UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Mestrado em Ciências da Saúde

Jhefferson Miranda Alves

MODULAÇÃO FENOTÍPICA DE SUBTIPOS DE MONÓCITOS NA DOENÇA PERIODONTAL ASSOCIADA AO DIABETES

São Paulo
2022

Jhefferson Miranda Alves

MODULAÇÃO FENOTÍPICA DE SUBTIPOS DE MONÓCITOS NA DOENÇA PERIODONTAL ASSOCIADA AO DIABETES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientador(a): Prof.ª Dra. Carolina Nunes França.
Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Melo Neves

São Paulo
2022

MODULAÇÃO FENOTÍPICA DE SUBTIPOS DE MONÓCITOS NA DOENÇA PERIODONTAL ASSOCIADA AO DIABETES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* emCiências da Saúde da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcialpara obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Data de Aprovação:__/___/____

_____
Profª Dra. Carolina Nunes França.
(Orientador)

_____
Profª Dra. Marina Tiemi Shio
(Banca Interna)

_____
Dr. Jônatas Bussador do Amaral
(Banca Externa)

NOTA:_____

Dedicatória

Ingressar no Mestrado exige renúncias pessoais e familiares. Pela compreensão e motivação, dedico este trabalho a minha mãe Vanderlúcia Miranda, definitivamento a maior incentivadora dos meus sonhos, este trabalho representa um sonho no qual nós dois sonhamos juntos, é pra você mãe, te amo.

Agradecimentos

À Universidade Santo Amaro (UNISA), pela oportunidade e por todo aprendizado dentro desses anos.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Carolina Nunes França. Pelo incentivo e paciência durante todo o percurso. Reflete a imagem de uma profissional espetacular e um exemplo pessoal essencial para minha vida e carreira, obrigadopor toda oportunidade e principalmente sua motivação para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À minha família, por ser um alicerce forte diante de todas as dificuldades sempre me incentivando que sonhar é necessaário e que realizar é possível, gratidão a todos.

As minhas amigas, Natalia Souto e Beatriz Nascimento, que nos momentos de dificuldade seguraram a minha mão e sopraram palavras de incentivos. Obrigado pela convivência, aprendizado, e principalmente por acreditar em mim.

Ao meu namorado Gustavo Schiavi, por várias noites acordado do meu lado segurando a minha mão, me incentivando a continuar mesmo nos momentos de dificuldade, apertou com um abraço, sorriu com os olhos e acreditou que tudo iria ficar bem. Eternamente grato por tudo que você fez e faz!

“O mundo não se divide em pessoas boas e más. Todos temos luz e trevas dentro de nós. O que importa é o lado o qual decidimos agir. Isso é o que realmente somos!”

Harry Potter

RESUMO

Introdução: A doença periodontal é caracterizada por um distúrbio da microbiota presente no ambiente bucal, uma condição inflamatória das estruturas de proteção e inserção dos dentes, ocasionando uma resposta imunológica no individuo, desta forma, afetando os tecidos de proteção e apoio do periodonto, podendo ocasionar a perda dentária, em caso de não ser devidamente tratada e é a forma mais prevalente de doença óssea em humanos. Estudos têm mostrado a relação bidirecional entre diabetes e doença periodontal, visto que vários mecanismos contribuem para maior severidade desta doença em indivíduos com diabetes. Acredita-se que a incapacidade de resolver o meio pró-inflamatório na periodontite desempenhe um papel fundamental na patogênese da doença. Neste contexto, monócitos são os principais componentes celulares da imunidade inata que desempenham papéis importantes na homeostase tecidual. Monócitos são grandes células precursoras originadas da medula óssea, que circulam pelo sangue por alguns dias antes de migrarem para os tecidos e são classificados em clássicos, intermediários e não clássicos, que desempenham várias funções, principalmente na defesa imunológica, homeostase e reparo tecidual. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento Periodontal não cirúrgico em relação à modulação fenotípica dos subtipos de monócitos, na presença ou não de Diabetes. **Métodos:** O estudo incluiu pacientes de ambos os sexos que fizeram acompanhamento na Clínica de Odontologia da Universidade Santo Amaro - UNISA, idade entre 40 e 75 anos, com Doença Periodontal (moderada e avançada) associada ou não ao Diabetes. Foram realizadas visitas clínicas para coleta dos dados como fatores de risco, exame clínico, coletas de amostras de sangue e fluido gengival, no basal e 30 dias após o término do tratamento periodontal não cirúrgico. Os subtipos de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) foram avaliados por citometria de fluxo, com base na expressão de proteínas de superfície celular (CD14 e CD16). **Resultados:** Após comparações entre basal e após 30 dias do término do tratamento periodontal, independente da presença de Diabetes, houve aumento de monócitos não-clássicos após o tratamento e redução de monócitos intermediários, sem diferenças para o subtipo clássico. Análises nos grupos com e sem Diabetes, no basal e 30 dias após o término do tratamento, mostraram redução de monócitos intermediários e aumento de monócitos não clássicos após o tratamento no grupo com Diabetes, sem diferenças para monócitos clássicos. Não houve diferenças significantes para monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos no grupo sem Diabetes. Após comparações entre os grupos, foram encontradas diferenças significantes para monócitos intermediários e não- clássicos no basal, sem diferenças para monócitos clássicos, tais diferenças não foram encontradas após o tratamento. **Conclusão:** Tratamento Periodontal não-cirúrgico, especialmente de indivíduos com Diabetes, modula o fenótipo dos subtipos de monócitos e induz o controle da resposta inflamatória, a avaliação de biomarcadores inflamatórios é útil para uma melhor avaliação dos mecanismos fisiopatológicos associados à doença, contribuindo para a a relevância do tratamento periodontal, em pacientes sob risco de doença cardiovascular.

Palavras-chave: Doença Periodontal, Diabetes Mellitus, Inflamação, Subtipos de monócitos, Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Introduction: Periodontal disease is characterized by a disturbance of the microbiota present in the oral environment, an inflammatory condition of the protective structures, and insertion of the teeth, causing an immune response in the individual, thus affecting the protective and supporting tissues of the periodontium, and may cause tooth loss if not properly treated and is the most prevalent form of bone disease in humans. Studies have shown a bidirectional relationship between diabetes and periodontal disease, as several mechanisms contribute to the greater severity of this disease in individuals with diabetes. The inability to resolve the pro-inflammatory milieu in periodontitis is believed to play a key role in the pathogenesis of the disease. In this context, monocytes are the main cellular components of innate immunity that play important roles in tissue homeostasis. Monocytes are large precursor cells originating from the bone marrow, which circulate in the blood for a few days before migrating to the tissues and are classified into classic, intermediate and non-classical, which perform various functions, mainly in immune defense, homeostasis, and tissue repair. **Objective:** To evaluate the effect of non-surgical Periodontal treatment in relation to the phenotypic modulation of monocyte subtypes, in the presence or absence of Diabetes. **Methods:** The study included patients of both sexes who were followed up at the Dental Clinic of Universidade Santo Amaro - UNISA, aged between 40 and 75 years, with Periodontal Disease (moderate and advanced) associated or not with Diabetes. Clinical visits were carried out to collect data such as risk factors, clinical examination, and collection of blood and gingival fluid samples, at baseline and 30 days after the end of non-surgical periodontal treatment. Monocyte subtypes (classic, intermediate, and non-classical) were evaluated by flow cytometry, based on the expression of cell surface proteins (CD14 and CD16). **Results:** After comparisons between baseline and 30 days after the end of periodontal treatment, regardless of the presence of Diabetes, there was an increase in non-classical monocytes after treatment and a reduction in intermediate monocytes, with no differences for the classic subtype. Analyzes in the groups with and without diabetes, at baseline and 30 days after the end of treatment, showed a reduction in intermediate monocytes and an increase in non-classical monocytes after treatment in the group with diabetes, without differences for classic monocytes. There were no significant differences for classic, intermediate, and non-classical monocytes in the group without diabetes. After comparisons between groups, significant differences were found for intermediate and non-classical monocytes at baseline, without differences for classic monocytes, such differences were not found after treatment. **Conclusion:** Non-surgical Periodontal Treatment, especially of individuals with Diabetes, modulates the phenotype of monocyte subtypes and induces control of the inflammatory response, the evaluation of inflammatory biomarkers is useful for a better evaluation of the pathophysiological mechanisms associated with the disease, contributing to the relevance of periodontal treatment in patients at risk of cardiovascular disease.

