação de uma tendência de idade mais avançada no grupo teste em relação ao grupo controle, o que está de acordo com o fato da doença periodontal crônica e mais severa ser mais prevalente em indivíduos mais velhos (Armitage, 1999), ambos os grupos de pacientes diabéticos tipo 2 encontravam-se bem pareados em relação ao gênero, duração do diabetes e presença de antecedentes positivos para esta doença.

Ambos os grupos apresentavam-se igualmente em um estado de controle metabólico inadequado cronicamente, caracterizado por médias de glicemia em jejum e de HbA1c bem superiores àquelas recomendadas para a manutenção de um adequado controle metabólico em diabéticos segundo critérios pré-estabelecidos (American Diabetes Association, 2009). Porém em relação à avaliação do metabolismo lipídico, apesar de não terem sido verificadas diferenças quanto ao IMC, peso, colesterol total e LDL, com diferenças significativas quanto aos triglicérides e HDL entre os grupos, o grupo controle, portador de um condição periodontal reversível, como a gengivite, apresentou-se dislipidêmico em relação ao grupo teste, demonstrando níveis de colesterol total, triglicérides, LDL superiores, e HDL inferiores àqueles recomendados para a manutenção de um adequado controle lipídico em diabéticos (American Diabetes Association, 2009). Além disso, o grupo controle caracterizou-se por apresentar obesidade grau I, enquanto o grupo teste, portador de uma condição de destruição periodontal crônica severa e irreversível, apresentou sobrepeso.

Os resultados acima vão de encontro àqueles apresentados por Genco *et al.* (2005), que evidenciaram uma associação positiva entre o IMC e a severidade da perda de inserção periodontal. Da mesma forma, outros autores verificaram níveis significativamente maiores de colesterol total, LDL e de triglicérides em indivíduos não-diabéticos com periodontite leve e moderada comparados a indivíduos controles não-diabéticos periodontalmente saudáveis (Losche *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo, recentemente foi descrito que pacientes com hiperlipidemia leve a moderada apresentaram valores mais severos dos parâmetros clínicos periodontais comparados aos indivíduos normolipêmicos (Fentoglu *et al.*, 2009). A discrepância dos resultados reside nas diferenças metodológicas em relação à variedade de parâmetros lipídicos laboratoriais adotados pelos estudos,

havendo diferenças de níveis de hiperlipidemia entre os mesmos, como também em relação aos critérios utilizados para evidenciar severidade de doença periodontal, de modo que no presente estudo, estes foram mais rígidos do que aqueles adotados em outros estudos (Losche *et al.*, 2000; Genco *et al.*, 2005). Além disso, no presente estudo, apesar do grupo teste não ter apresentado hiperlipemia, este apresentou-se em um estágio mais avançado de comprometimento do estado diabético, demonstrando um maior componente de deficiência de secreção de insulina, caracterizado por um menor IMC, maior utilização de insulina NPH, regular e antidiabéticos orais como também maiores níveis de glicemia em jejum, em comparação com o grupo controle, o qual apresentou um componente de resistência insulínica maior, associado a um maior IMC, maiores distúrbios lipídicos e maior frequência de erro alimentar. A maior gravidade do estado diabético no grupo teste justifica a ocorrência de maior severidade da doença periodontal neste grupo em relação ao controle.

Em relação ao efeito do controle metabólico intensivo, obtido durante internação hospitalar, sobre as variáveis clínicas e laboratoriais analisadas, tanto no grupo controle como no teste, houve uma diminuição significativa da glicemia em jejum e da HbA1c indicando, em associação com a diminuição significativa das médias glicêmicas iniciais e finais das internações, a obtenção de um controle glicêmico eficiente. As médias glicêmicas do primeiro dia de internação variaram de 189 a 352 mg/dL no grupo controle e de 175 a 301 no grupo teste, enquanto, após o controle metabólico obtido aproximadamente 8 a 10 dias após o início da internação, variaram de 86 a 164 mg/dL no grupo controle e de 83 a 159 mg/dL no grupo teste. Segundo Foss *et al.* (1982) é possível restabelecer a capacidade oxidativa de glicose em pacientes diabéticos após 72 horas em uso de célula beta artificial. Portanto, tomou-se o cuidado de manter os pacientes internados, em controle glicêmico adequado, por cinco a sete dias, para se eliminar efeitos metabólicos do descontrole crônico, como a glicotoxicidade. Também foi adotado como referência de meta para o controle metabólico, o delta de 100 mg/dL entre as médias glicêmicas diárias do primeiro e último dia de internação, o que foi alcançado no presente estudo. Porém, avaliando-se individualmente cada paciente, apesar de ter-se atingido esta queda nas médias glicêmicas diárias em sua maioria, houve uma grande oscilação entre os pacientes, indicando que a obtenção de um eficiente controle metabólico, mesmo com um controle

glicêmico hospitalar rígido, depende de vários fatores, tais como dieta, ajustes de medicações, aderência dos pacientes ao tratamento, além da grande variabilidade individual intrínseca (herança poligênica) ao diabetes. Por isso, neste estudo, ao invés de se comparar grupos de diabéticos com níveis diferentes de controle metabólico, optou-se por submeter todos os pacientes diabéticos ao mesmo tipo de controle metabólico, utilizando como controles eles mesmos. Este é o primeiro estudo em que se avalia a influência da doença periodontal em indivíduos diabéticos submetidos ao controle metabólico, por meio de internação hospitalar.

É importante salientar, que apesar de se fazer avaliações do controle metabólico utilizando-se somente parâmetros glicêmicos, é de se esperar que o tratamento intensivo também corrija outros distúrbios metabólicos do diabetes mellitus como as alterações do metabolismo de lipídios, proteína, água e eletrólitos. Assim, verificaram-se neste estudo, efeitos do controle metabólico no metabolismo lipídico dos pacientes, demonstrando-se reduções significativas do colesterol total, triglicérides, além de uma tendência de diminuição do HDL, no grupo controle, e reduções significativas do HDL, LDL e uma tendência de redução do colesterol total, no grupo teste. Entretanto, apesar da melhoria no metabolismo lipídico apresentada no grupo controle, inclusive evidenciando uma queda em média de 1 kg/m^2 no IMC em relação ao baseline, este permaneceu dislipidêmico e com obesidade grau I, às custas da permanência dos níveis baixos de HDL e dos níveis altos de triglicérides, em relação aos valores adequados para a manutenção de um bom controle lipídico em pacientes diabéticos (American Diabetes Association, 2009). Esta melhoria no metabolismo lipídico foi mais evidente no grupo controle em relação ao grupo teste, pois, além deste grupo não ter apresentado alterações dislipidêmicas antes da internação, parece que o controle glicêmico é mais benéfico em modificar os níveis plasmáticos de lipídios em indivíduos com hipertrigliceridemia e pobre controle metabólico, correspondendo ao grupo controle (American Diabetes Association, 2009). A metodologia empregada neste estudo para o controle metabólico dos pacientes diabéticos foi semelhante ao adotado por Aso *et al.* (2003), que verificou uma diminuição dos níveis de IL-6 plasmáticos em pacientes diabéticos tipo 2 com pobre controle glicêmico (média de HbA1C de $10,1 \pm 1,9\%$), submetidos a um controle metabólico rígido por meio de internação hospitalar, utilizando-

se sulfoniluréia ou insulina por 3 semanas. Da mesma forma que no presente estudo, foram verificadas reduções significativas da glicemia em jejum, IMC (em média de 0,6 kg/m²), colesterol total e triglicérides em todos pacientes diabéticos submetidos a ambos os tratamentos durante a internação hospitalar. Vale ressaltar que, apesar de no presente estudo a duração da internação ter sido inferior ao do estudo apresentado, foi possível causar alterações da mesma forma benéficas em ambos os metabolismos glicêmico e lipídico, uma vez que o controle metabólico dos pacientes do presente estudo foi obtido através do tratamento e ajuste em conjunto da insulina, dos antidiabéticos orais e da dieta, enquanto dos pacientes do estudo apresentado foi obtido através do tratamento e ajuste exclusivo da insulina ou da sulfoniluréia em conjunto com a dieta.

Diante do fato de que o controle metabólico interfere no grau de severidade das doenças periodontais, na medida em que os pacientes diabéticos com pobre controle glicêmico apresentam formas mais severas de destruição periodontal, associadas à maior exacerbação dos parâmetros clínicos periodontais, como SS, PS e perda de inserção, em comparação àqueles com controle metabólico adequado ou àqueles não-diabéticos (Taylor *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2007), tem-se que, no presente estudo, observou-se uma diminuição da inflamação, com significativas reduções na porcentagem de sítios com SS, além de sítios com placa no grupo teste, porém sem diferenças significativas nestes parâmetros no grupo controle, com a obtenção do controle metabólico pelos grupos. Esta evidência foi corroborada por Ervasti *et al.* (1985) que, avaliando a condição de inflamação gengival entre indivíduos diabéticos com vários níveis de controle metabólico e indivíduos saudáveis, verificaram que, apesar de não ter havido diferenças quanto ao acúmulo de biofilme, pacientes diabéticos descompensados metabolicamente apresentaram maior número de sítios sangrantes em relação àqueles com bom ou moderado controle metabólico, indicando ser a influência deste fator na inflamação periodontal independente da quantidade de fator etiológico para a mesma.

Parece ser mais plausível uma maior influência do controle metabólico no grupo teste, visto que, pelo fato deste apresentar uma condição de destruição tecidual periodontal severa, a resposta imunoinflamatória periodontal inata pôde ter sido mais amplificada pelos mecanismos inflamatórios ativados pelo ambiente hiperglicêmico

crônico, tais como: aumento da formação dos produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) e suas ações, culminando com fenótipo celulares hipersecretores de citocinas inflamatórias e menor reparo tecidual; o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e suas ações; ativação do eixo proteína quinase C / diacilglicerol; ativação da via do poliol / aldose redutase (Mealey & Oates, 2006; Southarland *et al.*, 2006; Nassar *et al.*, 2007; King, 2008). Uma outra explicação para a diminuição dos parâmetros clínicos periodontais mencionados no grupo teste, sem diferenças no grupo controle, comparando-se antes e após a internação hospitalar, foi a maior motivação em relação aos cuidados com a higiene oral apresentada pelos pacientes com periodontite crônica, não só movida pela educação recebida durante a internação em relação aos cuidados com o diabetes bem como à interrelação da doença periodontal com o diabetes (realizada para ambos os grupos), mas pelo fato de saberem que receberiam tratamento periodontal após a intervenção hospitalar.

Em relação às provas inflamatórias, apesar de não ter havido diferenças significativas comparando-se os grupos controle e teste entre si, como também em relação a todos os tempos observacionais do estudo, o VHS apresentou-se e se manteve elevado em ambos os grupos em relação ao valor de normalidade para o método empregado para sua análise na pesquisa. A velocidade de hemossedimentação é um método laboratorial, para verificar a existência de marcadores de resposta inflamatória. Pelo fato de vários fatores poderem afetar o resultado do VHS, produzindo resultados tanto falso-positivos como negativos, ele consiste em uma prova inflamatória não-específica (Collares & Vidigal, 2004). O fato do VHS encontrar-se elevado nos pacientes diabéticos tipo 2 com sobrepeso ou obesidade grau I, de ambos os grupos, no presente estudo, é corroborado por López-Bermejo *et al.* 2007 que evidenciaram uma associação independente entre o VHS e o índice de resistência insulínica em homens, e com marcadores de obesidade (tanto IMC como massa gorda corporal) em mulheres, todos caucasianos sadios.

Os mecanismos pelos quais a resistência insulínica tem sido associada ao aumento do VHS ainda não estão esclarecidos, porém, como esta condição está associada a um estado inflamatório caracterizado pela elevação plasmática de várias proteínas da fase aguda como componentes imunológicos inflamatórios, estes podem neutralizar as cargas negativas da superfície das hemácias, levando a maior agregação destas e formação de

rouleaux, e ao conseqüentemente aumento do VHS. Segundo Elishkevitz *et al.* (2002) a maior agregação eritrocitária evidenciada em pacientes diabéticos, deletéria para um fluxo sanguíneo adequado, está associada a maiores concentrações de fibrinogênio e outras proteínas de fase aguda, bem como a hiperlipidemia e alterações de membranas celulares. Estes autores, avaliando a agregação e adesividade dos eritrócitos em pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2, evidenciaram que o grau desta agregação e adesividade está muito mais associada às variáveis da resposta da fase aguda, como concentrações de fibrinogênio, proteína-C-reativa, colesterol, triglicérides, e VHS, do que ao grau do controle metabólico, avaliado pela HbA1c, sugerindo que os pacientes diabéticos devem se beneficiar de intervenções anti-inflamatórias independente do controle metabólico. Estes resultados justificam a ausência de influência do controle metabólico nos valores de VHS em ambos grupos e a sua discreta diminuição, porém não significativa no grupo teste 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal anti-inflamatório. O fato dos valores do VHS se encontrarem discretamente mais elevados no grupo teste em relação ao controle está de acordo com Hutter *et al.* (2001) que demonstraram maiores níveis significativos de VHS em pacientes com periodontite crônica de moderada a severa em relação aos periodontalmente saudáveis, sugerindo a influência sistêmica da doença periodontal através da indução ou perpetuação da elevação plasmática de proteínas imunoinflamatórias em resposta à infecção bacteriana Gram-negativa local. Ao mesmo tempo, Saito *et al.* (2003) verificaram uma correlação positiva entre os níveis de perda óssea alveolar e os níveis de VHS.