Keywords: Periodontal disease, Diabetes Mellitus, Inflammation, Monocyte subtypes, Flow cytometry.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Produtos finais da glicação avançada
CDs	Células dentríticas
CD14	*The cluster of differentiation antigen 14*
CD16	*The cluster of differentiation antigen 16*
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DM	Diabetes *Mellitus*
DM2	Diabetes *Mellitus* tipo 2
DMSO	*Dimethyl Sulfoxide*
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid*
HbA1C	Hemoglobina Glicada
HIV	Vírus da imunideficiência humana
HCV	Hepatite C
HBV	Hepatite B
IL	Interleucinas
IP	*Interferon-gamma induced protein 10*
JEC	Junção esmalte-cemento
LPS	Lipossacarídeo
MMP	*Matrix metalloproteinase*
MIP	Macrófago inflamatório *protein*
MG	Margem gengival
NCI	Nível Clínico de inserção
OMS	Organização Mundia da Saúde
PG	Prostaglandinas
PS	Profundidade de sondagem
PBMC	*Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PBS	*Phosphate buffered saline*
RANKL	*Receptor activador of nuclear factor kappa-beta*
RNA	*Ribonucleic acid*
SFB	Soro Fetal Bovino
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	Fator de Necrose tumoral
Tºamb	Temperatura ambiente
UNISA	Universidade Santo Amaro
URC	*Unisa Research Center*

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 12
1.1 Doença Periodontal: Aspectos gerais. 12
1.2 Inflamação 16
1.3 Subtipos de Monócitos 18
1.3.1 Monócitos Clássicos 20
1.3.2 Monócitos Não Clássicos 20
1.3.3 Monócitos Intermediários 20
2. JUSTIFICATIVA 22
3. OBJETIVOS 23
3.1 Objetivo Geral 23
3.2 Objetivos Específicos 23
4. MÉTODOS 24
4.1 Desenho do Estudo 24
4.2 Critérios de Inclusão 24
4.3 Critérios de Exclusão 24
4.4 Fluxo do Estudo 24
4.5 Critérios para o Diabetes 24
4.6 Avaliação Clínica Periodontal e Tratamento Periodontal 25
4.7 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico 26
4.8 Caracterização fenotípica de subtipos de monócitos 26
4.9 Análise por Citometria de Fluxo de Subtipos de Monócitos 26
4.10 Análise Estatística 28
4.11 Aspectos Éticos 28
5. RESULTADOS 29
5.1 Características gerais da amostra 29
5.2 Análise de subtipos de monócitos 29
6. DISCUSSÃO 32
7. CONCLUSÃO 37
8. REFERÊNCIAS 38
ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP 42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Periodontal: Aspectos gerais.

A Doença periodontal é caracterizada por um distúrbio da microbiota presente no ambiente bucal, uma condição inflamatória das estruturas de proteção e inserção dos dentes[1], ocasionando uma resposta imunológica no indivíduo. Desta forma, os tecidos de proteção e apoio do periodonto são afetados, podendo ocasionar a perda dentária, em caso de não ser devidamente tratada, e é a forma mais prevalente de doença óssea em humanos[1-2].

É de etiologia multifatorial complexa, na qual apresenta uma série de fatores tanto do hospedeiro quanto das bactérias. Os microorganismos provocam uma resposta imunoinflamatória no hospedeiro por meio da liberação de citocinasque vão agir nos tecidos ósseo e conjuntivo, ocasionando o início e o avanço da periodontite, pois uma vez presentes no biofilme são altamente relevantes para iniciar a doença[2].

A gengivite é uma condição inflamatória que envolve apenas o periodonto de proteção, caracterizando-se por sinais clínicos de inflamação limitados à gengiva, enquanto a periodontite envolve além do periodo de proteção, o alvéolo dentário que corresponde a uma cavidade no osso da mandíbula e da maxila, no qual alberga as raízes dentária, estabelecendo, desta maneira, a articulação entre o dente e seu respectivo alvéolo, responsável então pela sustentação dental, com formação de bolsa periodontal e/ou recessão gengival[3-4], ambas se constituem nas formas mais comuns de doença periodontal levando à destruição do periodonto[4].

Embora a causa da Doença Periodontal seja a presença de bactérias no biofilme dental, a resposta do hospedeiro à infecção bem como fatores genéticos são responsáveis por grande parte do dano tecidual e complicações encontrados[3].

Levando-se em consideração o fator etiológico primário da Doença Periodontal, o acúmulo de biofilme dental é formado por restos de alimento e bactérias na boca, a placa bacteriana é uma película pegajosa e incolor que adere à superfície externa dos dentes, se não tratada, acaba acarretando em uma série de problemas[4].

Na periodontite há a presença de bolsa periodontal, perda óssea, reabsorção

óssea e, além disso, é comum haver mobilidade dentária[4-5]. Já os fatores etiológicos secundários consistem em locais ou predisponentes, facilitando a retenção do biofilme e dificultando sua remoção e fatores modificadores alterando a resposta imunológica do organismo[4-5].

Fatores determinantes são definidos por microrganismos e acúmulo de placa bacteriana dental; fatores predisponentes consistem em anatomia dentária, a forma da arcada dentária, respiração bucal, aparelhos ortodônticos, cálculo dentário e contornos das restaurações; os fatores modificadores são classificados pelos hábitos parafuncionais (apertar e ranger os dentes durante o dia e a noite, pressionar a língua contra os dentes, morder ou roer objetos, entre outros), traumatismo oclusal; e por fim os fatores sistêmicos como o Diabetes Mellitus, na qual apresenta uma dificuldade no controle glicemico, o risco cardiovascular uma vez que as proteínas inflamatórias e as bactérias presentes no tecido periodondtal penetram na corrente sanguínea, e as discrasias sanguíneas[4-6].

Entre os fatores capazes de predispor o desenvolvimento da doença periodontal destacam-se o mau posicionamento, desalinhamento ou apinhamento dentário, a respiração bucal, algumas interferências oclusais e hábitos parafuncionais[5-6].

Nos últimos anos, foi mostrado que a doença periodontal é resultado de interações complexas entre um biofilme bacteriano disbiótico e a resposta imune do hospedeiro que levam a uma desregulação da resposta inflamatória e um desequilíbrio entre as atividades osteoblástica e osteoclástica[6].

O sistema imunológico utiliza mecanismos moleculares específicos coordenados por células, como os linfócitos, macrofágos, monócitos, mastócitos e neutrófilos, e pelos mecanismos associados a moléculas especificas, sendo caracterizadas como citocinas anti e pró-inflamatórias, prostaglandinas, inibidoresde proteinases e metaloproteinases da matriz (MMPs)[7].

O papel do sistema imunológico na patogênese da doença periodontal acontece quando há a presença de um patógeno, em seguida uma liberação de mediadores químicos, como as citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras que ativam outras células, contribuindo para o desenvolvimento e a amplificação da resposta de defesa do indivíduo[11].

Além disso, sabe-se que os mastócitos possuem uma grande variedade de moléculas com potencial de mediar a destruição da matriz extracelular, pois executam uma série de funções por meio de mediadores químicos quando estimulados, interagindo com várias células de diferentes origens, sendo uma característica encontrada na doença periodontal inflamatória[11-13].

A degradação do tecido periodontal ocorre de maneira gradual, sendo induzida principalmente por enzimas liberadas por células do sistema imunológico durante o processo inflamatório, que por usa vez dependendo do tipo de patógeno, pode apresentar dois tipos de resposta, sendo elas a resposta inata não específica, e a resposta adaptativa específica, que por sua vez é mais efetiva quando moldada para os patógenos agressores[9-10].

O desequilíbrio na homeostasia das bactérias com a microbiota do periodonto ocasiona uma sinalização para o sistema imunológico inato, neutrófilos e o sistema complemento, gerando desta forma, uma inflamação no local[11-13].

Essas enzimas endógenas desempenham um importante papel nos processos fisiológicos e patológicos, atuando na remodelação e degradação da matriz extracelular dos tecidos periodontais. Pacientes com inflamação periodontal apresentam elevadas concentrações de TNF-alfa, IL-1, RANKL eMMP-13, podendo indicar presença de periodontite[11-12-13].

A gravidade da doença também está diretamente ligada aos elevados níveis de MMP-8 presentes na saliva e no fluido gengival, ou seja, mudanças na homeostase dessas enzimas estão diretamento ligadas à degradação tecidual, sendo assim indispensáveis para a compreenssão da patogênese, diagnóstico e tratamento[10-11-13].

Neste contexto, diabetes mellitus e tabagismo são dois dos principais fatores de risco para doença periodontal; eles contribuem para uma resposta excessiva ao desafio bacteriano, levando a uma maior prevalência e maior gravidade da periodontite em indivíduos afetados[8-9].

Fumantes estão entre os que apresentam fatores de risco para gravidade da doença[14], acarretando em uma acelerada perda óssea alveolar e maior profundidade da bolsa periodontal, e quanto maior o consumo de cigarro, pior será a

resposta ao tratamento periodontal[15-16].

Diabetes

Diabetes *Mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico de origem múltipla, caracterizado por hiperglicemia crônica e alterações do metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, decorrentes de defeitos da secreção e/ou ação da insulina[17].

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2018 estimou-se em que o número de pessoas que sofrem de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é superior a 400 milhões, atualmente a população mundial com Diabetes Mellitus é de 382 milhões de indivíduos e que deverá atingir 471 milhões em 2035, sendo que aproximadamente 80% dos diabéticos encontram-se em países em desenvolvimento[17-19].

Dados do Atlas de Diabetes da International Diabetes Federation (IDF) mostraram em 2019 que aproximadamente 9% da população mundial possui DM e metade delas desconhecem, e que em até 2030, estima-se que 578 milhões de pessoas desenvolvam a doença, podendo chegar até 700 milhões de adultos até o ano de 2045[20-21].

Outro dado da OMS em 2019, mostra que o tipo da doença que prevalece no mundo é o DM do tipo 2, que está se tornando uma epidemia mundial e se caracteriza por ser um sério problema de saúde pública[22-23].

O diabetes apresenta elevada morbimortalidade associada à complicações agudas e crônicas. A insulina é produzida pelo pâncreas e é responsável pela manutenção do metabolismo da glicose e a falta desse hormônio provoca déficit na metabolização da glicose e, consequentemente, o diabetes[18].

Além disso, é um maior risco para doenças cardíacas e cerebrovasculares, caracterizada por altas taxas de glicose no sangue de forma permanente, sendo, portanto um fator de risco associado à Doença Periodontal, e uma prioridade em saúde pública[18-19].

No Brasil, esta realidade faz presente com estimativas de que até 2025 aproximadamente 11 milhões de pessoas serão diabéticas, sendo que em 2012

10,3% da população apresentava Diabetes *Mellitus*[23], esses números preocupantes levaram governos, centros de pesquisa e milhares de pesquisadores a estudar as causas exatas desse fenômeno e os possíveis tratamentos e soluções[23-24].

A Doença Periodontal tem sido apontada como um fator de risco para o controle glicêmico em pacientes descompensados, visto que o processoinflamatório pode ser encontrado associado a alterações no ambiente subgengival, tais como aumento dos níveis da glicose e uréia no fluido crevicular gengival, que favorecem o crescimento de algumas espécies bacterianas, essas alterações vasculares contribuem para a exacerbação da destruição dos tecidos periodontais e consequente progressão da Doença Periodontal[25].

Alguns estudos têm mostrado a relação bidirecional entre diabetes e doença periodontal, e vários fatores contribuem para o agravamento da doença periodontal em indivíduos com diabetes, tais como: produtos finais da glicação avançada (AGES), que estimulam uma produção aumentada de mediadores inflamatórios, como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e prostaglandina E2 (PGE2); diminuição de quimiotaxia, aderência e fagocitose dosneutrófilos; alterações salivares, que estimulam o crescimento de bactérias periodontopatogênicas e a precipitação de cálculo; herança de determinadospolimorfismos genéticos; fenótipos hiper-reativos de neutrófilos e macrófagos; alterações nos vasos sanguíneos e no tecido conjuntivo[26].

Além disso, ocorre comprometimento na produção da matriz óssea pelos osteoblastos, diminuição na síntese de colágeno pelos fibroblastos gengivais, além do aumento da atividade da colagenase gengival[26-27]. Também pode ser induzido um estado crônico de resistência à insulina contribuindo então para uma hiperglicemia, favorecendo então todo esse quadro inflamatório presente no paciente, associado a desfechos cardiovasculares[27].

1.2 Inflamação

A inflamação envolve uma série de interações moleculares, ou pode ser definida como o conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas em resposta a estímulos agressivos ao organismos. Uma reação do organismo a uma infecção ou lesão dos tecidos, podendo ser dividida em[28]:

1) Aguda, que ocorre logo após a agressão, tem a resposta inicial à lesão celular e tecidual, predominando fenômenos de aumento de permeabilidade vascular e migração de leucócitos, particularmente neutrófilos no foco da lesão, com o objetivo principal de eliminar o agente agressor. Caracteriza-se pelos sinais cardinais da inflamação, com uma resposta sistêmica na forma neutrofílica e febre[28-29];

2) Crônica, caracterizada pelo desenvolvimento da resposta humoral específica e da resposta imune celular, embora possa suceder a inflamação aguda, a inflamação crônica, com freqüência, começa de maneira insidiosa, como resposta de baixo grau, latente e, muitas vezes, assintomática, relacionada a vários tipos de doenças crônicas como doenças cardiovasculares[28-29].

Tanto na resposta de fase aguda quanto na crônica, mediadores inflamatórios agem de maneira local ou sistêmica, ativando outras células envolvidas no processo inflamatório (células endoteliais, fibroblastos e células do sistema fagocítico mononuclear), ampliando, assim, a resposta inicial ao agente lesivo[28-30].

Embora não existam critérios diagnósticos específicos, sabe-se que o estado de inflamação crônica subclínica provoca lesão tissular incipiente pormeio da ativação em longo prazo do sistema imune inato, podendo causar posterior manifestação de doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares, o diabetes, a obesidade, o câncer, entre outras[28,29].

O mecanismo pelo qual estes mediadores pró-inflamatórios levam à manifestação dessas doenças parece envolver a atenuação da atividade insulínica, mobilização de gorduras, disfunção endotelial e estresse oxidativo[28,29]. Os processos relacionados à inflamação são mediados por substâncias químicas (histamina, cininas, fator ativador de plaqueta, citocinas, prostaglandinas e leucotrienos), oriundas do plasma, endotélio, células do tecido conjuntivo, leucócitos e plaquetas, gerando uma resposta inflamatória que regula a inflamação. Os fatores de transcrição, enzimas inflamatórias, citocinas inflamatórias e quimiocinas são os principais mediadores moleculares que estão envolvidos no desencadeamento da inflamação[29].

O meio pró-inflamatório na doença periodontal desempenha um papel fundamental na patogênese da doença, monócitos e macrófagos são os principais

componentes celulares da imunidade inata que desempenham papéis importantes na homeostase tecidual[8]. Quando associada ao diabetes, a doença periodontal compromete ainda mais a produção da matriz óssea pelos osteoblastos, diminui a síntese de colágeno pelos fibroblastos gengivais, além de aumentar a atividade da colagenase gengival[8-10].

1.3 Subtipos de Monócitos

Monócitos são grandes células precursoras originadas da medula óssea, que circulam pelo sangue por alguns dias antes de migrarem para os tecidos, onde amadurecem e desenvolvem diferentes tipos de macrófagos e células dendríticas (CDs), que desempenham várias funções, principalmente na defesa imunológica, homeostase e reparo tecidual[30-31].

Os monócitos foram inicialmente definidos com base na morfologia e citoquímica e, posteriormente, por citometria de fluxo que foi baseada nas propriedades de dispersão de luz e em marcadores de superfície celular como CD14 (co-receptors de lipopolissacarídeo - LPS) e CD16 (Fc γ Receptor III). Com base na expressão dos marcadores CD14 e CD16, foram definidas duas subpopulações de monócitos: monócitos clássicos CD14++CD16-, monócitos não clássicos CD14+CD16++, e posteriormente, foi identificada uma terceira subpopulação monócitos intermediários CD14++CD16+, que correspondem a umestágio transitório de diferenciação[32].

Semelhante a outros leucócitos, como linfócitos, as evidências sujerem que a diversidade de funções atribuídas aos monócitos pode refletir a heterogeneidade celular e para monócitos do sangue humano, uma subdivisão em 3 subconjuntos, sendo então, clássico, não clássico e intermediário (Figura 1), as funções são específicas de cada subtipo, diferenciando entre si relativamente ao seu, tráfego, tamanho, expressão de receptores imunes e quando estimulados a capacidade de se diferenciar[33].

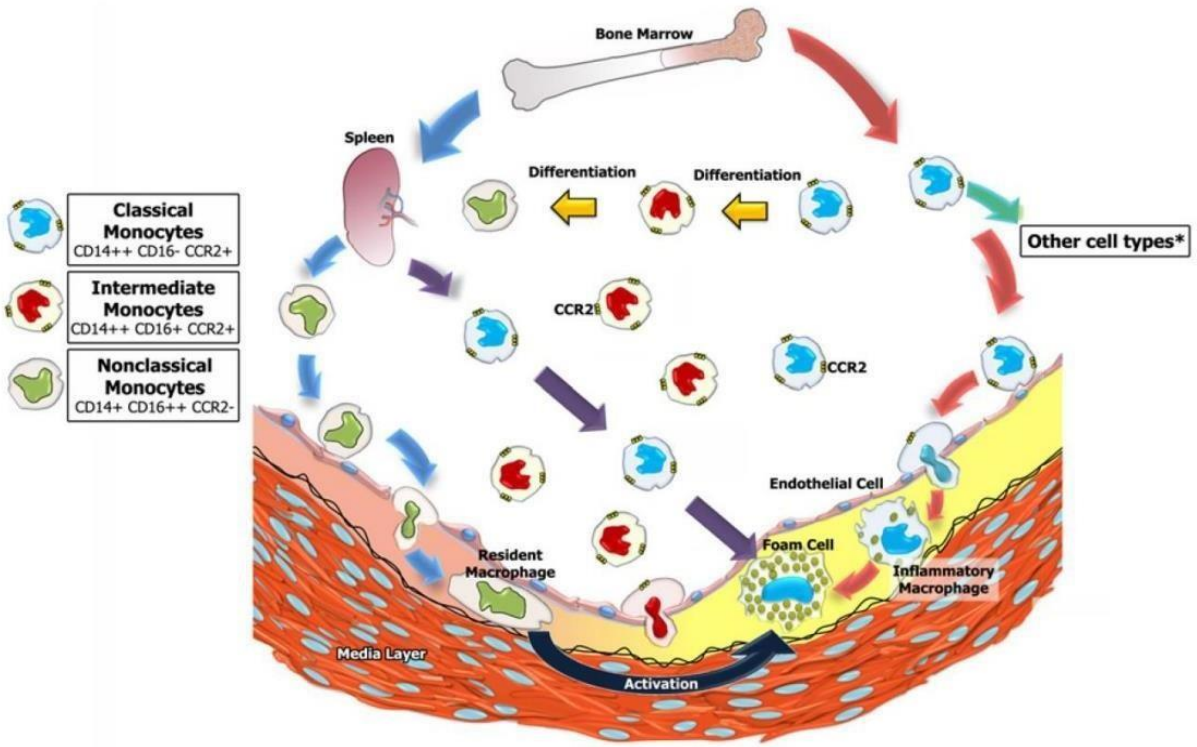


Figura 1. Monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos e seus fenótipos correspondentes[36].