Em relação à análise da reatividade próinflamatória das células mononucleares aderentes provenientes do sangue periférico, pelo método ELISA, obtidas dos pacientes diabéticos tipo 2 de ambos os grupos, utilizou-se apenas dos resultados das culturas estimuladas, pelo fato de não terem sido detectadas quantidades suficientes das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 nos sobrenadantes das células não estimuladas, além de níveis significativamente maiores das mesmas nas culturas estimuladas por LPS em relação às sem estímulo. Este padrão de secreção aumentada de citocinas por parte de células estimuladas em culturas em relação às sem estímulo, sendo os resultados obtidos pelo método ELISA mais evidentes nas culturas estimuladas, foi detectado por Hatanaka *et al.* (2006), que demonstraram que, enquanto em condições basais os neutrófilos de pacientes

diabéticos tipo 2 apresentaram incrementos respectivos de 1.6, 3.2 e 1.9 vezes na secreção de IL-8, IL-1 β e TNF- α em relação aos pacientes saudáveis, em condições de estímulo por LPS os incrementos foram respectivamente de 4.0, 1.7 e 2.8 vezes na secreção das mesmas citocinas em relação aos indivíduos saudáveis. Neste estudo os monócitos, tanto basais como sob estímulo, de pacientes diabéticos também demonstraram uma tendência de maior produção destas citocinas em relação às células de indivíduos controles, sugerindo serem importantes fontes de citocinas próinflamatórias no diabetes, apesar dos neutrófilos terem sido mais afetados pelas condições diabéticas. Diferenças metodológicas encontradas no presente estudo em relação ao apresentado, explicam os melhores resultados apresentados em relação às células estimuladas, como um tempo de cultura maior (24 horas versus 18 horas), origem diferente de LPS (*Salmonella* versus *Escherichia Coli*), como também o fato de serem culturas de células aderentes, apresentando subpopulações celulares com capacidades diferentes de produção destas citocinas em relação às culturas em suspensão.

Tendo em vista a hiperglicemia como o fator que melhor se correlaciona com a severidade das alterações metabólicas subclínicas no diabetes tipo 2, refletidas nas complicações clássicas e na ativação crônica da resposta imunológica inata (DCCT research group, 1993; UKPDS group, 1998; King, 2008; American Diabetes Association, 2009), estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios com a piora no controle metabólico dos pacientes, bem como uma correlação negativa entre tais níveis e a melhora do controle metabólico nos mesmos (Lechleitner *et al.*, 2002; Aso *et al.*, 2003). Através de culturas de monócitos de voluntários sadios e de monócitos humanos THP-1 em meios hiperglicêmicos, demonstrou-se o efeito modulador da hiperglicemia na resposta inflamatória destas células, uma vez que esta aumentou a expressão gênica de TNF- α , IL-6, IL-1 β , β_2 integrina, MCP-1, além da secreção protéica de TNF- α , IL-6 (Morohoshi *et al.*, 1996; Shanmugam *et al.*, 2003).

Corroborando com esta tendência de modulação pela hiperglicemia da resposta inflamatória, verificou-se, no presente estudo, uma diminuição, porém não significativa, na secreção de todas as citocinas nos sobrenadantes das culturas estimuladas, evidenciada por ELISA, levando-se em consideração a amostra total, com a obtenção do controle metabólico. Esta influência, porém moderada, do controle metabólico no potencial

próinflamatório dos monócitos considerando a amostra total de pacientes diabéticos tipo 2 está de acordo com os achados de Morris *et al.* (2004), que verificaram uma redução na secreção de TNF- α *in vitro* por células mononucleares estimuladas de pacientes diabéticos tipo 2 e não-diabéticos obesos com a perda de peso, porém sendo apenas significativa no grupo sem diabetes. Estes resultados indicam que tanto o controle glicêmico como a perda de peso podem reduzir o potencial próinflamatório das células mononucleares, porém o efeito da ativação inflamatória inata do estado diabético pode mascarar os benefícios do controle das variáveis metabólicas, como hiperglicemia e obesidade, quando estão agindo sinergicamente nos indivíduos, como acontece nos pacientes do presente estudo.

Já, em relação à expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6, analisada por PCR em tempo real, pelas culturas destas mesmas células, estimuladas ou não por LPS, considerando-se a amostra total, verificou-se que o controle metabólico não influenciou a expressão relativa dos genes estudados, analisada antes e após o controle metabólico ao qual os pacientes do presente estudo foram submetidos. O fato de no presente estudo a amostra total ser composta por pacientes que apresentam sinergicamente diabetes tipo 2 e obesidade ou sobrepeso, associado à instituição de um controle metabólico intenso porém durante um curto período de tempo, interferindo de maneira diferente no controle glicêmico e no controle das variáveis relacionadas à obesidade, tornam difícil a avaliação da real influência do controle metabólico na resposta imunoinflamatória nestes indivíduos, que apresentam ambas as condições e, sobretudo diabetes, contribuindo para a hiperativação do potencial próinflamatório das células mononucleares. Assim, Fodega *et al.* (2004), através do PCR em tempo real, demonstraram uma maior expressão de RNAm da relação dos receptores de TNF- α (TNFR2m/TNFR1m) em células mononucleares de pacientes diabéticas tipo 2 obesas em relação àquelas obesas não diabéticas, além de uma correlação positiva entre tal relação e os níveis de glicose plasmática em todos os indivíduos, porém uma correlação positiva com o IMC apenas no grupo diabético, indicando um maior efeito sinérgico da hiperglicemia e do IMC sobre a expressão destes receptores inflamatórios na vigência do diabetes.

Avaliando-se a quantificação de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 nos sobrenadantes das culturas estimuladas por LPS, através do ELISA, levando-se em consideração a divisão

da amostra nos grupos teste e controle, verificou-se que o controle metabólico obtido pela internação hospitalar promoveu uma diminuição significativa na secreção destas citocinas nas culturas celulares dos pacientes do grupo controle, porém um discreto aumento não significativo na secreção das mesmas nas culturas celulares dos pacientes do grupo teste, especialmente para o TNF- α e IL-1 β , que apresentaram uma tendência de aumento mais relevante neste grupo. Observou-se ainda uma secreção significativamente maior das citocinas próinflamatórias no grupo teste em relação ao controle após a internação hospitalar, diferença esta provavelmente mais relacionada à diminuição significativa das secreções das citocinas estudadas, promovida pelo controle metabólico no grupo controle, do que à modulação positiva não significativa desta intervenção clínica na expressão protéica do grupo teste, desde que não havia diferenças nas quantificações destas citocinas entre ambos os grupos antes desta intervenção clínica. Corroborando para esta hipótese, tem-se ainda a eliminação da diferença significativa na secreção das citocinas entre as células estimuladas e não-estimuladas no grupo controle após o controle metabólico, aliado à persistência de tal diferença no grupo teste nas mesmas condições metabólicas.

Diante destes fatos, pôde-se, então, observar um padrão de comportamento diferente das células estimuladas entre os grupos controle e teste perante o controle metabólico, de modo que este foi capaz de modular a secreção protéica das citocinas nas células dos pacientes do grupo controle, com tendência à diminuição nas secreções, o mesmo não ocorrendo no grupo teste, onde estas células mantiveram ou aumentaram a sua capacidade reativa, com tendência a aumentar tais secreções frente a esta modulação metabólica.

Foi sugerido que a infecção periodontal crônica pode servir como estímulo indutor ou propagador do estado sistêmico inflamatório crônico associado à patogênese do diabetes tipo 2, através da ativação crônica da resposta imunológica inata induzida por citocinas, contribuindo para o aumento da resistência insulínica ou menor sensibilidade à mesma e, assim, dificultando o controle metabólico nos pacientes diabéticos portadores desta condição periodontal (Mealey & Oates, 2006; Salvi *et al.*, 2008; Mealey & Rose, 2008). Diante desta sugestão e frente aos resultados demonstrados, é plausível que a periodontite crônica severa, característica do grupo teste, esteja impedindo (sobrepunhando)

o efeito anti-inflamatório do controle metabólico no potencial próinflamatório das células mononucleares aderentes do sangue periférico, o que foi verificado no grupo controle, mantendo a capacidade reativa das células do grupo teste à estímulos. Vale ressaltar que a infecção periodontal crônica, apresentando um curso crônico e um comportamento subclínico, nem sempre evidenciada por provas inflamatórias sanguíneas, não impede a obtenção do controle glicêmico ou metabólico, verificado no grupo teste, mas pode contribuir para a maior resistência insulínica, dificultando este controle, por manter a ativação crônica do sistema imunológico, também evidenciado neste mesmo grupo. Esta ativação linfomononuclear pode, então, estar associada a superantígenos decorrentes de infecções crônicas, como as infecções periodontais (Fraser *et al.*, 2000).

Assim, as citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂, bem como lipopolissacarídeos bacterianos, advindos de fontes periodontais podem interagir com os lipídios, ácidos graxos e AGEs, característicos das condições diabéticas e de obesidade, propagando e aumentando a ativação de mecanismos intracelulares associados à resistência insulínica, tais como os eixos da IKK β / NF- κ β e da JNK, tanto localmente como sistemicamente, por alcançar a corrente circulatória, ativando-os nos adipócitos, hepatócitos, células imune (macrófagos/monócitos) e endoteliais, contribuindo para o quadro de resistência insulínica sistêmica (Shoelson *et al.*, 2006; Mealey & Oates, 2006; Preshaw *et al.*, 2007; Mealey & Rose, 2008).

As periodontites podem contribuir para a elevação dos mediadores inflamatórios séricos em pacientes diabéticos tipo 2 por alguns mecanismos, dentre eles, o maior potencial inflamatório de monócitos de pacientes diabéticos frente ao desafio bacteriano periodontal (Salvi *et al.*, 1997, 1998; Engebretson *et al.*, 2007). Salvi *et al.* (1997), verificaram que, dentre os diabéticos, os monócitos dos pacientes com periodontite moderada a severa apresentaram maior secreção significativa de TNF- α em comparação àqueles dos portadores de condições periodontais menos severas, não havendo diferenças no controle metabólico de ambos os grupos (que era inadequado), nem correlações entre os níveis desta citocina e os níveis de HbA1c. Diante disto os autores descartaram a influência do controle metabólico na maior reatividade monocítica inflamatória encontrada no grupo com periodontite mais severa, porém a atribuíram à apresentação, por parte de um subgrupo

de 10 pacientes deste grupo, de um fenótipo hipersecretor de TNF- α alterado por variações genéticas em regiões regulatórias deste gene, relacionadas, sobretudo, ao diabetes tipo 1, conferindo um risco de aproximadamente 10 vezes para o desenvolvimento de formas mais severas de doença periodontal. Outro estudo realizado por estes mesmos autores corrobora com o anterior, na medida em que, utilizando a mesma metodologia, demonstraram uma produção significativamente maior de PGE₂ e de TNF- α por monócitos estimulados dos pacientes diabéticos com periodontite moderada a severa, quando comparados aos pacientes com gengivite e periodontite leve, bem como aos dos não-diabéticos controles com estados periodontais similares (Salvi *et al.*, 1998). Os resultados do presente estudo estão de acordo com os anteriores, na medida em que também foi evidenciada uma maior secreção das citocinas inflamatórias por parte das células mononucleares dos pacientes diabéticos tipo 2 com formas mais severas de periodontite em relação àqueles com uma simples inflamação gengival, porém, diferentemente dos anteriores, elucida a capacidade da infecção periodontal severa de contribuir para o maior potencial inflamatório das células mononucleares circulantes, alterando a resposta imunoinflamatória de diabéticos, mesmo em vigência de um controle metabólico intenso, importante modulador desta resposta nestes pacientes. Outros estudos (Araya *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2004), entretanto, utilizando metodologias diferentes das empregadas no presente estudo, tais como culturas de sangue total, estimuladas por LPS de *Escherichia coli*, e grupos de pacientes diabéticos tipo 1 com ou sem outras formas de doença periodontal, como a periodontite agressiva, e indivíduos controles saudáveis, não conseguiram evidenciar diferenças nas secreções de IL-1 β e IL-6 entre os grupos, porém maiores secreções de TNF- α pelos pacientes com periodontite agressiva em relação aos grupos diabéticos com ou sem a mesma e ao grupo controle, sugerindo uma influência da severidade da doença periodontal no desenvolvimento do fenótipo monocítico hipersecretor de mediadores inflamatórios.

Ainda se tratando da influência do controle metabólico no potencial próinflamatório das células mononucleares aderentes de sangue periférico estimuladas por LPS, verificada pelo ELISA, Foss-Freitas *et al.* (2006), utilizando a mesma metodologia de controle metabólico rígido por insulina, através de internação hospitalar, como também o mesmo protocolo de cultura celular, empregados no presente estudo, verificaram uma

tendência de aumento nos níveis de TNF- α e um aumento significativo nos níveis de IL-6 em pacientes diabéticos tipo 2, após o adequado controle metabólico. Os autores sugeriram que estes incrementos na secreção de TNF- α e IL-6 em pacientes diabéticos tipo 2 obtidos com o tratamento insulínico, indicaram que o controle metabólico melhora a capacidade de ativação e manutenção do potencial próinflamatório das células mononucleares, contribuindo para a diminuição da susceptibilidade a infecções encontrada nestes indivíduos. Considerando-se a amostra total de indivíduos diabéticos tipo 2, os resultados do presente estudo suportam os anteriormente apresentados, uma vez que também não foi evidenciada diferenças significativas na secreção de TNF- α com o controle metabólico. Entretanto, considerando-se a divisão em grupos, o fato desta tendência de aumento na secreção das citocinas próinflamatórias estudadas ter sido observado apenas no grupo portador de periodontite crônica severa, indica que esta infecção crônica, com potencial de alterar a resposta imunológica, ativando a capacidade reativa inflamatória das células mononucleares, pode constituir um viés para os trabalhos que envolvem pacientes diabéticos tipo 2. As infecções periodontais crônicas severas, sendo condições subclínicas, nem sempre rastreadas por provas inflamatórias inespecíficas, podem passar despercebidas pelos pesquisadores que não levam em consideração o exame da cavidade oral destes pacientes. No presente estudo ainda, não foram verificadas alterações nos níveis da proteína-C-reativa, nem da α -ácido glicoproteína, porém aumentos no VHS, em relação aos níveis de normalidade para os métodos empregados para a análise destas variáveis, em todos os tempos observacionais.