Monócitos são atraídos para os tecidos inflamados por mediadores quimiotáticos, tais como da histamina, do complemento, leucotrienos, IP-10 ("Interferon-gamma-induced protein 10"), e MIP-1 e 2 ("macrophage- inflammatory protein-1 e 2"). Fazendo com que a concentração destes fatores aumentem durante a inflamação, como capacidade fagocítica e antimicrobiana, os quais permitem assegurar importantes funções fisiológicas[34].

Os monócitos clássicos podem se tornar macrófagos no local da lesão e os monócitos não clássicos são os principais responsáveis pela remoção de debris da vasculatura. Os monócitos intermediários têm um papel substancial durante a cascata inflamatória e também são conhecidos como monócitos hiperinflamatórios[35-36].

A vida dos monócitos é curta equivalente de 1 a 3 dias, os monócitos não clássicos se acumulam em locais de infecção bacteriana crônica e produzem baixos níveis de citocinas pró- inflamatórias, mas altos níveis de citocinas anti-inflamatórias[36-37].

1.3.1 Monócitos Clássicos

Os monócitos clássicos (CD14++CD16-) representam 85% do total do número de monócitos na circulação sanguínea e produzem citocinas como IL-6 e IL-8 e quimiocinas como CCL2 e CCL3, são células inflamatórias recrutadas da medula óssea e reservatórios esplênicos para locais de inflamação ativa, que respondem a muitos estímulos originados de tecido danificado ou infectado e produz citocinas inflamatórias, são bons ativadores de linfócitos T CD4+. Possuem alta capacidade fagocítica em relação às subpopulações de monócitos intermediários e não clássicos e alta atividade microbicida[38-39].

1.3.2 Monócitos Não Clássicos

Os monócitos não clássicos (CD14+CD16++), considerados os mais maduros entre as subpopulações, por possuírem maior expressão de CD16, representam 5 a 10% do número total de monócitos circulantes, alguns são derivados de monócitos clássicos, mas também podem surgir de forma independente[40].

Monócitos não clássicos são os maiores produtores de citocinas pró-inflamatórias, quando comparados com as demais subpopulações, são células reparadoras que removem debris da vasculatura e produzem altos níveis de fatores anti-inflamatórios, responsáveis pelo recrutamento de células para o local da inflamação[41]. Tais monócitos patrulham ativa e continuamente o lado luminal do endotélio vascular tanto no estado estacionário quanto durante a inflamação, fagocitar micropartículas e medeiam a remoção de células endoteliais danificadas. Portanto, podem funcionar para reparar a vasculatura ou remover lipídios da circulação em condições inflamatórias ateroscleróticas prejudiciais[41-42].

1.3.3 Monócitos Intermediários

Os monócitos intermediários (CD14++CD16+) correspondem de 5 a 15% do número total de monócitos na corrente sanguínea, são considerados potentes indutores de inflamação, são células altamente fagocíticas que produzem altos níveis de mediadores inflamatórios como TNF-alfa e baixos níveis de IL-10,

removem células apoptóticas, apresentam um grau de maturação maior do queos monócitos clássicos, relacionados com a diferenciação em macrófagos e células dendríticas. Como os monócitos intermediários eram considerados parte da subpopulação de monócitos não clássicos, foram negligenciados em diversos estudos anteriores, mas mostraram relevância clínica em pacientes com alto risco cardiovascular, onde a contagem de monócitos intermediários mostrou-se elevada nesses indivíduos[43-44].

2. JUSTIFICATIVA

A Doença Periodontal associada ao Diabetes Mellitus tem uma alta prevalência na população mundial e brasileira. O Diabetes pode ser um agravante na modulação dos monócitos para um fenótipo mais pró-inflamatório.

A avaliação de biomarcadores inflamatórios pode ser útil para um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos associados à doença, visto quehá poucos estudos avaliando subtipos de monócitos nesse contexto, principalmente envolvendo o tratamento da doença periodontal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento Periodontal não cirúrgico em subtipos de monócitos, na presença ou não de Diabetes.

3.2 Objetivos Específicos

Identificar, quantificar e caracterizar fenotipicamente por citometria de fluxo, as três subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) no basal e 30 dias após o término do tratamento periodontal não cirúrgico;

Comparar os resultados obtidos entre diabéticos e não diabéticos.

4. MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

O estudo incluiu pacientes de ambos os sexos que fazem acompanhamento na Clínica de Odontologia da Universidade Santo Amaro - UNISA, idade entre 40 e 75 anos, com Doença Periodontal (moderada e avançada) associada ou não ao Diabetes. Foram realizadas visitas clínicas para coleta dos dados como fatores de risco, exame clínico, coletas de amostras de sangue e fluido gengival, no basal e 30 dias após o término do tratamento periodontal não cirúrgico. Os pacientes realizaram a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O estudo foi registrado como ensaio clínico antes de seu início e obedeceu as normas internacionais da boa prática clínica e harmonização de dados (GCP/ICH).

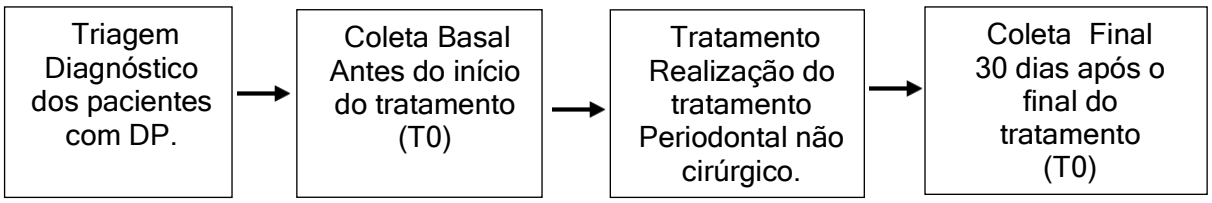
4.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídos pacientes diagnosticados com Doença Periodontal (avaliadospor duas periodontistas), apresentando no mínimo 10 dentes na cavidade bucal.

4.3 Critérios de Exclusão

Ser desdentado, ter recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses, ser fumante, apresentar gengivite ou periodontite leve, estar em uso contínuo de medicamentos anti-inflamatórios e/ ou imunossupressores.

4.4 Fluxo do Estudo



4.5 Critérios para o Diabetes

Os pacientes foram divididos em dois grupos: Doença Periodontal com Diabetes e Doença Periodontal sem Diabetes. A presença de Diabetes Mellitus foi definida a partir de:

1- Hemoglobina glicada (HbA1c) entre 7 e 9%;

2- Glicemia de jejum ≥ 200 mg associada a sintomas como emagrecimento, polidipsia/poliúria; haverá repetição do exame para comprovação do diagnóstico;

Uso de medicamentos antidiabéticos com história de diagnóstico prévio.

4.6 Avaliação Clínica Periodontal e Tratamento Periodontal

Os pacientes foram clinicamente avaliados por duas periodontistas previamente treinadas. Da amostra, 10% foram examinados duas vezes para cada um dos critérios clínicos avaliados, a fim de se obter a confiabilidade diagnóstica intra-examinador aferida pela estatística de Kappa (entre 0.8 e 1.0).

A profundidade de sondagem (PS) foi aferida em todos os sítios, usando sonda periodontal manual tipo Williams. A PS foi mensurada da margem gengival livre até a base da bolsa periodontal.

O nível clínico de inserção (NCI) foi obtido de todos os sítios examinados por meio da medida da distância da junção esmalte-cemento (JEC) até a margem gengival (MG) somando à medida da PS. Ou seja: NCI = PS + (JEC a MG). Todas as medidas obtidas foram expressas em milímetros.

O sangramento gengival foi anotado de forma dicotômica após vinte segundos da obtenção da sondagem periodontal. A condição gengival dos indivíduos foi avaliada usando o Índice Gengival[45]. A higiene bucal foi avaliada pelo Índice de Placa[46].

Os indivíduos após o exame clínico periodontal foram diagnosticados de acordo com a Classificação das Doenças Periodontais[2]. Assim incluídos indivíduos diagnosticados com Periodontite estádio II, III e IV[47]. Após a instrução de higiene bucal dos pacientes, os sítios diagnosticados com doença periodontal os pacientes foram submetidos ao tratamento periodontal não cirúrgico, que consistiu em instrução de higiene oral, raspagem supra e subgengival, aplainamento radicular e polimento dentário.

4.7 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

Foram colhidos aproximadamente 15 mL de sangue periférico dos pacientes em tubos com EDTA (para evitar coagulação), sendo acrescido Ficoll-Hypaque (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) e centrifugado a 800 g, 22ºC por 20 minutos, havendo separação de células mononucleares por gradiente de concentração. Posteriormente, as células obtidas foram lavadas em PBS. A viabilidade celular e contagem das células foram realizadas em Câmara de Neubauer (hemocitômetro), após coloração de 10 uL das células com 90 uL de Azul de Tripan 60% (Sigma-Aldrich, MO, USA) por cinco minutos; em seguida as amostras foram centrifugadas e foi adicionado 1 mL de solução para congelamento (DMSO + soro fetal bovino); as amostras foram armazenadas a -80ºC.