O fato de no grupo controle, obeso em relação ao grupo teste, o controle metabólico ter demonstrado um efeito mais significativo na redução do peso, através de uma diminuição significativa do IMC, pôde ter contribuído para a diminuição significativa das secreções das citocinas próinflamatórias, evidenciada com o controle metabólico neste grupo, na medida em que Mito *et al.* (2002), verificando maiores níveis significativos de secreção *in vitro* de IL-1 β por células mononucleares de indivíduos obesos diabéticos e não-diabéticos tipo 2 em relação àqueles não-obesos diabéticos tipo 2, indicaram ser a obesidade um fator preponderante no aumento da capacidade inflamatória destas células nestes indivíduos.

Paralelamente à hiperglicemia, outra característica do diabetes tipo 2 que parece contribuir para a discrepância dos resultados de estudos que tentam avaliar a influência do controle metabólico na resposta imunológica, é o efeito da hiperinsulinemia, já que estas condições ocorrem simultaneamente nestes pacientes. Foi demonstrado *in vivo*, que a hiperinsulinemia associada à euglicemia aumentou a resposta plasmática à infusão de LPS através do aumento dos níveis séricos de IL-6 em pacientes saudáveis, sem apresentar efeitos sobre os níveis de TNF- α (Soop *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, verificou-se em modelo *ex-vivo* que a hiperinsulinemia, em ausência ou presença de hiperglicemia associada, aumentou a expressão gênica relativa de citocinas próinflamatórias por células de sangue total estimuladas por LPS de pacientes saudáveis, tais como IL-1 β , IL-6 e IL-8, sendo que a hiperglicemia *per se* resultou apenas em uma indução atenuada desses genes, sugerindo um efeito mais potente e preponderante da hiperinsulinemia sobre a hiperglicemia nos níveis de RNAm de genes inflamatórios (Stegenga *et al.*, 2008).

Estas evidências apresentadas acima, associadas à presença da infecção periodontal, podem ter corroborado para a observação, no presente estudo, de um padrão de comportamento diferente das células estimuladas entre os grupos controle e teste perante o controle metabólico, com a diminuição significativa da secreção das citocinas pelas células dos pacientes do grupo controle, e a manutenção ou aumento da capacidade reativa celular, com tendência ao aumento de tais secreções frente a esta modulação metabólica, evidenciada no grupo teste. Enquanto o grupo teste apresentou-se em um estágio mais avançado de comprometimento do estado diabético, demonstrando um maior componente de deficiência insulínica, o grupo controle demonstrou um maior componente de resistência insulínica. Assim, é plausível que o grupo teste, portador de um perfil mais insulínico antes da internação hospitalar, tenha aumentando a sua capacidade de produção insulínica, com o controle glicêmico e correção da glicotoxicidade, passando de um estado insulínico para um normoinsulínico, o que refletiu na sua maior reatividade imunoinflamatória celular. Já no grupo controle, portador de um perfil mais hiperinsulinêmico antes da internação, pela correção sobretudo da lipotoxicidade através do ajuste dos seus distúrbios lipídicos e diminuição significativa do IMC pela redução de peso, obtidos com o controle metabólico, seja plausível que tenha havido um aumento na

sensibilidade à insulina, promovendo a passagem de um estado hiperinsulinêmico para um normoinsulínico, o que refletiu na redução do seu potencial próinflamatório celular.

Em relação à expressão relativa dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes estimuladas por LPS, considerando-se a divisão da amostra nos grupos avaliados no presente estudo, apesar de não terem sido evidenciadas diferenças significativas entre as expressões relativas dos genes alvos, comparando-se os tempos 0 e 1 em ambos os grupos, bem como comparando-se os grupos nestes mesmos tempos observacionais, observou-se no grupo controle um padrão de diminuição da expressão gênica correspondente às citocinas estudadas após a obtenção do controle metabólico, ao passo que, no grupo teste, um padrão de aumento nesta mesma expressão após esta primeira intervenção clínica. Ao mesmo tempo, observou-se que o grupo teste apresentou um padrão de menor expressão gênica em relação ao grupo controle em controle metabólico inadequado, e um padrão de maior expressão gênica em relação ao grupo controle, em controle metabólico adequado. Estas tendências de expressão gênica pelas células estimuladas correspondentes às citocinas próinflamatórias estudadas, avaliadas pelo PCR em tempo real, corroboraram com o padrão de secreção protéica por estas mesmas células, evidenciado pelo ELISA, indicando ser a infecção periodontal crônica severa um fator contribuinte da ativação crônica da resposta imunoinflamatória inata induzida por citocinas, sendo capaz de influenciar a resposta imunológica dos pacientes diabéticos mantendo ou aumentando a capacidade reativa das células mononucleares a estímulos, mesmo em vigência de um adequado controle metabólico.

Os resultados deste estudo que avaliaram a influência sistêmica da periodontite crônica severa, frente ao controle metabólico, na resposta imunológica de indivíduos diabéticos tipo 2, através da análise da expressão relativa dos genes correspondentes às citocinas próinflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico destes indivíduos, são inéditos. Assim, os estudos que utilizaram a técnica de PCR em tempo real, para avaliar a resposta imunológica de pacientes diabéticos tipo 2 frente a condições de controle metabólico distintas, através da expressão de genes correspondentes às citocinas próinflamatórias por células mononucleares, apresentaram várias diferenças metodológicas entre si e com o presente

estudo tais como, comparações entre grupos de indivíduos com condições metabólicas distintas com grupos controles saudáveis, tempos de cultura de células, estímulos celulares, pureza de monócitos e sondas de PCR em tempo real distintas, o que tornou difícil a equiparação dos resultados (Giulietti *et al.*, 2004; Giulietti *et al.*, 2007; Chacón *et al.*, 2007). Chacón *et al.* (2007), ao demonstrar uma preponderância do efeito hiperinflamatório do estímulo endotoxêmico (LPS) sobre a ausência do efeito do estímulo hiperglicêmico agudo nos monócitos de diabéticos tipo 2 em controle metabólico adequado e recentemente diagnosticados, corroborou com o fato de os indivíduos com infecção periodontal crônica terem apresentado, no presente estudo, um padrão de ativação inflamatória monocítica através de uma maior expressão gênica e protéica de citocinas próinflamatórias em relação ao grupo controle em vigência de um controle metabólico adequado, embasando a hipótese do efeito adicional das endotoxinas provenientes da infecção periodontal na hiperativação ou manutenção da ativação da resposta imune inata destes indivíduos.

No presente estudo, apesar de ter havido uma correspondência no padrão de comportamento celular avaliado pelo ELISA e pelo PCR em tempo real nas células mononucleares estimuladas, os resultados obtidos com cada uma destas técnicas moleculares para quantificação de citocinas inflamatórias devem ser analisados separadamente, ao mesmo tempo em que podem demonstrar discrepâncias entre si, uma vez que avaliam a produção das citocinas em níveis celulares diferentes. Enquanto a técnica do ELISA é capaz de avaliar o comportamento imunológico celular a nível protéico, uma vez que detecta a presença das citocinas nos sobrenadantes das culturas celulares, já traduzidas pela máquina ribossomal, processadas pelo complexo de Golgi e liberadas para o meio extracelular, a técnica do PCR em tempo real avalia o comportamento celular a nível gênico, uma vez que analisa a expressão gênica das citocinas através da quantificação dos transcritos de RNAm produzidos a partir da transcrição dos genes responsáveis pela produção das mesmas.

Assim, entre a transcrição de um determinado gene até a produção final e liberação da sua proteína correspondente para o meio extracelular, vários são os fatores que podem influenciar e determinar a quantidade final de proteína produzida por uma célula, tais como os reguladores da expressão gênica à nível da transcrição, como os mecanismos

de transdução de sinal culminando com a ativação de fatores de transcrição específicos, ativação de fatores de especificidade e fatores supressores, além dos mecanismos pós-transcricionais de regulação a nível de processamento de RNAm, à nível da tradução, à nível do processamento pós-tradução e a proteólise (Carpenter & Cantley, 2001). Roach *et al.* (2007), avaliando a concentração de RNAm de fatores de transcrição durante a ativação de células mononucleares por LPS, por 24 horas, identificaram 92 tipos de fatores de transcrição que apresentaram alterações significativas nas suas concentrações durante este período, indicando que estes fatores podem controlar a transcrição gênica através da sua ação combinatória em pequenos grupos, interferindo na secreção final de proteínas. A técnica de ELISA difere ainda do PCR em tempo real quanto à sensibilidade dos métodos e variabilidade dos resultados entre as amostras, o que pode interferir na verificação de diferenças estatísticas entre os mesmos.

Outros mecanismos que podem alterar a transcrição gênica, corroborando para a variabilidade nas expressões protéicas, e, sobretudo, nas repostas imunológicas inflamatórias entre os indivíduos, conferindo-lhes susceptibilidade e níveis de severidade distintos em doenças de natureza inflamatória e neoplásica, são os mecanismos epigenéticos (Wilson, 2008). Estes são definidos como todas as alterações meióticas ou mitóticas na expressão de genes que não são codificadas na sequência de DNA. Modificações epigenéticas na cromatina e no DNA têm sido reconhecidas como importantes fatores permissivos ou supressores do controle do genoma via transcrição gênica. Dois principais mecanismos epigenéticos são a modificação pós-traducional das histonas na cromatina e a metilação da própria molécula de DNA. A metilação de regiões regulatórias de transcrição de genes é responsável pelo silenciamento dos mesmos por interferir no acesso dos fatores de transcrição à região promotora. Já a modificação das cargas positivas das histonas pela adição de grupamentos acetil, fazem com que estas formem uma configuração com o DNA mais relaxada (aberta), favorecendo a maior transcrição gênica. Outros exemplos de mecanismos epigenéticos e também reguladores da expressão gênica per se, que podem alterar a concentração final da proteína correspondente, é a ação dos microRNAs, que são RNAs pequenos, não codificantes que regulam a

expressão de genes, através, por exemplo, da alteração da metilação do DNA (Wilson, 2008).

Diferentemente do ELISA, na técnica de PCR em tempo real foi possível verificar a expressão gênica das citocinas estudadas pelas culturas de células mononucleares aderentes de sangue periférico não estimuladas por LPS, ou seja em condições basais, sendo uma grande vantagem deste método, já que este estímulo, sendo um estressor para as células, pode promover alterações nas suas respostas, de modo a não mimetizar as reais capacidades reativas que estas células apresentam no microambiente circulatório específico determinado pelas alterações metabólicas decorrentes do diabetes. O fato destas células serem cultivadas por um determinado período, como 24 horas, em um meio de cultura sem as alterações metabólicas encontradas *in vivo* decorrentes do diabetes, pode promover alterações nas suas características primárias, devido à sua adaptação a um novo meio extracelular, interferindo na sua potencialidade de produzirem mediadores. A detecção de RNAm por PCR em tempo real tem sido o método de escolha para investigar perfis de produção de citocinas por parte de células imunológicas e em sítios de infiltração inflamatória, pelo fato de as amostras de tecido, células e flúidos orgânicos, bem como a quantidade de citocinas nas mesmas, serem frequentemente muito pequenas para permitirem a quantificação de citocinas à nível protéico (Giulietti *et al.*, 2001). A técnica de PCR em tempo real permite a quantificação dos produtos da PCR em “tempo real”, durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em um único passo, sendo mais sensível, precisa e rápida do que as outras técnicas de RT-PCR. Nesta técnica, uma sonda, desenhada para hibridizar o produto alvo da PCR, é marcada com um fluoróforo e outra molécula capaz de absorver a fluorescência (quencher). Durante a amplificação, através da sua ação de exonuclease 5'-3', a Taq polimerase digere as sondas, separando o fluoróforo da molécula capturadora desta energia, resultando no acúmulo da intensidade da fluorescência à medida do acúmulo dos produtos da PCR (Giulietti *et al.*, 2001).

Dessa forma, analisando-se as expressões relativas dos genes do TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6, pelas células basais, apesar de o controle metabólico não ter influenciado a expressão gênica das respectivas citocinas, não sendo verificadas diferenças significativas

em tais expressões no grupo controle, observou-se neste grupo um padrão de manutenção ou discreta diminuição da expressão gênica com a obtenção do controle metabólico, ao passo que no grupo teste, verificou-se um padrão de aumento nos níveis de RNAm destas citocinas após a primeira intervenção clínica, de modo que o gene da IL-8 apresentou uma expressão relativa significativa 2 vezes maior e os genes da IL-1 β e IL-6 apresentaram tendências de aumentos de 2 vezes nas expressões relativas das mesmas, após o controle metabólico. Além disso, à medida que foi verificada uma ausência de diferença significativa na expressão relativa destes mesmos genes entre os grupos teste e controle após a internação hospitalar, observou-se que esta condição, deveu-se, sobretudo, ao aumento significativo das expressões relativas dos genes estudados, promovido pelo controle metabólico no grupo teste, do que à modulação negativa não significativa desta intervenção clínica na expressão gênica do grupo controle. Corroborando para esta hipótese, tem-se ainda o fato de que os genes IL-1 β , IL-8 e IL-6 encontraram-se significativamente hipoexpressos respectivamente 4, 3 e 11 vezes e o gene TNF- α com uma tendência de hipoexpressão de 2 vezes mais no grupo teste em relação ao controle antes da instituição do controle metabólico.