4.8 Caracterização fenotípica de subtipos de monócitos

As células mononucleares do sangue periférico foram centrifugadas e imunomarcadas por 30 minutos à temperatura ambiente com os anticorpos: anti-CD14 conjugado com isotiocianato de fluoresceína – FITC e anti-CD16 conjugado com ficoeritrina – PE. Além disso, células foram incubadas com isotipos controles (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCalibur — BD Biosciences, San Jose, USA) com análise feita pelo software Cell Quest Pro, no basal e 30 dias após o término do tratamento periodontal não cirúrgico. Os subtipos de monócitos foram expressos em porcentagem (%), sendo adquiridos aproximadamente 50.000 eventos. A técnica já foi padronizada no sangue periférico, conforme exemplo mostrado na Figura 2.

4.9 Análise por Citometria de Fluxo de Subtipos de Monócitos

Os dados obtidos foram interpretados com base no ângulo dos feixes de luz emitidos pelas células e são compilados em gráficos onde o eixo X corresponde à intensidade do espalhamento frontal (chamado de FSC, ângulo de dispersão frontal, que detecta o tamanho celular) e o eixo Y corresponde ao espalhamento lateral (chamado de SSC, ângulo de dispersão lateral detecta a composição celular) do feixe de luz. Cada partícula que passa pelo feixe de luz dispersa uma luz diferente, diferenciando os tipos celulares. As células foram contadas a partir de

detectores **FSC e SSC**.

O FSC emite informações quanto ao tamanho da célula e o SSC quanto à quantidade e densidade dos grânulos da célula. Para refinar e identificar sequencialmente as populações celulares em pesquisa usou-se o método chamado "gating" que utiliza marcados moleculares. Todo resultado foi compilado e convertido em dados eletrônicos em um software e disponibilizado para visualização no computador.

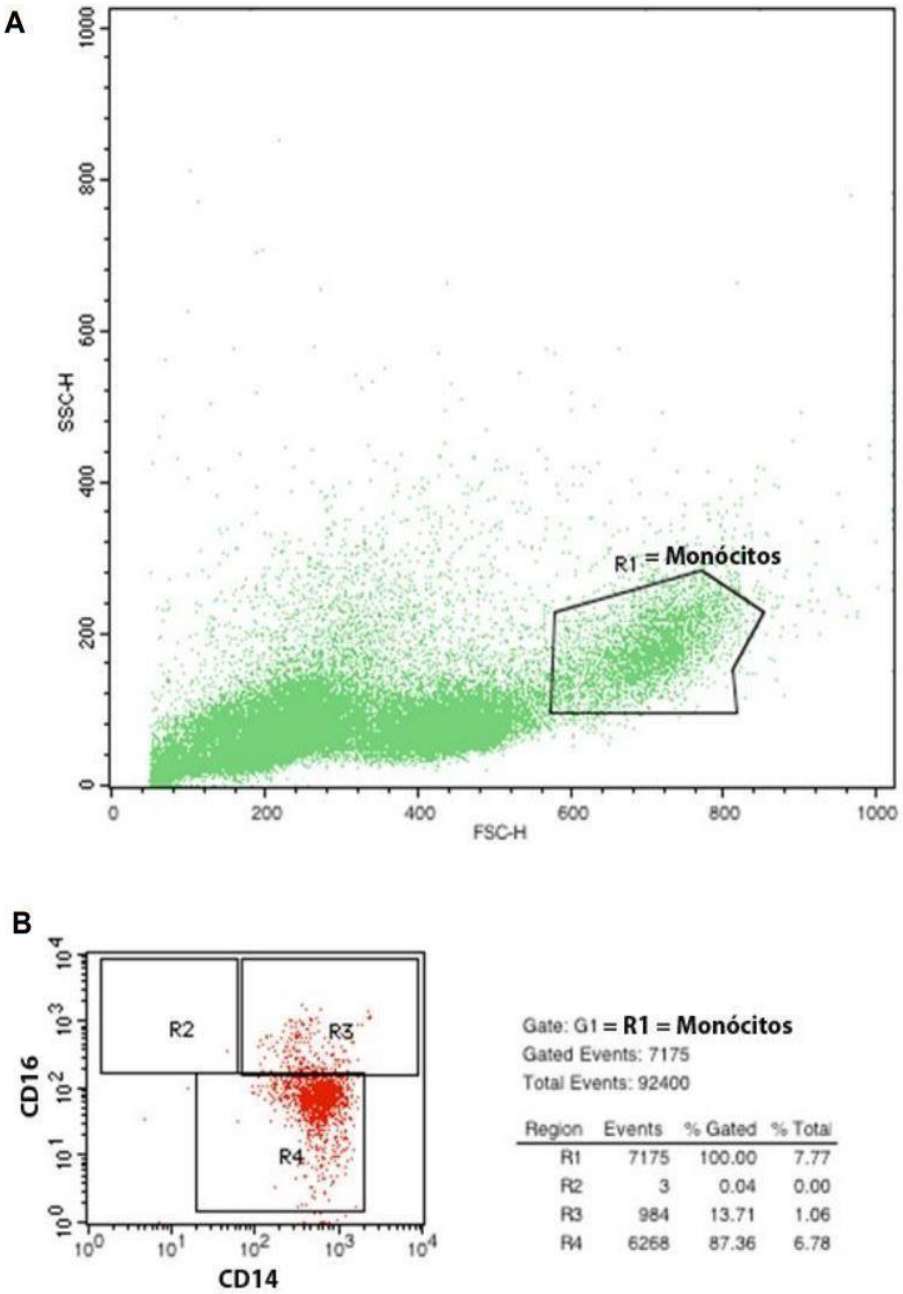


Figura 2. Análise por Citometria de Fluxo de subtipos de monócitos. **A)** Tamanho (FSCH) x complexidade (SSC-H), R1 = região de monócitos; **B)** Amostra marcada com os anticorpos anti-CD14 FITC e anti-CD16 PE, identificando-se três subpopulações de monócitos: R2 = Não-clássicos, R3 = intermediários e R4 = clássicos.

4.10 Análise Estatística

Para análise das medidas descritivas e testes estatísticos, foi utilizado o programa SPSS versão 18.0, utilizando-se testes paramétricos e não paramétricos conforme a natureza das variáveis. Sendo considerado nível de significância $p < 0,05$.

4.11 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Santo Amaro, sob parecer número 4.650.394.

5. RESULTADOS

5.1 Características gerais da amostra

Desde o início do estudo, 418 pacientes foram pré-triados e destes foram incluídos 45 participantes. A Tabela 1 mostra os valores para perfil lipídico e glicemia obtidos no basal e um mês após o término do tratamento periodontal não cirúrgico.

5.2 Análise de subtipos de monócitos

Caracterização fenotípica de subtipos de monócitos

As três subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) foram identificadas, quantificadas e caracterizadas fenotipicamente por Citometria de Fluxo, por meio das proteínas de superfície CD14 e CD16.

A Tabela 2 representa as porcentagens dos três subtipos de monócitos. Após comparações entre basal e após 30 dias do término do tratamento periodontal pelo Teste de Wilcoxon, independente da presença de Diabetes, houve aumento de monócitos não-clássicos após o tratamento (p=0,003) e redução de monócitos intermediários (p=0,046), sem diferenças para o subtipo clássico (p=0,137).

Também foram realizadas análises nos grupos com e sem Diabetes, no basal e 30 dias após o término do tratamento (Tabela 3). Houve redução de monócitos intermediários e aumento de monócitos clássicos e não clássicos após o tratamento no grupo com Diabetes (Teste de Wilcoxon, p=0,005; p=0,007 e p=0,006, respectivamente). Por outro lado, não houve diferenças significantes para monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos no grupo sem Diabetes (Teste de Wilcoxon, p=0,508; p=0,799 e p=0,131, respectivamente).

Após comparações entre os grupos, foram encontradas diferenças significantes para monócitos clássicos, intermediários e não clássicos no basal (Teste de Mann-Whitney, p=0,031; p=0,001 e p=0,008, respectivamente); tais diferenças não foram encontradas após o tratamento (Teste de Mann-Whitney, p=0,150; p=0,569 e p=0,494, respectivamente).

Tabela 1. Perfil lipídico e glicose dos participantes do estudo, na visita basal

Metabólito	**Com Diabetes**		**p intra grupos**	**Sem Diabetes**		**p intra grupos**	**p entre grupos**	
	Basal	30 dias		Basal	30 dias		Basal	30 dias
Colesterol total*	121 (4)	124 (7)	0,690	125 (5)	119 (11)	0,309	0,528	0,707
Triglicérides*	104 (5)	109 (8)	0,903	89 (5)	92 (10)	0,159	**0,046**	0,229
HDL-C*	35 (1)	35 (0)	0,580	36 (0)	37 (1)	0,528	0,381	**0,041**
LDL-C$	64 (4)	66 (8)	0,258	71 (5)	69 (11)	0,457	0,316	0,909
Glicose*	140 (9)	159 (18)	0,417	109 (7)	115 (10)	0,110	**0,017**	0,085

*mg/dL;& µg/dL;# µmol/L.$ Cálculo pela fórmula de Friedewald. Os dados representam as médias (erros-padrão das médias – EPM). Teste t pareado, comparação intra grupos (basal x final em cada grupo). Teste t não-pareado, comparações entre grupos (com e sem Diabetes, para cada visita).