Apesar de nas células basais, não estimuladas, ter sido evidenciado que as diferenças comportamentais apresentadas entre as células do grupo controle e do grupo teste se deveram mais à influência do controle metabólico no aumento do potencial de reatividade imunoinflamatória do grupo teste, enquanto nas células estimuladas por LPS, ter sido demonstrado que tais diferenças comportamentais tenham sido mais decorrentes da influência do controle metabólico na modulação através da diminuição da resposta imunoinflamatória do grupo controle, o padrão comportamental do grupo controle manteve-se diferente do grupo teste, obedecendo-se uma única tendência perante o controle metabólico. Sugere-se, então, que esta diferença está associada à ativação antigênica e inflamatória mediada pela infecção periodontal das células imune combinada à influência da alteração metabólica insulínica obtida com o tratamento na resposta inflamatória destes indivíduos, de modo que no grupo controle houve uma tendência de diminuição do potencial imunoinflamatório, ocorrendo o inverso no grupo teste, demonstrando uma tendência de aumento na sua capacidade reativa imunoinflamatória.

As diferenças entre os resultados obtidos das células não-estimuladas em relação aos das células estimuladas por LPS, podem ser justificadas pela influência de alguns mecanismos epigenéticos na transcrição gênica induzida pelo LPS, como o mecanismo de tolerância induzido pelo LPS associado à cromatina (Foster *et al.*, 2007). Por este, apesar de os macrófagos responderem ao estímulo do LPS, estes se tornam hiporresponsivos diante de uma estimulação subsequente por este mesmo estímulo. Parece que duas formas distintas de modificações na cromatina ocorrem durante este estado hiporresponsivo: enquanto um grupo de genes responsáveis pela produção de moléculas inflamatórias (TNF- α , IL-6) é silenciado transitoriamente (genes tolerizados), prevenindo um excessivo dano inflamatório, outro grupo de genes com efeitos antimicrobianos se mantêm ativados (genes não tolerizados), mantendo a proteção contra infecção. Este estado de tolerância é regulado por várias modificações de histonas associadas a estes dois grupos funcionais de genes (Foster *et al.*, 2007). Assim, estes mecanismos podem ter contribuído para a não evidenciação de diferenças na expressão gênica das citocinas próinflamatórias nas células estimuladas entre ambos os grupos frente ao controle metabólico, como também para melhor evidenciação dos resultados de controle da resposta inflamatória nas células estimuladas, como foi evidenciado no grupo controle. Por outro lado, nas células basais, a ausência do estímulo subsequente do LPS e de seu mecanismo de tolerância, permitiu melhor visualização do aumento da reatividade próinflamatória, como foi evidenciado no grupo teste. Além disso, é plausível que possa existir uma diferença neste mecanismo de tolerância entre as células do grupo controle e teste, de modo que este último possa apresentar uma deficiência neste mecanismo, devido à exposição crônica à ativação inflamatória e antigênica relacionada à infecção periodontal e/ou aos danos inflamatórios referentes a um estágio mais avançado de comprometimento do estado diabético, refletindo um desgaste imunológico gerado pela cronicidade das doenças.

O tratamento periodontal, por sua vez, reduzindo a infecção e inflamação periodontal, pode ajudar a restaurar a sensibilidade insulínica, resultando em uma melhora do controle metabólico em pacientes com diabetes tipo 2 (Mealey & Oates, 2006; Mealey & Rose, 2008). Esta hipótese tem sido suportada por estudos intervencionistas, cujos resultados vêm demonstrando diminuição dos níveis séricos dos mediadores inflamatórios e

melhora do controle metabólico após a terapia periodontal (Iwamoto *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2003; Lalla, *et al.*, 2007; O'Connell *et al.*, 2008). Assim, na segunda fase do estudo, relacionada à segunda intervenção clínica, à qual foram submetidos apenas os pacientes diabéticos com periodontite crônica severa, os parâmetros clínicos periodontais, a reatividade próinflamatória das células mononucleares aderentes provenientes do sangue periférico, como também os parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados ao controle metabólico, foram avaliados, respectivamente, 3 meses após o tratamento periodontal em relação ao “baseline”, 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal em relação ao momento antes da internação hospitalar e ao momento após a obtenção do controle metabólico, e 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal em relação ao momento antes da internação hospitalar e ao momento após a obtenção do controle metabólico.

Considerando que os pacientes com diabetes apresentam uma maior susceptibilidade a infecções associada às alterações imunocelulares, vasculares, e de reparação tecidual evidenciadas frente ao desafio hiperglicêmico crônico, a terapia periodontal mecânica em estágio único (desinfecção em estágio único) dentro de 24 a 36 horas foi adotada a fim de reduzir o risco a reinfecções de sítios periodontais tratados (Quirynen *et al.*, 1999; Quirynen *et al.*, 2000) bem como reduzir o trauma e o edema responsáveis pela manutenção contínua de elevados níveis de citocinas próinflamatórias (O'Connell *et al.*, 2008). Além disso, foi optado pela utilização de antibioticoterapia adjunta à terapia mecânica, uma vez que apresenta vantagens como: promove alcance dos microrganismos por via sérica, sobretudo daqueles presentes em áreas de difícil acesso ao debridamento mecânico como, na base de bolsas periodontais profundas e regiões de bifurcação, além de atingir os organismos residentes nos tecidos epiteliais e conjuntivos gengivais; promove erradicação de periodontopatógenos colonizadores da mucosa oral e de outros sítios intra e extra-orais, como também de patógenos orais exógenos, reduzindo o risco de reinfecção subgengival em indivíduos com falha em suas defesas, como é o caso dos indivíduos diabéticos (Slots J, 2002). Além disso, na meta-análise proposta por Janket *et al.* (2005), observou-se que foram alcançados melhores resultados na redução da HbA1c de indivíduos diabéticos tipo 2, mesmo não significativamente, com o emprego de

antibióticos como terapias adjuntas à terapia mecânica no tratamento das doenças periodontais.

Diante do fato de os pacientes diabéticos apresentarem maior susceptibilidade e maior severidade de infecções periodontais, com alterações na sua reposta imunocelular e inflamatória, além de haver pequenas diferenças na microbiota subgengival entre indivíduos não-diabéticos e diabéticos (Sbordone *et al.*, 1998), optou-se por utilizar a associação de dois antimicrobianos bactericidas, a amoxicilina (500 mg 3xd) e o metronidazol (400 mg 3xd) por 10 dias, na medida em que tem sido evidente o sucesso desta combinação sinérgica na melhoria dos parâmetros clínicos periodontais, especialmente em relação a maior e mais prolongada eliminação de sítios mais profundos, diminuindo a necessidade de intervenções futuras, como também na eliminação do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) associado às periodontites agressivas e da *Porphyromonas gingivallis* (P.g.) e mesmo do A.a. associados às periodontites crônicas severas (Winkel *et al.*, 2001; Slots J, 2002; Guerrero *et al.*, 2005; Cionca *et al.*, 2009). Estes antibióticos, apresentando largo espectro de ação (Gram+/- e anaeróbios estritos) e boa penetração no fluido gengival, parecem ser boas alternativas para o tratamento destas patologias. Além disso, parece ser o sinergismo entre a amoxicilina, o metronidazol e o seu hidróxi-metabólito, resultante da sua metabolização oxidativa no fígado, eficiente contra as cepas mais virulentas do A.a., visto que este microrganismo apresenta uma susceptibilidade variável ao metronidazol (algumas cepas são produtoras de nitroreduzases), e frequentemente resistente às penicilinas, utilizados isoladamente (Slots J, 2002).

O tratamento periodontal não-cirúrgico em estágio único associado a antibioticoterapia sistêmica em pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica severa, resultou em melhora significativa em quase todos os parâmetros clínicos periodontais avaliados 3 meses após o mesmo em relação à medidas registradas no “baseline”, indicando uma redução na atividade infecciosa e inflamatória local, o que foi corroborado por outros estudos (Rodrigues *et al.*, 2003; Lalla *et al.*, 2007; O’Connell *et al.*, 2008). Vale ressaltar que este tratamento foi instituído dentro de um período de até 1 mês após a obtenção do controle metabólico com a internação hospitalar para reduzir o risco de retorno ao controle metabólico inadequado, o que pode mascarar ou diluir o efeito do tratamento periodontal

sobre o estado metabólico destes pacientes. Houve reduções significativas nas porcentagens de sítios com placa e SS aproximadamente de 25,5% e de 30% após 3 meses do tratamento periodontal, comparando-se aos níveis registrados no “baseline”. Estes resultados foram menos favoráveis em relação, sobretudo ao SS, do que os evidenciados por Rodrigues *et al.* (2003) que verificaram reduções significativas de 19% no biofilme e de 61% no SS no grupo de pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica submetido à desinfecção em estágio único associada a 875 mg de amoxicilina + ácido clavulânico 2 vezes ao dia por 2 semanas, e em relação a O’Connell *et al.* (2008) que demonstraram reduções de 32,7% no biofilme e de 80% no SS no grupo de pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica submetido a desinfecção em estágio único associada à doxiciclina sistêmica, 100mg/d, por 14 dias, 3 meses após os respectivos tratamentos. A menor redução de SS, vista no presente estudo, pode ter sido devido não só às diferenças nas terapias antibióticas, visto que a doxiciclina apresenta associado a um efeito antimicrobiano, um efeito anti-inflamatório sendo inibidor de metaloproteinases (Sorsa *et al.*, 1992), mas também à ausência de terapia de suporte constituída por instrução de higiene oral e profilaxia, instituída nestes estudos 2 vezes ao mês, durante os 3 meses de avaliação. Em relação a Lalla *et al.* (2007) que, apesar de não ter evidenciado redução significativa na porcentagem de sítios com placa, evidenciou uma redução de 50% na porcentagem de sítios com SS após 4 semanas da terapia periodontal mecânica realizada em 2 sessões dentro de um período de 2 semanas associada a utilização de digluconato de clorexidina a 0,12% 2xd durante este período, os resultados do presente estudo foram superiores no controle do biofilme porém inferiores no controle do SS, justificando-se não só pelas diferenças de terapias mas pelo tempo de avaliação mais longo e sem terapia de suporte do presente estudo.

No presente estudo, verificou-se uma redução de PS significativa de 1,0mm, sendo maior ou igual àquelas evidenciadas por Rodrigues *et al.* (2003) (0,8mm), O’Connell *et al.* (2008) (1,1mm) e Lalla *et al.* (2007) (0,4mm), enquanto um ganho de inserção clínico não significativo de 0,4mm, menor do que àqueles evidenciados por O’Connell *et al.* (2008) (0,9mm) e Lalla *et al.* (2007) (0,7mm). Rodrigues *et al.* (2003) não evidenciou diferença no NIC durante o período de avaliação de 3 meses do seu estudo. Comparando-se a Lalla *et al.* (2007), que evidenciou uma redução significativa de aproximadamente 50%

na porcentagem e número de sítios com PS \geq 5mm e na porcentagem e número de sítios com perda de inserção \geq 5mm, no presente estudo verificaram-se reduções significativas de 62% na porcentagem de sítios com PS \geq 5mm e de aproximadamente 10% na porcentagem de sítios com NIC \geq 5mm. As diferenças em relação, sobretudo ao menor ganho de inserção clínico como também à dificuldade de controle do sangramento, estão relacionadas com fato de, no presente estudo, a amostra ter apresentado maior severidade (média de PS inicial, presente estudo: $4,18 \pm 1,06$; Rodrigues *et al.* (2003): $2,7 \pm 0,7$ mm; O'Connell *et al.* (2008): $3,0 \pm 0,5$ mm; Lalla *et al.* (2007): $3,5 \pm 0,5$ mm) como também extensão de doença periodontal (número de sítios com PS \geq 5mm, presente estudo: $55,60 \pm 37,79$; O'Connell *et al.* (2008): $29,2 \pm 13,9$; Lalla *et al.* (2007): $36,2 \pm 26,2$) em relação aos demais estudos. Assim, a terapia mecânica em estágio único associada à antibioticoterapia com amoxicilina e metronidazol mostrou-se efetiva em reduzir a infecção e o processo imunoinflamatório periodontal nos pacientes diabéticos tipo 2.

Esta redução inflamatória e infecciosa local, diminuindo as fontes de uma sobrecarga antigênica e de mediadores inflamatórios, apresentam efeitos sistêmicos, demonstrados por estudos através da diminuição sérica de mediadores inflamatórios (Iwamoto *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2003; Lalla, *et al.*, 2007; O'Connell *et al.*, 2008). Estas evidências foram corroboradas por este trabalho, na medida em que, pela técnica do ELISA, em relação à quantificação das citocinas nos sobrenadantes das células mononucleares aderentes estimuladas 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal, foi observado ser este o maior responsável pela redução no potencial próinflamatório destas células circulantes nos indivíduos diabéticos tipo 2 com periodontite crônica severa, visto que, apesar de ter havido uma discreta diminuição não significativa da secreção das citocinas estudadas em relação aos níveis quantificados antes da internação hospitalar, houve uma diminuição significativa da secreção do TNF- α , além de tendências de redução da IL-1 β e IL-8 e discreta diminuição da IL-6 em relação aos níveis quantificados após a obtenção do controle metabólico. Além disso, diante do comportamento diferenciado do grupo teste frente às duas intervenções clínicas no presente estudo, demonstrou-se o papel modulador da periodontite crônica severa na resposta imunológica dos pacientes diabéticos

tipo 2 e que o tratamento desta infecção local pode exercer efeitos sistêmicos, por exemplo, diminuindo o potencial próinflamatório das células mononucleares circulantes, contribuindo para a melhor sensibilidade insulínica e facilitando o controle metabólico destes indivíduos. Assim, enquanto o grupo teste demonstrou um padrão de aumento ou manutenção da capacidade reativa próinflamatória das suas células mononucleares frente ao controle metabólico, sugerindo ser a infecção periodontal crônica severa não-tratada um fator de manutenção ou ativação da reatividade imunológica sobrepujando o efeito modulador desta primeira intervenção clínica, foi observado um padrão de redução do potencial próinflamatório das células mononucleares circulantes frente ao tratamento periodontal, sugerindo a capacidade anti-inflamatória sistêmica desta terapia e a necessidade da mesma como terapia adjunta para se alcançar um controle metabólico mais eficiente nos indivíduos diabéticos tipo 2.

Corroborando com estes resultados, Lalla *et al.* (2007) demonstraram uma redução significativa de 47% na porcentagem de monócitos CD14⁺ de 78% na porcentagem de macrófagos produtores de TNF- α , sem estímulo, apesar de não ter havido diferença na porcentagem destas células quando estimuladas, comprando-se antes e 4 semanas após o tratamento periodontal. Este estudo também verificou o possível efeito modulador do tratamento periodontal sobre o potencial próinflamatório das células mononucleares, porém este efeito foi mais evidenciado nas células sem estímulo do que naquelas estimuladas por LPS, diferentemente do presente estudo, em que este efeito foi mais pronunciado nas células estimuladas. As comparações entre ambos os estudos guardam limitações, na medida em que este apresentou utilizou uma metodologia celular-molecular e protocolo de tratamento periodontal diferentes, não incluindo terapia antibiótica adjunta, além de ter envolvido indivíduos com ambos os tipos de diabetes, com grande variação de duração de doença e nível de controle metabólico, incluindo ainda fumantes. Devido à ausência de evidência anterior ao estudo de Lalla *et al.* (2007) acerca do tempo necessário para se evidenciar o efeito anti-inflamatório sistêmico do tratamento periodontal em pacientes diabéticos, estes autores optaram pelo tempo de avaliação de 4 semanas após o tratamento pelo fato de, apesar de ser um período curto para a avaliação da reparação tecidual periodontal, um período mais longo poderia promover a reinfecção de sítios periodontais

e/ou diluição do efeito sistêmico da terapia periodontal. No presente estudo, optou-se pelo período de 4 a 6 semanas pelas mesmas razões apontadas previamente associada ao fato deste período promover um menor risco para a a recidiva do descontrole metabólico após a internação hospitalar, já que esta última análise imunocelular foi realizada aproximadamente 8 a 10 semanas após esta intervenção clínica. A extensão para 6 semanas deveu-se à necessidade de adaptação do protocolo experimental às várias atividades realizadas concomitantemente durante o presente estudo, bem como às necessidades individuais dos pacientes.

Pela técnica do PCR em tempo real, os resultados deste estudo que avaliaram a influência do tratamento periodontal na resposta imunológica sistêmica de indivíduos diabéticos tipo 2 com periodontite crônica severa, através da análise da expressão relativa dos genes correspondentes às citocinas próinflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células mononucleares aderentes de sangue periférico destes indivíduos, são inéditos. Assim, apesar da ausência de diferenças significativas entre as expressões relativas dos genes estudados pelas células mononucleares aderentes estimuladas, comparando-se os resultados obtidos 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal em relação àqueles obtidos antes da internação, bem como em relação àqueles obtidos após a obtenção do controle metabólico, observou-se um padrão de manutenção ou discreta diminuição da expressão gênica correspondente às citocinas TNF- α , IL-8 e IL-6 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal em relação ao momento anterior à internação hospitalar associada a uma discreta diminuição da expressão relativa referente a estas mesmas citocinas em relação ao momento após o controle metabólico. Traçando-se um paralelo entre os resultados obtidos com o ELISA e aqueles obtidos com o PCR em tempo real para as células estimuladas, levando-se em consideração as devidas limitações para tal comparação, observou-se uma correspondência no comportamento celular dos indivíduos diabéticos tipo 2 com periodontite crônica severa frente ao tratamento periodontal, avaliada por ambas as técnicas, de modo a corroborar com a capacidade desta terapia de, reduzindo o potencial próinflamatório dos monócitos circulantes, contribuir para a redução do estado inflamatório característico do diabetes tipo 2, auxiliando no aumento à sensibilidade à insulina e na restauração de um adequado controle metabólico.

Em relação à influência do tratamento periodontal na expressão relativa dos genes estudados correspondentes às citocinas próinflamatórias analisadas nas células mononucleares não estimuladas (basais), verificou-se um comportamento celular distinto ao das células estimuladas, na medida em que, somando-se os efeitos do controle metabólico e do tratamento periodontal, demonstrou-se uma hiperexpressão significativa dos genes IL-1 β e IL-6 de 6 e 5 vezes respectivamente 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal em relação ao momento antes da internação, não havendo diferenças significativas nas expressões dos genes TNF- α e IL-8. Já em relação ao efeito do tratamento periodontal, apesar de não terem sido evidenciadas diferenças nas expressões relativas dos genes estudados, observou-se um padrão de aumento nos níveis de RNAm de IL-1 β e IL-6 4 a 6 semanas após o tratamento periodontal em relação ao momento após o controle metabólico. Diante desses resultados, sugere-se que a tendência de aumento na capacidade reativa imunoinflamatória, já demonstrada pelo grupo teste frente ao controle metabólico, perpetuou-se frente ao tratamento periodontal em relação às citocinas IL-1 β e IL-6, nas células não estimuladas. Na medida em que, como já foi discutido, o modelo das células basais parece ser mais adequado para se avaliar a capacidade reativa imunológica das mesmas, é plausível que o tratamento da infecção periodontal, reduzindo localmente a fonte de carga antigênica e de mediadores inflamatórios que contribuem para a ativação imunológica inata sistêmica, tenha promovido uma melhora adjunta ao controle metabólico na sensibilidade insulínica destes indivíduos do grupo teste, contribuindo para o aumento da sua capacidade de produção insulínica e para o alcance do seu estado normoinsulínico, o que refletiu na sua maior reatividade imunoinflamatória. Ao passo que, como o modelo das células estimuladas parece ser mais adequado para se avaliar a capacidade de controle da resposta inflamatória celular frente a estímulos inflamatórios, o efeito de redução do potencial próinflamatório das células mononucleares estimuladas promovido pelo tratamento periodontal, mais evidenciado pelo ELISA, pode também estar associado ao fato desta terapia ter melhorado a efetividade dos mecanismos de tolerância das células do grupo teste frente a estímulos agressores como o LPS, devido à eliminação da ativação inflamatória e antigênica relacionada à infecção periodontal, auxiliando os efeitos benéficos imunológicos do controle metabólico.

Diante deste efeito modulador inflamatório sistêmico, auxiliando na restauração da sensibilidade insulínica dos pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica severa, a hipótese de que o controle metabólico pode ser melhorado por um tratamento periodontal efetivo associado a terapia antibiótica adjunta (Iwamoto *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2008) foi confirmada pelo presente estudo. Somando-se o efeito do tratamento periodontal ao do controle metabólico obtido com a internação hospitalar sobre as variáveis clínicas e laboratoriais metabólicas analisadas, comparando-se os valores obtidos antes do controle metabólico com aqueles obtidos 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal, verificaram-se reduções significativas na glicemia em jejum e na HbA1c, os quais alcançaram limiares mais recomendáveis para a manutenção de um adequado controle glicêmico em indivíduos diabéticos (American Diabetes Association, 2009). Não foram verificadas, porém, diferenças significativas nas demais variáveis, tais como, peso, IMC, colesterol total, triglicérides, HDL e LDL. Como os pacientes com periodontite crônica severa não apresentavam perfis hiperlipêmicos antes da internação, apesar de apresentarem sobrepeso, estes resultados comprovam a obtenção de um bom controle metabólico, sobretudo indicando a manutenção de uma dieta adequada, mesmo após o término da internação. A manutenção do adequado controle metabólico, tanto lipídico como glicêmico, observada neste estudo, refletindo um controle dietético mesmo após o término da internação, é de extrema importância para a evidência do real efeito do tratamento periodontal no controle metabólico, visto que alterações dietéticas (ingestão em excesso de nutrientes calóricos e gordurosos), resultando em altas concentrações de ácidos graxos livres e glicose circulantes, ativam mecanismos de resistência insulínica como os eixos IKK β /NF- κ B e JNK, contribuindo para o estado inflamatório característico do diabetes tipo 2 (Shoelson *et al.*, 2006; Fernandez-Real & Pickup, 2007), podendo, então, mascarar ou diluir o efeito modelador inflamatório do tratamento periodontal.

Observando-se apenas o efeito do tratamento periodontal sobre a HbA1c, comparando-se os resultados obtidos após a internação com aqueles obtidos 3 a 6 semanas após o tratamento, verificou-se uma redução adicional e significativa de 1,6% em relação à redução também significativa de 1,1% obtida com o controle metabólico, evidenciando-se um efeito benéfico e adicional alcançado pelo tratamento periodontal associado à terapia

antibiótica sistêmica no controle metabólico dos indivíduos diabéticos tipo 2, no presente estudo. Estes resultados foram corroborados por O'Connell *et al.* (2008), que evidenciaram uma redução significativa de 1,5% na HbA1c, avaliada 3 meses após a terapia em estágio único associada a doxiciclina sistêmica. Rodrigues *et al.* (2003), por sua vez verificaram uma redução não significativa de 0,3% na HbA1c, avaliada 3 meses após a terapia em estágio único associada a amoxiciclina + ácido clavulânico, verificando, por outro lado uma redução significativa de 1,2% na HbA1c quando instituída apenas a terapia mecânica em estágio único. Apesar destes estudos terem demonstrado uma influência positiva do tratamento periodontal associado à terapia antibiótica no controle metabólico de pacientes diabéticos tipo 2, eles diferiram do presente estudo não só em relação às terapias antibióticas, sugerindo-se ser a menos efetiva a associação de amoxiciclina + ácido clavulânico, como também em relação ao período de reavaliação da HbA1c. No presente estudo, sabendo-se que a HbA1c mede os níveis de hemoglobina glicada, estimando a média dos níveis glicêmicos sanguíneos dos últimos 30 a 90 dias, mais indicada de ser registrada a cada 2 ou 3 meses (Mealey & Oates, 2006) como foi realizado nos estudos previamente analisados, o período real de reavaliação da HbA1c foi de 7 a 10 semanas, visto que as comparações foram feitas entre os resultados obtidos no último dia de internação com aqueles obtidos 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal, sendo este realizado dentro de um período máximo de 1 mês após a internação. Além disso, diferentemente dos demais estudos, nos quais não houve nenhum controle ou monitoramento de outras variáveis metabólicas, no presente estudo, além de terem sido avaliadas variáveis lipídicas, o tratamento periodontal foi propositadamente feito logo após a adequação do controle metabólico, para se evitar ao máximo a interferência de alterações dietéticas, evidenciando-se com mais precisão a real influência do tratamento periodontal no controle metabólico.

Por outro lado, outros estudos verificaram que, após 3 e 4 meses respectivamente, a terapia periodontal não-cirúrgica convencional associada à utilização sistêmica de doxiciclina 100mg/d por 14 dias não foi capaz de promover reduções significativas nos níveis de HbA1c de indivíduos diabéticos tipo 2 com periodontite crônica (redução de 0.2% 3 meses após o tratamento periodontal) / (redução de 0.7% 4 meses após

o tratamento periodontal) (respectivamente Promsudthi *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007). A concordância destes estudos com os resultados da meta-análise proposta por Janket *et al.* (2005) demonstra como os resultados acerca da influência da terapia periodontal no controle metabólico, mesmo com terapia antibiótica adjunta, são controversos, devido a inúmeros fatores de diferenças metodológicas tais como: nível inicial de controle metabólico da amostra (alterações na HbA1c são mais evidentes em pacientes mais pobremente controlados); variabilidade de critérios de diagnóstico de doença periodontal, sendo as amostras compostas com vários níveis de severidade de doença, subestimando o efeito da infecção periodontal; incorporação de fatores de confundimento como pacientes fumantes nas amostras; variabilidade de aderência dos pacientes ao tratamento antibiótico; os quais foram cuidadosamente observados no presente estudo. O fato da magnitude das reduções nos níveis de HbA1c não terem sido estatisticamente significativas na meta-análise não pode sobrepujar a relevância clínica de uma redução de 0,7% encontrada, que no presente estudo foi de 1,6%, atribuída ao tratamento periodontal associado à terapia antibiótica em indivíduos diabéticos tipo 2, desde que a classe menos potente de antidiabético oral, os inibidores da α -glicosidade, reduz a HbA1c em uma magnitude de 0.5 a 1% (Powers, 2006). Outras classes de antidiabéticos orais, como os secretagogos de insulina, as biguanidas, as tiazolidinedionas e a terapia nutricional associada à atividade física, apresentam um maior potencial de redução da HbA1c, reduzindo-a em 1 a 2% (Powers, 2006). De acordo com os estudos dos grupos DCCT research group, (1993) e UKPDS group, (1998), a cada redução de 1% na HbA1c corresponde a uma redução de 35% nas complicações microvasculares, de modo que reduções a partir de 0,5% já configuram em menores riscos de desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes. Além disso, ainda segundo estes estudos, regimes de tratamento que reduzam a HbA1c a uma média em torno de 7,0%, ou mesmo até 1% acima desta média considerada como referência para um adequado controle metabólico, estão associados à ocorrência de menores complicações microvasculares crônicas. Assim, desde que o tratamento periodontal apresenta o mesmo poder de redução da HbA1c em relação a outras terapias antidiabéticas, tendo demonstrado no presente estudo um potencial ainda superior de redução desta variável (1,6%) contribuindo para o alcance de níveis mais adequados de

controle metabólico, entre 7 e 8% (7,8%), este deve ser indicado como uma terapia alternativa e adjunta na promoção de uma melhor sensibilidade insulínica bem como no alcance de um melhor controle metabólico em pacientes diabéticos tipo 2 portadores de periodontite crônica.