Tabela 2. Porcentagens (%) de monócitos clássicos, intermediários e não clássicos no sangue periférico, comparações entre visitas

Monócitos	**Basal**	**30 dias**	**p intra grupos**
Clássicos	28,39 (2,10)	34,08 (2,08)	0,137
Intermediários	59,51 (2,88)	48,29 (3,28)	**0,046**
Não-clássicos	4,62 (0,69)	6,75 (1,19)	**0,003**

Os dados representam as médias (erros-padrão das médias – EPM). Teste de Wilcoxon, comparações intra grupos (basal x 30 dias após o término do tratamento).

Tabela 3. Porcentagem (%) de subtipos de monócitos no sangue periférico, comparações entre grupos (com e sem Diabetes)

Monócitos	**Com Diabetes**		**p intra grupos**	**Sem Diabetes**		**p intra grupos**	**p entre grupos**	
	Basal	30 dias		Basal	30 dias		Basal	30 dias
Clássicos	23,68 (2,42)	36,70 (3,20)	**0,007**	33,56 (3,29)	30,35 (2,56)	0,508	**0,031**	0,150
Intermediários	67,86 (3,42)	45,37 (5,26)	**0,005**	50,20 (3,82)	51,67 (3,93)	0,799	**0,001**	0,569
Não-clássicos	3,56 (0,94)	7,22 (2,02)	**0,006**	6,36 (0,96)	6,78 (1,23)	0,131	**0,008**	0,494

Os dados representam as médias (erros-padrão das médias – EPM). Teste de Wilcoxon, comparação intra grupos (basal x final em cada grupo). Teste de Mann-Whitney, comparações entre grupos (com e sem Diabetes, para cada visita).

6. DISCUSSÃO

Os monócitos circulantes constituem uma população heterogênea, com fenótipos e funções distintas entre as suas três subpopulações. Neste estudo, foram caracterizados os subtipos de monócitos (clássicos, não-clássicos e intermediários) de amostras de sangue periférico em pacientes com Doença Periodontal associada ou não ao Diabetes, uma doença inflamatória multifatorial que leva à perda dos tecidos de suporte dos dentes e contribui para a carga inflamatória sistêmica[48].

Os principais achados mostraram maiores porcentagens de monócitos não-clássicos e redução na porcentagem de monócitos intermediários após o tratamento periodontal, considerando-se todos os participantes do estudo. Antes do tratamento periodontal a subpopulação presente predominantemente era a de monócitos intermediários, descrita na literatura como a subpopulação mais inflamatória, e que após o tratamento, a subpopulação predominante no tecido era a não-clássica, descrita como uma subpopulação reparadora. Tais dados sugerem que após 30 dias do tratamento não cirúrgico houve melhora do quadro inflamatório, principalmente na presença de Diabetes[48-49-50].

Almubarak e colaboradores (2020)[50] desenvolveram um estudo no qual identificaram uma maior porcentagem de monócitos intermediários (CD14++CD16+) e secundariamente a população de não clássicos (CD14+CD16++) em locais afetados por Doença Periodontal, quando comparado com locais saudáveis, na presença ou não de Diabetes. No mesmo estudo, quando os subtipos foram avaliados na presença de Diabetes, a porcentagem de monócitos intermediários (CD14++CD16+) foi significativamente aumentada; tais dados sugerem que o quadro pró-inflamatório presente em um tecido local (no caso da Doença Periodontal) pode estar associado a uma inflamação sistêmica, mostrando que a relação é bidirecional**,** ou seja, que essa ruptura da quebra da homeostase de monócitos impacta diretamente na patogênese de ambas as doenças.

No presente estudo, quando os pacientes foram avaliados segundo presença ou não de Diabetes, as modificações nos subtipos não-clássico e intermediário mantiveram-se apenas no grupo com Diabetes, sugerindo que a Doença Periodontal possa ser mais severa em pessoas com Diabetes, e que o tratamento

periodontal não cirúrgico, especialmente de indivíduos com Diabetes, possa modular o fenótipo desses subtipos de monócitos.

Os monócitos intermediários são o subtipo mais pró-inflamatório de monócitos, e sua perturbação foi relatada em uma variedade de doenças inflamatórias e autoimunes, o que se alinha aos nossos achados e pode explicar a maior suscetibilidade de Diabéticos à Doença Periodontal.

Em nosso estudo, comparando basal e após 30 dias do término do tratamento periodontal, na presença ou não de Diabetes, houve aumento de monócitos não-clássicos (CD14+CD16++) após o tratamento, o que está de acordo com o estudo de Nagasawa e colaboradores (2004)[38], onde também foi mostrado aumento de monócitos não-clássicos, decorrente da associação entre bacteremia da Doença Periodontal e da maior produção de citocinas.

Um estudo desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2019)[51] mostrou uma redução significante no percentual médio de monócitos na comparação entre o inicio e o término do tratamento periodontal, entretanto, o mesmo não diferenciou diabéticos e não diabéticos e nem caracterizou as três subpopulações de monócitos.

Buhlin e colaboradores (2009)[52], em um estudo caso-controle com casuística de 96 pacientes, sendo 50 pacientes com periodontite severa (grupo caso) e 46 pacientes sem doença periodontal (grupo controle), mostrou maior porcentagem de monócitos no grupo caso quando comparado ao grupo controle. O estudo, porém, não descreveu qual subpopulação predominou antes e depois do tratamento periodontal. Ainda no estudo, os autores relatam que não observaram diferenças significativas nos níveis de IL-6 e na contagem de outras células inflamatórias.

As células imunes inatas (monócitos, macrófagos) reconhecem padrões moleculares que estão associados a patógenos através de receptores de reconhecimento de padrões, resultando na destruição dos organismos ativadores pela liberação de agentes citotóxicos ou fagocitose[55].

Esses resultados sugerem que tanto a quantidade quanto a função dos imunócitos podem ser afetadas pelo microbioma periodontal em pacientes com periodontite que também sofrem de diabetes[55].

He e colaboradores (2022)[56] desenvolveu um experimento para testar no modelo animal se a microbiota oral causará impacto na produção de citocinas circulantes de células imunes, e encontrou aumento significativo em interleucinas, mas uma diminuição na porcentagem dos monócitos. As respostas imunes na cavidade oral foram alteradas por um microbioma oral perturbado, mas mostraram atividade imune específica do local. logo monócitos podem ser os principais imunócitos para o microbioma oral regular a imunidade do diabetes.

Os monócitos podem substituir os macrófagos residentes em todos os principais órgãos e adotar sua expressão gênica específica do tecido, com isso, os resultados do estudo de He e colaboradores (2022)[56], sugerem que a presença da periodontite e do diabetes podem causar um conjunto de cascatas imunes, mostrando que as alterações de monócitos presentes no estudo foram bem consistentes.

Assim com Almubarak e colaboradores (2020)[50] comparou o transcriptoma de monócitos/macrófagos no tecido gengival de pacientes periodontais com e sem diabetes, e encontrou uma ruptura significativa da homeostase de monócitos e macrófagos em direção a um fenótipo pró-inflamatório, He e colaboradores (2022)[56] também observou esse desequilíbrio dentro do sistema monócito/macrófago, e concluiu que monócitos podem ser os principais imunócitos para o microbioma oral regular a imunidade do diabetes.

Com relação à inflamação endotelial, Li e colaboradores (2022)[57] descreveu que a periodontite pode contribuir ou aumentar tal inflamação, por meio de patógenos com estimulos nocivos ou citocinas periodontais que quando detectados por receptores nas células endoteliais vasculares, levam a ativação de uma cascata inflamatória.

Li e colaboradores (2022)[57] descreve que a inflamação pode modular a produção de citocinas inflamatórias, como interleucinas, fator de necrose tumoral e proteína quimiotática de monocitos, a liberação de fatores inflamatórios induz a migração e adesão de leucócitos e monócitos à camada íntima do vaso sanguíneo. Essas células imunes podem transportar bactérias periodontais para a lesão e secretar mais fatores inflamatórios ao mesmo tempo, exacerbando a inflamação endotelial.

Li e colaboradores (2022)[57] citam um fenótipo de monócitos hiper-inflamatórios quando o hospedeiro é desafiado pelas bactérias periodontais, o que pode resultar em uma liberação anormal de uma grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios. Acredita-se que esse fenótipo encaixa-se na subpopulação de monócitos intermediários, visto que em muitos estudos sugerem ser uma subpopulação mais inflamatória, corroborando com os dados do nosso estudo no qual obtiveram maior porcentagem no basal, antes do tratamento periodontal não cirúrgico.

Li e colaboradores (2022)[57], concluem que pacientes diagnosticados com periodontite deve ser submetido ao tratamento periodontal para melhorar sua função endotelial vascular, afim de reduzir o risco de eventos cardiovasculares.

Carrizales-Sepúlveda e colaboradores (2022)[58] descreve que a inflamação desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e a doença periodontal está associada a um estado inflamatório sistêmico. A inflamação sistêmica é um fator de risco cardiovascular bem conhecido, e foi proposto que a doença periodontal gera um estado inflamatório sistêmico crônico, pois apresentam níveis circulantes mais elevados de PCR, e outros marcadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral e interleucina e monócitos.