Em relação ao efeito do tratamento periodontal sobre outras variáveis metabólicas analisadas no presente estudo, comparando-se os valores obtidos após a internação com aqueles obtidos 3 a 6 semanas após o tratamento periodontal, não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de glicemia em jejum, porém esta se manteve dentro dos valores adequados para um controle glicêmico eficiente para pacientes diabéticos (American Diabetes Association, 2009). Ao mesmo tempo, houve uma tendência de aumento no colesterol total e aumentos significativos no HDL e LDL, alterações estas compatíveis com valores considerados adequados para a manutenção de um bom controle metabólico em pacientes diabéticos (American Diabetes Association, 2009). Nos estudos de Rodrigues *et al.* (2003) bem como no de O'Connell *et al.* (2008), também não foram evidenciadas diferenças significativas nos níveis de glicemia em jejum, porém estes mantiveram-se elevados 3 meses após os tratamentos periodontais instituídos, sendo respectivamente 210 ± 64 mg/dL e $236,6 \pm 95,1$ mg/dL. Na medida em que essas variáveis metabólicas são passíveis de alterações em curto período de tempo, sendo altamente influenciadas por alterações dietéticas, refletindo o estado de controle glicêmico ou lipídico de maneira mais pontual, estas pequenas variações evidenciadas no presente estudo demonstram como o não controle rígido, sobretudo dos fatores dietéticos por parte do paciente, intervindo no controle metabólico, podem mascarar ou diluir o efeito do tratamento periodontal, de modo que períodos de avaliação mais extensos podem não ser adequados para tal avaliação, sendo responsáveis por resultados negativos acerca da influência do tratamento periodontal no controle metabólico.

Em relação à dosagem de proteínas inflamatórias, apesar dos níveis de proteína-C-reativa terem se mantido dentro dos níveis de normalidade para os métodos empregados para sua avaliação no presente estudo, em todos os tempos observacionais como também em ambos os grupos, verificou-se uma diminuição significativa no grupo teste nos seus níveis ($0,53 \pm 0,48$ / $0,33 \pm 0,23$ mg/dL; $p=0,03$), através da ação conjunta do controle

metabólico e do tratamento periodontal. Desde que a proteína-C-reativa representa uma das principais proteínas de fase aguda, sendo considerada fator preditor independente para o diabetes tipo 2 (Hu *et al.*, 2004), como também apresentando níveis significativamente aumentados em indivíduos com periodontite (Loos, 2005), é esperado que o tratamento periodontal, contribuindo para a diminuição do estado inflamatório sistêmico característico do diabetes tipo 2 por meio da redução da infecção e inflamação periodontal, também possa contribuir para uma redução nos níveis séricos deste mediador. Assim, o resultado do presente estudo, corroborado por Lalla *et al.* (2007) que evidenciou uma redução significativa de 37% nos níveis séricos de proteína-C-reativa 4 semanas após o tratamento periodontal convencional de pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica moderada a severa, reforça a hipótese de que o tratamento periodontal, contribuindo para uma redução sistêmica da ativação imunológica inflamatória induzida por citocinas e mediadores inflamatórios, pode auxiliar na restauração da sensibilidade insulínica, contribuindo para um controle metabólico mais adequado nos pacientes diabéticos tipo 2.

Diante das limitações do presente estudo, sobretudo em esclarecer os mecanismos imunomoleculares que norteiam a influência da periodontite crônica, bem como do tratamento periodontal, na resposta imunológica de pacientes diabéticos tipo 2, novos estudos são necessários para a investigação de tais mecanismos, sobretudo acerca da interrelação da periodontite com outros fatores que influenciam esta patologia como a hiperinsulinemia e a obesidade. Diante da pluralidade de comorbidades que os pacientes diabéticos tipo 2 apresentam, tais como obesidade, dislipidemia, hipertensão, sendo em sua maioria caracterizados como portadores de Síndrome Metabólica, estudos futuros devem explorar a interrelação da periodontite com tal síndrome, ressaltando não só a influência da periodontite bem como do tratamento periodontal no controle glicêmico destes indivíduos mas na resistência insulínica, avaliando-se índices de resistência insulínica bem como os seus níveis séricos, uma vez que constitui o fator de interligação entre todas estas comorbidades. Além disso, diante do número reduzido de pacientes analisados, estudos envolvendo amostras maiores são necessários para melhor caracterizar o potencial próinflamatório das células mononucleares circulantes na periodontite associada ao diabetes e em relação a sua resposta ao tratamento periodontal. Vale ressaltar ainda que

este representa o primeiro estudo de dupla intervenção clínica oro-sistêmica efetuado em indivíduos diabéticos tipo 2 portadores de periodontite crônica severa.

7. Conclusões

Assim, demonstrou-se o papel modulador da periodontite crônica severa na resposta imunológica dos pacientes diabéticos tipo 2, refletido pela manutenção do potencial próinflamatório das células mononucleares circulantes mesmo em vigência de um controle metabólico adquirido por internação hospitalar. A periodontite crônica severa pode então representar um fator de ativação ou manutenção da reatividade imunológica, perpetuando o estado sistêmico inflamatório crônico subclínico associado à patogênese do diabetes mellitus tipo 2, constituindo fator de risco ao agravamento da resistência insulínica e piora do controle metabólico nestes pacientes.

Além disso, demonstrou-se que o tratamento periodontal, através da redução da infecção e inflamação local, evidenciada pela melhoria dos parâmetros clínicos periodontais, pode exercer um efeito anti-inflamatório sistêmico, refletido pelo padrão de diminuição do potencial próinflamatório de monócitos circulantes, auxiliando a restaurar a sensibilidade insulínica e facilitando o alcance de um controle metabólico mais adequado em pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite crônica severa, evidenciado por reduções significativas na HbA1c destes pacientes.

Referências *

1. Alexandraki KI, Piperi C, Ziakas PD, Apostolopoulos NV, Makrilakis K, Syriou V, *et al.* Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: Associations with low-grade systemic inflammation. *J Clin Immunol.* 2008; 28: 314-21.
2. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2009. *Diabetes Care.* 2009; 32: S13-S61.
3. Araya AV, Pavez V, Perez C, Gonzalez F, Colombo A, Aguirre A, *et al.* Ex vivo lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE₂ secretion in whole blood from type 1 diabetes mellitus patients with or without aggressive periodontitis. *Eur Cytokine Netw.* 2003; 14(3): 128-33.
4. Armitage GC. Development of a classification System for Periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6.
5. Aso Y, Okumura K, Yoshida N, Tayama K, Kanda T, Kobayashi I, *et al.* Plasma interleukin-6 is associated with coagulation in poorly controlled patients with type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2003; 20: 930-34.
6. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006; 17(1): 4-12.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

7. Bodet C, Chandad F, Grenier D. *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammatory mediator profile in an ex-vivo human whole blood model. Clin Exp Immunol. 2005; 143: 50-57.
8. Carpenter CL, Cantley LC. Essentials of signal transduction. In: Devita VT, Hellman S, Rosemberg SA, editores. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2001.
9. Chacón MR, Vendrell J, Miranda M, Ceperuelo-Mallafré V, Megía A, Gutiérrez C, *et al.* Different TNF- α expression elicited by glucosa in monocytes from type 2 diabetes mellitus patients. Atherosclerosis. 2007; 194: e18-e19.
10. Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombelli A. Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planning of chronic periodontitis. J Periodontol. 2009; 80: 364-71.
11. Collares GB, Vidigal PG. Recomendações para o uso da velocidade de hemossedimentação. Rev Med Minas Gerais. 2004; 14(1): 52-7.
12. Crook M. Type 2 diabetes mellitus: a disease of the innate immune system? An update. Diabet Med. 2004; 21: 203-07.
13. Cutler CW, Machen RL, Jotwani R, Iacopino AM. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetes with hyperlipidemia. J Periodontol. 1999; 70: 1313-21.
14. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, *et al.* Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. J Dent Res. 2004; 83:156-60.

15. DCCT research group - Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 329: 977-86
16. Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1 β and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontol 2000.* 2004; 35: 42-52.
17. Donath MY, Størling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T. Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med.* 2003; 81: 455-70.
18. Ebersole JL, Singer RE, Steffensen B, Filoon T, Kornman KS. Inflammatory mediators and immunoglobulins in GCF from healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J Periodont Res.* 1993; 28:543-46.
19. Ehses JA, Böni-Schnetzler M, Faulenbach M, Donath MY. Macrophages, cytokines and β -cell death in type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36: 340-42.
20. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, *et al.* Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression. *J Periodontol.* 2003; 74:196-201.
21. Elishkevitz K, Fusman R, Koffler M, Shapira I, Zeltser D, Avitzour D, *et al.* Rheological determinants of red blood cell aggregation in diabetic patients in relation to their metabolic control. *Diabet Med.* 2002; 19: 152-56.
22. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991; 62: 123-31.

23. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster JB. GCF IL-1 β profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 48-53.
24. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, *et al.* Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2004; 75: 1203-08.
25. Engebretson S, Chertog R, Nichols A, Hey-Hadavi J, Celenti R, Grbic J. Plasma levels of tumour necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Periodontol.* 2007; 34:18-24.
26. Ervasti T, Knuutila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes mellitus and gingival bleeding. *J Periodontol.* 1985; 56: 154-57.
27. Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Palo CD, Ciotola M, Barbieri M, *et al.* Cytokine Milieu tends toward inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003; 26(5): 1647.
28. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006; 77: 591-98.
29. Fentoglu O, Öz G, Tasdelen P, Uskun E, Aykaç Y, Bozkurt FY. Periodontal status in subjects with hyperlipidemia. *J Periodontol.* 2009; 80: 267-73.
30. Fernández-Real JM, Pickup JC. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19(1): 10-6.
31. Fodega M, Gallart L, Gutiérrez C, Vendrell J, Simón I, García-España A, *et al.* High expression of tumour necrosis factor α receptors in peripheral blood

- mononuclear cells of obese type 2 diabetic women. *Eur Cytokine Netw.* 2004; 15(1): 60-66.
32. Forrester JS. Common ancestors: Chronic Progressive diseases have the same pathogenesis. *Clin Cardiol.* 2004; 27: 186-90.
33. Foss MC, Vlachokosta FV, Conningham LN, Aoki TT. Restoration of glucose homeostasis in insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes.* 1982; 31: 46-52.
34. Foss-Freitas MC, Foss NT, Donadi EA, Foss MC. In vitro TNF- α and IL-6 production by adherent peripheral blood mononuclear cells obtained from type 1 and type 2 diabetic patients evaluated according to metabolic control. *Ann N Y Aca Sci.* 2006; 1079: 177-80.
35. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature.* 2007; 447; 972-78.
36. Frantzis TG, Reeve CM, Brown AL. The ultrastructure of capillary basement membranes in the attached gingiva of diabetic and non-diabetic patients with periodontal disease. *J Periodontol.* 1971; 42: 406-11.
37. Fraser J, Arcus V, Kong P, Baker E, Proft T. Superantigens – powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today.* 2000; 6(3): 125-32.
38. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999; 340: 448-54.
39. Geerlings SE, Hoepelman, AIM. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Fesm Immunol Med Microbiol.* 1999; 26: 259-65.

40. Geerts SO, Nys M, De Mol P, Charpentier J, Albert A, Legrand V, *et al.* Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. *J Periodontol.* 2002; 73: 73-78.
41. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004; 35: 21-41.
42. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol.* 2005; 76: 2075-84.
43. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallone B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001; 25: 386-401.
44. Giulietti A, Stoffels K, Decallone B, Overbergh L, Mathieu C. Monocytic expression behavior of cytokines in diabetic patients upon inflammatory stimulation. *Ann Y Acad Sci.* 2004; 1037; 74-78.
45. Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ works as anti-inflammatory. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 77: 47-57.
46. Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30:1046-52.

47. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and Apoptosis-Impact on Periodontal Pathology. *J Dent Res.* 2006; 85(1): 15-21.
48. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008; 79: 1585-91.
49. Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Laurell L, *et al.* Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 1096-1107.
50. Gustafsson A, Ito H, Asman B, Bergström K. Hyper-reactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 126-29.
51. Hatanaka E, Monteagudo PT, Marrocos MSM, Campa A. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2006; 146: 443-47.
52. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld L, Graves D. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology.* 2004; 145: 447-52.
53. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol.* 2006; 144: 35-40.

54. Honig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F. Increased interleukin-1 β (IL-1 β) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 1989; 24: 362-67.
55. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259: 87-91.
56. Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE. Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes.* 2004; 53: 693-700.
57. Hujoel PP, White BA, Garcia RI, Listgarten MA. The dentogingival epithelial surface area revisited. *J Periodontal Res.* 2001; 36: 48-55.
58. Hutter JW, Van der Veden U, Varoufaki A, Huffels RAM, Hoek FJ, Loos BG. Lower numbers of erythrocytes and lower levels of hemoglobin in periodontitis patients compared to control subjects. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 930-36.
59. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, *et al.* The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2001; 72: 774-78.
60. Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res.* 2005; 84: 1154-59.
61. Jansson H, Lindholm E, Lindh C, Groop L, Bratthall G. Type 2 diabetes and risk for periodontal disease: a role for dental health awareness. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 408-14.

62. Jones JA, Miller DR, Wehler CJ, Rich SE, Krall-Kaye EA, McCoy LC, *et al.* Does periodontal care improve glycemic control? The department of veterans affairs dental diabetes study. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 46-52.
63. Karima M, Kantarci A, Ohira T, Hasturk H, Jones VL, Nam B-H, *et al.* Enhanced superoxide release and elevated protein Kinase C activity in neutrophil from diabetic patients: association with periodontitis. *J Leukocyte Biol.* 2005; 78: 1-9.
64. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol.* 2008; 79: 1527-34.
65. Kiran M, Arpak N, Ünsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 266-72.
66. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol.* 2008; 79: 1560-68.
67. Kurtis B, Tüter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, *et al.* Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2005; 76: 1849-55.
68. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, *et al.* Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest.* 2000; 105: 1117-124.
69. Lalla E, Kaplan S, Yang J, Roth GA, Papapanou PN, Greenberg S. Effects of periodontal therapy on serum C-reactive protein, sE-selectin and tumor necrosis

- factor-alpha secretion by peripheral blood-derived macrophages in diabetes a pilot study. *J Periodontal Res.* 2007; 42: 274-82.
70. Lalla, E. Periodontal infections and diabetes mellitus: when will the puzzle be complete? *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 913-16.
71. Lechleitner M, Herold M, Dzien-Bischinger C, Hoppichier F, Dzien A. Tumour necrosis factor-alpha plasma levels in elderly patients with type 2 diabetes mellitus – observations over 2 years. *Diabet Med.* 2002; 19: 949-53.
72. Lim LP, Tay FB, Sum CF, Thai AC. Relationship between markers of glycaemic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 118-23.
73. Liu R, Desta T, He H, Graves D. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology.* 2004; 145: 2997-3003.
74. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, Graves DT. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res.* 2006; 85: 510-14.
75. Löe H. The gingival index, the plaque index, and the retention index systems. *J Periodontol.* 1967; 38: 610-16.
76. Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993; 16(Suppl.1): 329-34.
77. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol.* 2000; 71:1528-34.

78. Loos BG. Systemic markers of inflammation in Periodontitis. *J Periodontol.* 2005; 76: 2106-115.
79. López-Bermejo A, Hernández-Aguado I, Vera IJ, Recasens M, Esteve E, Casamitjana R, *et al.* Sex-specific, independent associations of insulin resistance with erythrocyte sedimentation rate in apparently health subjects. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 240-44.
80. Lösche W, Karapetow F, Pohl A, Pohl C, Kocher T. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 537-541.
81. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2003; 144: 346-52.
82. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care.* 1992; 15: 1509-16.
83. Marthur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res.* 1996; 31: 489-95.
84. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1990; 25: 156-63.
85. Mealey BL, Oates TW. Diabetes Mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006; 77: 1289-1303.

86. Mealey BL, Rose LF. Diabetes Mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Curr Opin in Endocrinol Diabetes Obes.* 2008; 15:135-41.
87. Mito N, Hiyoshi T, Hosoda T, Kitada C, Sato K. Effect of obesity and insulin on immunity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56: 347-51.
88. Moore PA, Weyant RJ, Mongelluzo MB, Myers DE, Rossie K, Guggenheimer J, *et al.* Type 1 diabetes mellitus and oral health: assessment of periodontal disease. *J Periodontol.* 1999; 70: 409-417.
89. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I; Numano F. Glucose-dependent interleukin 6 and tumour necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes.* 1996; 45(7): 954-59.
90. Morris AM, Noakes M, Clifton PM. In vitro mononuclear cells production of tumour necrosis factor- α and weight loss. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004; 63: 179-184.
91. Naguib G, Al-Mashat H, Desta T, Graves DT. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. *J Invest Dermatol.* 2004; 123: 87-92.
92. Nassar H, Kantarci A, Van Dyke TE. Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol 2000.* 2007; 43:233-44.
93. Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and

- glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 835-43.
94. Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, Pettitt DJ, Saad MF, Genco RJ, *et al.* Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care.* 1990; 13: 836-40.
95. Nishimura F, Iwamoto Y, Mineshiba J, Shimizu A, Soga Y, Murayama Y. Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor α in a 2-way relationship. *J Periodontol.* 2003; 74: 97-102.
96. Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y. The periodontal host response with diabetes. *Periodontol 2000.* 2007; 43: 245-53.
97. Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol.* 2001; 72: 1221-27.
98. O'Connell PAA, Taba Jr M, Nomizo A, Foss-Freitas MC, Suad FA, Uyemura SA, *et al.* Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol.* 2008; 79: 774-783.
99. Offenbacher S; Barros AP; Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol.* 2008; 79: 1577-84.
100. Oroszko A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1 β , interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21:256-60.
101. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 9-11.

102. Peleg AY, Weeraratna T, McCarthy JS, Davis TME. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007; 23: 3-13.
103. Pereira FO, Frode TS, Medeiros YS. Evaluation of tumour necrosis factor alpha, interleukin-2 soluble receptor, nitric oxide metabolites, and lipids as inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2006; 2006(1): 39062.
104. Pérez C, Gonzalez F, Pavez V, Araya AV, Aguirre A, Cruzat A, *et al.* The -308 polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) gene and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF- α expression in patients with aggressive periodontitis and/or type 1 diabetes mellitus. *Eur Cytokine Netw.* 2004; 15(4): 364-70.
105. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in rela-time RT-PCR. *Nucleic acids Res.* 2001; 29(9): e45.
106. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia.* 1997; 40: 1286-92.
107. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia.* 1998; 41:1241-48.
108. Pickup JC, Hil DP, Path FRC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27: 813-23.
109. Popa C, Netea MG, van Riel PLC, van der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007; 48: 751-62.

110. Powers AC. Diabetes Mellitus. In: Jameson JL, Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, editores. Harrison's Endocrinology derived from Harrison's Principles of Internal Medicine. 16. ed. United States of American: The McGraw-Hill Companies; 2006. p. 283-331.
111. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 β concentration of gingival crevicular fluid. J Periodontol. 1994; 65: 423-28.
112. Preshaw PM, Foster N, Taylor JJ. Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. Periodontol 2000. 2007; 45:138-57.
113. Promsudthi A, Pimapansri S, Deerochanawong C, Kanchanavasita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. Oral Dis. 2005; 11: 293-98.
114. Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bolen C, van Eldere J, van Steenberghe D. One stage full-versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Long-term impact on microbial load. J Periodontol. 1999; 70:646-56.
115. Quirynen M, Mongardini C, De Soete M, Pauwels M, Coucke W, van Eldere J, *et al.* The role of chlorhexidine in the one-stage full mouth disinfection treatment of patients with advanced periodontitis. Long-term clinical and microbiological observations. J Clin Periodontol. 2000; 27: 578-589.
116. Rautela GS, Leidtke, RJ. Automated enzymatic measurement of total cholesterol in serum. Clin Chem. 1978; 24: 875-80.

117. Roach JC, Smith KD, Strobe KL, Nissen SM, Haudenschild CD, Zhou D. Transcription factor expression in lipopolysaccharide-activated peripheral-blood-derived mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(41): 16245-250.
118. Rodrigues DC, Taba Jr M, Novaes Jr AB, Souza SLS, Grisi MFM. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2003; 74: 1361-67.
119. Saito T, Murakami M, Shimazaki Y, Oobayashi K, Matsumoto S, Koga T. Association between alveolar bone loss and elevated serum C-reactive protein in Japanese men. *J Periodontol*. 2003; 74: 1741-46.
120. Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, *et al*. The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: the Hisayama study. *J Dent Res*. 2004; 83: 485-90.
121. Salvi GE, Collins Jg, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, Offenbacher S. Monocyte TNF- α secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1997; 24:8-16.
122. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE₂, IL-1 β , and TNF- α responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol*. 1998; 3: 40-50.
123. Salvi GE, Kandylaki M, Troendle A, Persson GR, Lang NP. Experimental gingivitis in type 1 diabetics. A controlled clinical and microbiological study. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 310-16.

124. Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions. Update on association and risks. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(Suppl.8): 398-409.
125. Sbordone L, Ramaglia L, Barone A, Ciaglia RN, Iacono VJ. Periodontal status and subgingival microbiota of insulin-dependent juvenile diabetics: a 3-year longitudinal study. *J Periodontol.* 1998; 69: 120-128.
126. Schmidt AM, Weidaman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, *et al.* Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: A potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontal Res.* 1996; 31: 508-15.
127. Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res.* 1993; 28: 478-486.
128. Seymour GJ, Taylor JJ. Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004; 35: 9-13.
129. Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes.* 2003; 52: 1256-64.
130. Shimazaki Y, Saito T, Yonemoto K, Kiyohara Y, Iida M, Yamashita, Y. Relationship of metabolic syndrome to periodontal disease in Japanese women: the hisayama Study. *J Dent Res.* 2007; 86: 271-75.
131. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1793-1801.

132. Slots, J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontal Res.* 2002; 37: 389-98.
133. Soop M, Duxbury H, Agwunobi AO, Gibson JM, Hopkins SJ, Childs C, *et al.* Euglycemic hyperinsulinemia augments the cytokine and endocrine responses to endotoxin in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282: E1276-E1285.
134. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Halinen S, Saari H, Kontinen YT, *et al.* Cellular source and tetracycline inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 146-49.
135. Southerland JH, Taylor GW, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes and coronary artery disease. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 130-43
136. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, and others. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes. Results of the prospective population-based european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes.* 2003; 52:812-17.
137. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Probst L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin-1 β in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 548-54.
138. Stegenga ME, van der Crabben SN, Dessing MC, Pater JM, van der Pangaart PS, Vos AF, *et al.* Effect of acute hyperglycaemia and/or hyperinsulinaemia on proinflammatory gene expression, cytokine production and neutrophil function in humans. *Diabet Med.* 2008; 25: 157-64.

139. Talbert J, Elter J, Jared HL, Offenbacher S, Southerland J, Wilder RS. The effect of periodontal therapy on TNF-alpha, IL-6 and glycemic control in type 2 diabetes. *J Dent Hyg.* 2006; 80 (2):1-16.
140. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, *et al.* Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1996; 67: 1085-93.
141. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, *et al.* Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol.* 1998; 69: 76-83.
142. Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004; 35:158-82.
143. Taylor G. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol.* 2001; 6: 99-112.
144. Thorstensson H, Hugoson A. Periodontal disease experience in adult long-duration insulin-dependent diabetes. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 352-58.
145. Tietz NM. *Clinical guide to laboratory tests.* 2. ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co.; 1990. p. 554.
146. Torquato MTCG, Montenegro RM, Viana, LAL, Souza, RADG, Lanna, CMM, Lucas JCB, *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *Sao Paulo Med.* 2003; 121: 224-30.

147. Trivelli LA, Eanney HM, Lai HT. Hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *N Eng J Med.*1971; 284: 353-57.
148. Tsai C-C, Ho Y-P, Chen C-C. Levels of interleukin-1 β and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1995; 66: 852-59.
149. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the U.S. adult population. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002; 30: 182-92.
150. Tsiotra PC, Tsigos C, Yfanti E, Anastasiou E, Vikentiou M, Psarra K *et al.* Visfatin, TNF- α and IL-6 mRNA expression is increased in mononuclear cells from type 2 diabetic women. *Horm Metab Res.* 2007; 39: 758-63.
151. Tuttle HA, Davis-Gorman G, Goldman S, Copeland JG, McDonagh PF. Proinflammatory cytokines are increased in type 2 diabetic women with cardiovascular disease. *J Diabetes Complications.* 2004; 18: 343-51.
152. UK prospective diabetes study (UKPDS) group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-53.
153. Unlu F, Gurdal Guneri P, Hekimgil M, Yesibek B, Boyacioglu H. Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: Comparison of healthy and diabetic patients. *J Periodontol.* 2003; 74: 181-87.
154. Warnick GR, Wood PD. National cholesterol education program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: Executive summary. *Clin Chem.* 1995; 41: 1427-433.

155. Wennström JL, Newman HN, MacNeill SR, Killoy WJ, Griffiths GS, Gillam DG, *et al.* Utilisation of locally delivered doxycycline in non-surgical treatment of chronic periodontitis: a comparative multi-centre trial of 2 treatment approaches. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 753-61.
156. Wild, S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27: 1047-53.
157. Willershausen-Zonnchen B, Lemmen C, Hamm G. Influence of high glucose concentrations on glycosaminoglycan and collagen synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 190-95.
158. Wilson AG. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol.* 2008; 79: 1514-1519.
159. Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, van der Velden U, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 296-305.
160. Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Falkner KL, Dorn JP, Sempos CT. Examination of the relation between periodontal health status and cardiovascular risk factors: serum total high density lipoprotein cholesterol, C-reactive protein, and plasma fibrinogen. *Am J Epidemiol.* 2000; 151: 273-82.
161. Zykova SN, Svartberg J, Seljelid R, Iversen H, Lund A, Svistounov DN, *et al.* Release of TNF- α from in vitro-stimulated monocytes is negatively associated with serum levels of apolipoprotein B in patients with type 2 diabetes. *Scand J Immunol.* 2004; 60: 535-42.

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Discriminação fenotípica da periodontite crônica severa em pacientes diabéticos tipo II através da identificação da secreção de citocinas inflamatórias por monócitos humanos", protocolo nº 050/2005, dos pesquisadores **ROBERTA SANTOS TUNES, FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JUNIOR e GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02/12/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Phenotypic discrimination of chronic severe periodontitis in diabetics type II through the identification of inflammatory cytokines secretion by human monocytes", register number **050/2005**, of **ROBERTA SANTOS TUNES, FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JUNIOR and GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 02/12/2005.