Noz e colaboradores (2021)[59] descreveram que monócitos constroem memória imunológica após encontrar um patógeno, resultando em um fenótipo hiper-responsivo persistente.

Yang e colaboradores (2011)[60] associam os monócitos ao diabetes e descrevem que em estudos experimentais os monócitos de pacientes com diabetes apresentam um comportamento anormal com perfil pró-inflamatório, estando ligado a uma inflamação juntamente ao diabetes do tipo 2 a resistência a insulina e complicações diabéticas. As variações de responsividade com citocinas inflamatórias em monócitos são úteis para a prevenção e tratamento de diabetes do tipo 2 e as disfunções imunológica podem estar relacionada a ativação das vias de sinalização imunológicas dos monócitos.

Hajishengallis e colaboradores (2021)[61] descreveu que a inflamação induzida pela periodontite por monócitos circulantes e sua desão aumentada as células endoteliais, respondem com maior produção de citocinas pró-inflamatórias do que os mesmos tipos de células de indivíduos saudáveis, e que o tratamento periodontal local diminui níveis séricos de fatores inflamatórios, e melhora o controle metabólico, o perfil lipídico, e outros marcadores substitutos de doença sitêmica, uma evidência clara de que o sucesso o tratamento da doença periodontal pode reduzir o risco ou a incidência de eventos cardiovasculares.

Certas formas de periodontite, incluindo início precoce e periodontite refratária, possuem monócitos hiper inflamatórios, com isso Jagannathan e colaboradores (2014)[62] realizou um estudo para identificar monócitos não clássicos no sangue periférico e tecido gengival de indivíduos com gengiva saudável e pacientes com Doença Periodontal. Concluindo que houve maior porcentagem das células em estudo no grupo com a doença, mas não foram avaliados efeitos de tratamento periodontal, e que a análise dos subtibos no sangue revelou diminuição da proporção de monócitos clássicos e aumento de monócitos não clássicos quando comparado com uma gengiva saudável.

Dados que coincidem com os do estudo de Nagasawa e colaboradores (2004) [63] onde foi observada maior produção de citocinas, e uma proporção aumentada de monócitos não clássicos e proporção diminuída de monócitos clássicos no sangue periférico, os quais sugeriram uma associação entre bacteremia decorrente da doença periodontal que podem contribuir para a diferenciação em o subtipo clássico e não clássico.

Brown e colaboradores (2019)[65] identificou um aumento de marcadores inflamatórios, principalmente de monócitos inflamatórios no tecido gengival de pacientes com periodontite crônica, o que sugere que o estado inflamatório do tecido pode impactar as respostas em células imunes, o mesmo não diferencia qual subtipo estava presente no tecido gengival.

7. CONCLUSÃO

Tratamento Periodontal não-cirúrgico, especialmente de indivíduos com Diabetes, modula o fenótipo desses subtipos de monócitos e induz o controle da resposta inflamatória, a avaliação de biomarcadores inflamatórios é útil para uma melhor avaliação dos mecanismos fisiopatológicos associados à doença. Quando associado ao Diabetes pode ser um agravante associado a maior taxa de monócitos inflamatórios circulantes, contribuindo para a a relevância do tratamento periodontal, em pacientes sob risco de doença cardiovascular.

8. REFERÊNCIAS

1. Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA, et al. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. Periodontology 2000. 2016;72(1):54-75. Doi: 10.1111/prd.12135.
2. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Clin Periodontol. 2018;45 Suppl 20:S162-S170. Doi: 10.1111/jcpe.12946.
3. Lins RD, Norões TS, Sousa AA, et al. Ocorrência da doença periodontal e da sua relação com as maloclusões. Odontol Clín Cient Recife 2011;10(3):251-254.
4. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. Periodontol 2000. 2010 Feb;52(1):163-206. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00321.x.
5. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. Nat Rev Dis Primers 2017;3:17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38.
6. Correa SM & Rengifo AC. Mecanismos moleculares implicados en la destrucción ósea en la periodontitis. Revisión de la literatura. Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral 2013;6(3):142-147.
7. Van Dyke TE. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. Mol Aspects Med 2017;58:21-36. Doi: 10.1016/j.mam.2017.04.006.
8. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. Nat Rev Endocrinol 2011;7(12):738-748. Doi: 10.1038/nrendo.2011.106.
9. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(3):356-365. Doi: 10.1177/10454411000110030501.
10. Moreno Correa S, Contreras Rengifo A. Mecanismos moleculares implicados en la destrucción ósea en la periodontitis: Revisión de la literatura. Rev. Clin. Periodoncia Implantol Rehabil Oral 2013;6(3):142-147.
11. Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA, et al. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. Periodontol 2000 2016;72(1):54-75. Doi: 10.1111/prd.12135.
12. Rethman MP. Inflammation in chronic periodontitis and significant systemic diseases. J Calif Dent Assoc 2010;38(4):247-257.
13. Costa LL, Silva GG, Araújo PH, et al. O papel do sistema imunológico na patogênese da doença periodontal. Pubsaúde, 3, a038. Doi: https://dx.doi.org/10.31533/pubsaude3.a038
14. Gautam DK, Jindal V, Gupta SC, et al. Effect of cigarette smoking on the periodontal health status: A comparative, cross sectional study. J Indian Soc Periodontol 2011;15(4):383-387. Doi: 10.4103/0972-124X.92575.
15. Chang CC, Wu CH, Liu LK, et al. Association between serum uric acid and cardiovascular risk in nonhypertensive and nondiabetic individuals: The Taiwan I-Lan Longitudinal Aging Study Sci Rep 2018;8(1):5234. Doi: 10.1038/s41598-018-22997-0.
16. Buduneli N, Larsson L, Biyikoglu B, et al. Fatty Acid Profiles in Smokers with Chronic Periodontitis. J Dental Res 2011;90(1):47-52. Doi: 10.1177/0022034510380695
17. Gosadi IM, Aloraini NM, Zuair AM, et al. Assessment of the influence of family history of type 2 diabetes or hypertension on the physical activity pattern among young Saudi population aged 15-25 years. Int J Comm Med Public Health

2018;5:1735.
18. Organização Mundial Da Saúde - OMS. Diretrizes sobre medicamentos de segunda e terceira linha e tipo de insulina para o controle da glicemia em adultos não gestantes com diabetes mellitus. Genebra, 2018: OMS.
19. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 6a ed. Belgium: IDF. 2013.
20. Atlas de Diabetes da International Diabetes Federation (IDF) Esboço demográfico e Geográfico. 9ª ed. 2019. Disponível em https://www.diabetesatlas.org/en/sections/demographic-and-geographic-outline.html
21. Organização Mundial Da Saúde (OMS). Diabetes. On line disponível em: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes acesso em 25 de nov. de 2019 e 30 nov. 2019.
22. Sociedade Brasileira De Diabetes (SBD). Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2019-2020, 2019. Editora cientifica CLANAD.
23. Cortez DN, Reis IA, Souza DAS, et al. Complicações e o tempo de diagnóstico do diabetes mellitus com atenção primária. Acta Paulista de Enfermagem 2015; 28(3):250–255. Doi:10.1590/1982-0194201500042
24. Bertoldi AD, Kanavos P, França GV, et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. Global Health 2013;9:62. Doi: 10.1186/1744-8603-9-62.
25. Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, et al. Effect of non-surgical periodontal therapy on C- reactive protein, oxidative stress, and matrix metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-2 levels in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled study. J Periodontol 2012;83(1):3-10. Doi: 10.1902/jop.2011.110148. Epub 2011May 31.
26. Sousa JNL, Nóbrega DR, Araki AT. Perfil e percepção de diabéticos sobre a relação entre diabetes e doença periodontal. Rev Odontol UNESP 2014;43(4): 265–272. doi:10.1590/rou.2014.042.
27. Kinane DF, Stathopoulou PG & Papapanou PN. Doenças periodontais. Nature Reviews Disease Primers 2017;3:17038. Doi:10.1038/nrdp.2017.38
28. Kunnumakkara AB, Banik K, Bordoloi D, et al. Googling the Guggul (Commiphora and Boswellia) for Prevention of Chronic Diseases. Front Pharmacol 2018;9:686. doi: 10.3389/fphar.2018.00686.
29. Ley K. M1 Means Kill, M2 Means Heal. J Immunol 2017;199(7):2191–2193. doi:10.4049/jimmunol.1701135
30. Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. J Innate Immun 2014;6(6):716-726. Doi: 10.1159/000364945.
31. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood. 2010;116(16):e74-e80. Doi: 10.1182/blood-2010-02-258558.
32. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. Blood 1989;74(7):2527-2534.
33. Yang J, Zhang L, Yu C, et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. Biomark Res 2014;2(1):1. Doi: 10.1186/2050-7771-2-1.
34. Shibuya, MD. Avaliação de subpopulações de monócitos e marcadores de ativação na hanseníase e nas reações hansênicas. Salvador 2014. 82 f.

35. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC et al. Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2015;35(6):1306-1316. Doi:10.1161/atvbaha.114.304650.
36. França CN, Izar MCO, Hortêncio MNS, et al. Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. Clin Sci (Lond) 2017;131(12):1215-1224. Doi: 10.1042/CS20170009.
37. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity 2003;19(1):71-82. Doi: 10.1016/s1074-7613(03)00174-2.
38. Nagasawa T, Kobayashi H, Aramaki M, et al. Expression of CD14, CD16 and CD45RA on monocytes from periodontitis patients. J Periodontal Res 2004;39(1):72-78. Doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00713.x.
39. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, et al. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. Blood 2011;118(12):e50-e61. Doi: 10.1182/blood-2011-01- 326827.
40. Ancuta P, Rao R, Moses A, et al. Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+Monocytes. J Experim Medi 2003;97(12):1701-1707. Doi:10.1084/jem.20022156
41. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J Leukoc Biol. 2007;81(3):584-592. Doi: 10.1189/jlb.0806510.
42. Swirski FK. Monocyte recruitment and macrophage proliferation in atherosclerosis. Kardiol Pol 2014;72:311-314. Doi: 10.5603/KP.a2014.0021.
43. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. Blood. 2011;118(5):e16-e31. Doi: 10.1182/blood-2010-12-326355.
44. Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, et al. Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. J Immunol. 2011;186(3):1809-1815. doi: 10.4049/jimmunol.1001866.
45. Loe H, Silness J. Periodontal Disease In Pregnancy. I. Prevalence And Severity. Acta Odontol Scand 1963;21:533-551. Doi: 10.3109/00016356309011240.
46. Silness J, Loe H. Periodontal Disease In Pregnancy. Ii. Correlation Between Oral Hygiene And Periodontal Condtion. Acta Odontol Scand 1964;22:121-135. Doi: 10.3109/00016356408993968.
47. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. J Periodontol 2018;89Suppl1:S159-S172. Doi: 10.1002/JPER.18-0006. Erratum in: J Periodontol 2018;89(12):1475.
48. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. Cell 2013;153(2):362-375. Doi: 10.1016/j.cell.2013.03.010.
49. Corbi SCT, de Vasconcellos JF, Bastos AS, et al. Circulating lymphocytes and monocytes transcriptomic analysis of patients with type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia and periodontitis. Sci Rep 2020;10(1):8145. Doi: 10.1038/s41598-020- 65042-9.
50. Almubarak A, Tanagala KKK, Papapanou PN, et al. Disruption of Monocyte and Macrophage Homeostasis in Periodontitis. Front Immunol 2020;11:330. Doi: 10.3389/fimmu.2020.00330.
51. Oliveira BAO, Silva Jr GF. Evaluation of blood cells counts in patients with chronic periodontitis. Rev Jopic 2019;02(4):92-103.

52. Buhlin K, Hultin M, Norderyd O. Periodontal Treatment Influences Risk Markers for Atherosclerosis in Patients with Severe Periodontitis. Atherosclerosis 2009;206:518-522. Doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.035.
53. Mengel R, Bacher M, Flores-De-Jacoby L. Interactions between stress, interleukin-1beta, interleukin-6 and cortisol in periodontally diseased patients. J Clin Periodontol 2002;29(11):1012-1022. Doi: 10.1034/j.1600-051x.2002.291106.x. PMID: 12472994.
54. Monteiro AM. Influência do tratamento periodontal sobre os marcadores risco para aterosclerose em pacientes com periodontite crônica. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunofisiopatologia da Aterosclerose - São Paulo, 2010.
55. Mayo L, Quintana FJ & Weiner HL. The innate immune system in demyelinating disease. Immun Rev 2012;248(1):170–187. Doi:10.1111/j.1600-065x.2012.01135.x.
56. He J, Shen X, Fu D, et al. Human periodontitis-associated salivary microbiome affects the immune response of diabetic mice. J Oral Microbiol 2022;14(1):2107814. Doi: 10.1080/20002297.2022.2107814.
57. Li Q, Ouyang X, Lin J. The impact of periodontitis on vascular endothelial dysfunction. Front Cell Infect Microbiol 2022;12:998313. Doi: 10.3389/fcimb.2022.998313.
58. Carrizales-Sepúlveda EF, Ordáz-Farías A, Vera-Pineda R, et al. Congestive Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in a Patient with Light Chain (AL) Amyloidosis and Multiple Myeloma. Am J Case Rep 2017;18:790-793. Doi: 10.12659/ajcr.904295.
59. Noz MP, Plachokova AS, Smeets EMM, et al. An Explorative Study on Monocyte Reprogramming in the Context of Periodontitis In Vitro and In Vivo. Front Immunol 2021;12:695227. Doi: 10.3389/fimmu.2021.695227.
60. Yang M, Gan H, Shen Q, et al. Proinflammatory CD14+CD16+ Monocytes are Associated with Microinflammation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy Uremia. Inflammation 2011;35(1):388-396. Doi:10.1007/s10753-011- 9374-9.
61. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. Nat Rev Immunol 2021;21(7):426-440. Doi: 10.1038/s41577-020-00488-6.
62. Jagannathan R, Lavu V, Rao SR. Comparison of the proportion of non-classic (CD14+CD16+) monocytes/macrophages in peripheral blood and gingiva of healthy individuals and patients with chronic periodontitis. J Periodontol 2014;85(6):852-858. Doi: 10.1902/jop.2013.120658.
63. Nagasawa T, Kobayashi H, Aramaki M, et al. Expression of CD14, CD16 and CD45RA on monocytes from periodontitis patients. J Periodontal Res 2004;39(1):72-78. Doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00713.x.
64. Brown JL, Johnston W, Delaney C, et al. Biofilm-stimulated epithelium modulates the inflammatory responses in co-cultured immune cells. Sci Rep. 2019;9(1):15779. Doi: 10.1038/s41598-019-52115-7.

ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO - UNISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel dos subtipos de monócitos, micropartículas circulantes e quimiocinas na Doença Periodontal associada ao Diabetes

Pesquisador: Carolina Nunes França

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 20616219.8.0000.0081

Instituição Proponente: Universidade de Santo Amaro - UNISA

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.580.518

Apresentação do Projeto:

Esta pesquisa visa um maior entendimento da relação entre subtipos de monócitos, micropartículas circulantes e quimiocinas na Doença Periodontal, bem como possíveis modificações nesses biomarcadores induzidas pelo tratamento periodontal. A identificação, quantificação e caracterização fenotípica de subtipos de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) e micropartículas circulantes (plaquetárias, endoteliais e monocíticas) serão realizadas por citometria de fluxo no
basal e 30 dias após o término do tratamento periodontal não cirúrgico, em pacientes com Doença Periodontal associada ou não ao Diabetes. Também será realizada a análise das quimiocinas MCP-1 e RANTES por Imunoensaio Multiplex, no fluido gengival. O maior entendimento do papel diferenciado dos subtipos de monócitos, micropartículas e quimiocinas MCP-1 e RANTES na Doença Periodontal poderá se constituir em novo alvo estratégico para melhor compreensão dos mecanismos inflamatórios associados à doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o efeito do tratamento Periodontal não cirúrgico em relação aos subtipos de monócitos, micropartículas circulantes e quimiocinas, na
presença ou não de Diabetes.

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340
Bairro: Jardim das Imbuias **CEP:** 02.450-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2141-8687 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

Objetivo Secundário: Em pacientes com Doença Periodontal, na presença ou não de Diabetes:• Identificar e caracterizar fenotipicamente as três subpopulações de
monócitos circulantes (clássicos, intermediários e não-clássicos) por citometria de fluxo, na visita inicial e 30 dias após o término do tratamento periodontal não cirúrgico;• Avaliar os níveis de micropartículas circulantes (plaquetárias, endoteliais emonocíticas) por citometria de fluxo, ao longo do tratamento periodontal (basal e 30 dias);• Quantificar os níveis das quimiocinas MCP-1 e RANTES por Imunoensaio Multiplex no fluido gengival, no basal e 30 dias após o término do tratamento periodontal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Desconforto durante as coletas de sangue e fluido gengival e também ao longo do tratamento periodontal.

Benefícios: Como benefício direto ao paciente: Tratamento da doença periodontal. Benefícios relacionados aos achados do estudo: maior compreensão dos
biomarcadores cardiovasculares que podem estar associados, especificamente, à Doença Periodontal, relacionada ou não ao Diabetes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Descrição dos objetivos e hipóteses a serem testadas: De acordo
- Metodologia: De acordo
- Análise crítica de riscos e benefícios: necessário classificação como risco médio por lidar com coleta de sangue.
- Duração total da pesquisa, a partir da aprovação (cronograma): De acordo
- orçamento financeiro detalhado da pesquisa: De acordo

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: de acordo;
- Metodologia: adequada;
- Riscos: adequado;
- TCLE: adequado;
- Cronograma: adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340
Bairro: Jardim das Imbuias **CEP:** 02.450-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2141-8687 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1429481.pdf	11/09/2019 13:45:41		Aceito
Folha de Rosto	FRCarolinaNunes.pdf	11/09/2019 13:43:57	Carolina Nunes França	Aceito
Outros	Anuencia.pdf	11/09/2019 13:40:42	Carolina Nunes França	Aceito
Outros	Coparticipante.pdf	05/09/2019 12:58:58	Carolina Nunes França	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFAPESP2019UNISA.doc	05/09/2019 11:54:40	Carolina Nunes França	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoFapespEtica.pdf	05/09/2019 09:18:28	Carolina Nunes França	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 17 de Setembro de 2019

Assinado por:
Ana Paula Ribeiro
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340
Bairro: Jardim das Imbuias **CEP:** 02.450-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2141-8687 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br