Cíntia Pereira Machado Tabchoury
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP



Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

Anexo 2

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – HC-FMRP



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



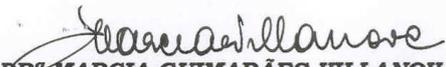
Ribeirão Preto, 25 de abril de 2007

Ofício nº 1348/2007
CEP/MGV

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **“ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE CRÔNICA SEVERA E DO CONTROLE METABÓLICO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS DIABÉTICOS TIPO 2 ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE CITOCINAS EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 245ª Reunião Ordinária realizada em 23/04/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 13130/2006.

Atenciosamente.


DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
ROBERTA SANTOS TUNES
DRª MARIA CRISTINA FOSS-FREITAS (Orientadora)
Depto. de Clínica Médica – Endocrinologia/Metabologia

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Apêndice 1

Caracterização dos pacientes do grupo controle quanto à presença de complicações crônicas.

	Grupo controle				
	CL CR	PROT 24H	GL 24H	FO	ECG
C.N.M.	128	66,5	9,1	NL	NL
A.P.	109,2	55,9	ND	Retinop ñ prolif	NL
M.C.N.A.	103,9	74,5	12,7	Retinop ñ prolif	NL
J.M.S.	99	193,6	9,2	NL	NL
E.S.R.O.	72	1543,5	43,3	NL	NL
E.V.A.S.	90,4	ND	7,2	NL	NL
S.A.R.O.	111,4	167,2	2,0	NL	NL
O.A.M.	105	182,2	203,9	NL	NL
L.A.P.S.T.	ND	ND	ND	NL	NL
L.G.C.O.	95	0,0	4,1	NL	NL
MÉDIA	101,5	285,4	36,4		
DP	15,5	513,0	68,9		

CLCR: clearance de creatinina mL/min/1.73m²; PROT 24H: proteinúria de 24 horas (mg/24h); GL FR: glicosúria fracionada (g/24h); FO: fundo de olho; ECG: eletrocardiograma; NL: normal; ND: não dosado.

Apêndice 2

Caracterização dos pacientes do grupo teste quanto à presença de complicações crônicas.

	Grupo teste				
	CL CR	PROT 24H	GL 24H	FO	ECG
L.H.F.	136	296,9	11,9	NL	NL
I.C.S.	90,2	16,7		NL	NL
J.E.	101	234	24,8	NL	NL
				Retinop ñ	
A.M.S.B.	37	169,4	17,8	prolif	NL
R.L.S.F.	82,2	106,2	8,7	NL	NL
J.C.P.	121,9	0,0	0	NL	NL
S.P.C.S.	93,2	215,6	230,4	NL	NL
G.D.C.	86,7	87,5	1,521	NL	NL
G.S.C.	84,5	172,8	80,5	NL	NL
A.A.M.	124,3	158,4	16,9	NL	NL
MÉDIA	95,7	145,8	46,6		
DP	27,9	94,2	74,1		

CLCR: clearance de creatinina mL/min/1.73m²; PROT 24H: proteinúria de 24 horas (mg/24h); GL FR: glicosúria fracionada (g/24h); FO: fundo de olho; ECG: eletrocardiograma; NL: normal.

Apêndice 3

Média (pg/mL), erro padrão, intervalo de confiança e valores de p para as comparações entre os níveis de TNF- α nos sobrenadantes das células não-estimuladas e estimuladas, levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo.

Grupo	Tempo	Célula	Média (pg/mL)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	p
Amostra total	0	BAS	21,27	6,03	-1434,78 / - 456,81	<0,01*
		LPS	961,62	178,5		
Amostra total	1	BAS	62,82	27,02	-1313,60 / -237,15	0,01*
		LPS	834,52	247,7		
Controle	0	BAS	16,02	6,1	-1529,51 / -312,93	<0,01*
		LPS	973,29	231,1		
Controle	1	BAS	54,71	51,2	-909,18 / 454,19	0,51
		LPS	299,42	85,5		
Teste	0	BAS	27,39	10,8	-1631,17 / -353,20	<0,01*
		LPS	949,96	278,9		
Teste	1	BAS	70,92	28,7	-2069,18 / -686,61	<0,01*
		LPS	1429,06	445,35		
Teste	2	BAS	33,96	16,6	-1758,71 / -108,14	0,03*
		LPS	841,26	229,8		

*Estatisticamente significativo.

Apêndice 4

Média (pg/mL), erro padrão, intervalo de confiança e valores de *p* para as comparações entre os níveis de IL-1 β nos sobrenadantes das células não-estimuladas e estimuladas, levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo.

Grupo	Tempo	Célula	Média (pg/mL)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	<i>p</i>
Amostra Total	0	BAS	67,98	14,1	-2356,86 /	<0,01*
		LPS	1604,62	298,8	- 735,82	
Amostra Total	1	BAS	56,05	18,6	-2260,45/	<0,01*
		LPS	1490,41	480,4	- 670,78	
Controle	0	BAS	83,47	20,58	-2550,67 /	<0,01*
		LPS	1618,99	395,8	-560,23	
Controle	1	BAS	36,52	10,2	-1489,11 /	0,38
		LPS	524,87	114,3	572,48	
Teste	0	BAS	44,74	14,4	-2730,26 /	0,01*
		LPS	1590,25	464,5	-470,66	
Teste	1	BAS	75,59	35,95	-3517,01 /	<0,01*
		LPS	2455,95	864,9	-1455,46	
Teste	2	BAS	22,51	8,4	-2890,46 /	0,01*
		LPS	1589,63	368,3	-485,32	

*Estatisticamente significativo.

Apêndice 5

Média (pg/mL), erro padrão, intervalo de confiança e valores de p para as comparações entre os níveis de IL-8 nos sobrenadantes das células não-estimuladas e estimuladas, levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo.

Grupo	Tempo	Célula	Média (pg/mL)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	p
Amostra Total	0	BAS	699,21	149,1	-12096,00 /	<0,01*
		LPS	8953,32	2109,2	- 4753,55	
Amostra Total	1	BAS	1980,68	981,1	-9499,92 /	0,01*
		LPS	7082,10	1944,4	-1414,73	
Controle	0	BAS	782,18	211,9	-12520,00 /	<0,01
		LPS	8482,17	2717,8	-2879,99	
Controle	1	BAS	437,98	173,2	-8707,52 /	0,24
		LPS	3448,15	884,44	2234,43	
Teste	0	BAS	595,50	207,9	-14509,00 /	<0,01*
		LPS	9424,47	3337,4	-4227,93	
Teste	1	BAS	3523,38	1836,3	-13173,00 /	0,01*
		LPS	10716,04	3415,2	-2243,14	
Teste	2	BAS	1103,91	520,1	-9663,97 /	0,04*
		LPS	5947,88	1880,7	-239,63	

*Estatisticamente significativo.

Apêndice 6

Média (pg/mL), erro padrão, intervalo de confiança e valores de p para as comparações entre os níveis de IL-6 nos sobrenadantes das células não-estimuladas e estimuladas, levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo.

Grupo	Tempo	Célula	Média (pg/mL)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	p
Amostra Total	0	BAS	253,45	68,2	-5390,43 / -	<0,01*
		LPS	4018,10	810,6	2212,11	
Amostra Total	1	BAS	196,85	63,91	-4652,94 / -	<0,01*
		LPS	3174,18	889,2	1441,72	
Controle	0	BAS	271,81	94,3	-5873,91 / -	<0,01*
		LPS	4032,34	1089,6	1730,80	
Controle	1	BAS	85,56	34,16	-3650,22 /	0,13
		LPS	1613,50	550,02	492,88	
Teste	0	BAS	229,84	107,4	-6068,15 / -	<0,01*
		LPS	4003,85	1247,5	1601,38	
Teste	1	BAS	339,94	125,8	-6972,56 / -	<0,01*
		LPS	4908,27	1650,9	2415,94	
Teste	2	BAS	161,95	48,4	-5236,26 / -	<0,01*
		LPS	3311,75	672,3	1094,79	

*Estatisticamente significativo.

Apêndice 7

Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), desvio padrão, valores de p e valores de “fold” para as comparações entre a expressão relativa do gene TNF- α pelas células estimuladas em relação às células não-estimuladas levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo.

Grupo	Tempo	Célula	Média (ΔCt)	Desvio Padrão	Média ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Desvio Padrão	Fold LPS/BAS (p)
Amostra total	0	BAS	3,54	2,06	3,63	5,75	7,45
		LPS	0,76	1,95	28,68	57,90	(<0,01)*
Amostra total	1	BAS	3,00	2,16	2,76	4,21	5,25
		LPS	0,57	2,28	15,91	24,98	(<0,01)*
Controle	0	BAS	2,68	1,94	3,14	4,10	3,50
		LPS	0,34	2,22	23,69	42,71	(<0,01)*
Controle	1	BAS	2,48	2,19	2,91	4,05	6,34
		LPS	0,63	2,84	12,66	16,83	(<0,01)*
Teste	0	BAS	4,39	1,89	1,75	2,18	8,84
		LPS	1,18	1,66	13,25	12,42	(<0,01)*
Teste	1	BAS	3,53	2,11	2,16	2,45	5,41
		LPS	0,51	1,72	20,38	39,40	(<0,01)*
Teste	2	BAS	3,98	1,23	1,56	1,83	10,27
		LPS	0,83	1,04	11,69	7,81	(<0,01)*

*Estatisticamente significativo.

Apêndice 8

Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), desvio padrão, valores de p e valores de “fold” para as comparações entre a expressão relativa do gene IL-1 β pelas células estimuladas em relação às células não-estimuladas levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo.

Grupo	Tempo	Célula	Média (ΔCt)	Desvio padrão	Média ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Desvio Padrão	Fold LPS/BAS (p)
Amostra Total	0	BAS	0,05	2,39	6,67	20,58	39,96
		LPS	-5,17	1,22	60,33	58,97	(<0,01)*
Amostra Total	1	BAS	-0,44	1,91	2,37	2,94	23,82
		LPS	-4,62	1,79	32,14	29,21	(<0,01)*
Controle	0	BAS	-1,31	2,30	13,35	30,42	33,02
		LPS	-5,60	1,21	84,79	78,93	(<0,01)*
Controle	1	BAS	-0,85	1,70	2,43	2,84	22,43
		LPS	-4,44	2,21	29,37	28,89	(<0,01)*
Teste	0	BAS	1,40	1,65	2,10	2,43	77,49
		LPS	-4,73	1,13	107,42	83,36	(<0,01)*
Teste	1	BAS	-0,04	2,10	4,50	6,28	52,95
		LPS	-4,81	1,35	69,38	61,29	(<0,01)*
Teste	2	BAS	-0,91	2,51	2,61	3,90	25,07
		LPS	-5,84	0,78	30,45	16,18	(<0,01)*

*Estatisticamente significativo.

Apêndice 9

Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), desvio padrão, valores de p e valores de “fold” para as comparações entre a expressão relativa do gene IL-8 pelas células estimuladas em relação às células não-estimuladas levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo.

Grupo	Tempo	Célula	Média (ΔCt)	Desvio Padrão	Média ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Desvio Padrão	Fold LPS/BAS (p)
Amostra Total	0	BAS	-0,72	1,93	2,32	3,54	6,79
		LPS	-4,08	1,30	15,38	15,20	(<0,01)*
Amostra Total	1	BAS	-1,19	1,60	1,56	1,82	5,17
		LPS	-3,94	1,94	13,04	19,45	(<0,01)*
Controle	0	BAS	-1,96	1,62	3,03	3,30	4,66
		LPS	-4,24	1,57	14,04	13,46	(<0,01)*
Controle	1	BAS	-1,66	1,01	1,37	1,00	5,36
		LPS	-3,82	2,34	10,13	10,86	(<0,01)*
Teste	0	BAS	0,52	1,34	1,08	0,88	14,71
		LPS	-3,92	1,03	22,33	21,93	(<0,01)*
Teste	1	BAS	-0,73	1,98	2,30	3,56	6,53
		LPS	-4,07	1,56	21,48	37,72	(<0,01)*
Teste	2	BAS	-0,43	1,47	0,94	0,80	7,57
		LPS	-3,85	0,70	7,50	3,39	(<0,01)*

*Estatisticamente significativo.

Apêndice 10

Médias (ΔCt) e ($2^{-\Delta Ct}$), desvio padrão, valores de p e valores de “fold” para as comparações entre a expressão relativa do gene IL-6 pelas células estimuladas em relação às células não-estimuladas levando-se em consideração ou não a divisão dos grupos, bem como em todos os tempos observacionais do estudo.

Grupo	Tempo	Célula	Média (ΔCt)	Desvio Padrão	Média ($2^{-\Delta Ct}$)	Desvio Padrão	Fold LPS/BAS (p)
Amostra Total	0	BAS	9,71	2,75	3,55	8,59	88,90
		LPS	2,66	0,90	120,37	75,71	(<0,01)*
Amostra Total	1	BAS	8,98	2,50	3,55	6,44	83,84
		LPS	2,91	1,88	128,52	156,00	(<0,01)*
Controle	0	BAS	8,53	2,27	2,74	5,53	42,29
		LPS	2,72	0,96	57,82	41,00	(<0,01)*
Controle	1	BAS	8,54	2,78	2,27	3,84	33,31
		LPS	3,18	2,22	53,84	63,47	(<0,01)*
Teste	0	BAS	11,17	2,69	5,73	8,28	501,7
		LPS	2,60	0,89	698,74	406,07	(<0,01)*
Teste	1	BAS	9,48	2,21	5,28	7,89	246,7
		LPS	2,64	1,54	375,10	480,66	(<0,01)*
Teste	2	BAS	9,03	2,88	7,26	15,55	128,05
		LPS	2,42	2,42	142,73	73,09	(<0,01)*

*Estatisticamente significativo.