



UNIVERSIDADE SANTO AMARO – UNISA

Mestrado em Ciências da Saúde

Steffany Bernardo Oliveira

**EFEITO DO TRATAMENTO NÃO CIRÚRGICO NA PERIODONTITE
ASSOCIADA AO DIABETES SOBRE MARCADORES
IMUNE/INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO**

São Paulo

2023

Steffany Bernardo Oliveira

**EFEITO DO TRATAMENTO NÃO CIRÚRGICO NA PERIODONTITE
ASSOCIADA AO DIABETES SOBRE MARCADORES
IMUNE/INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Nunes França

Coorientador: Prof. Dr. André Luis Lacerda Bachi

São Paulo

2023

O51e

Oliveira, Steffany Bernardo.

Efeito do tratamento não cirúrgico na periodontite associada ao diabetes sobre marcadores imune/inflamatórios e de estresse oxidativo / Steffany Bernardo Oliveira. - 2023.

55 p.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Nunes França.

Co-orientador: Prof. Dr. André Luís Lacerda Bachi

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Santo Amaro, 2023.

Bibliografia incluída.

1. Periodontite. 2. Diabetes. 3. Citocinas. I. França, Carolina Nunes. II. Bachi, André Luís Lacerda. III. Título.

CDD 617.632

Steffany Bernardo Oliveira

**EFEITO DO TRATAMENTO NÃO CIRÚRGICO NA PERIODONTITE
ASSOCIADA AO DIABETES SOBRE MARCADORES
IMUNE/INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Orientadora: Profa. Dra. Carolina Nunes França

Cidade de São Paulo, 06 de novembro de 2023.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marina Tiemi Shio

Profa. Dra. Débora Heller

Profa. Dra. Carolina Nunes França

Conceito Final: _____

A Deus, que com a sua infinita bondade têm cumprido Suas promessas na minha vida.

Aos meus filhos Davi e Luca, diante de toda dificuldade vocês são a minha maior fonte de amor e alegria.

Ao meu esposo Samuel, além de melhor amigo sempre me incentivou a buscar mais e esteve comigo em todos os momentos desde a graduação.

A minha mãe Marta, que deixou de viver alguns de seus sonhos para que os meus pudessem se cumprir. Cada passo que eu der te levarei comigo.

A minha rede de apoio, incluindo toda a minha família. Vocês são o meu combustível e me proporcionaram tudo para que eu pudesse seguir meus sonhos.

As minhas amigas, vocês tornaram essa caminhada mais leve e cheia de alegria.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Carolina Nunes França, por acreditar em mim, pela paciência e por me proporcionar mais aprendizado e experiências incríveis para que o nosso projeto fosse concluído.

A Dra. Margareth, pela importante contribuição com o estudo.

Ao Pesquisador Dr. Jônatas Bussador do Amaral, responsável pela orientação e ajuda durante os processos de análises, sem ele essa pesquisa não seria possível.

Ao meu coorientador Dr. André Bachi, por todo o suporte e conhecimento compartilhado. Seus ensinamentos foram essenciais.

Aos meus parceiros de pesquisa, pelo comprometimento, convivência e aprendizado.

As periodontistas Dra. Debora Pallos e Dra. Yeon Jung Kim, por conduzir a avaliação, diagnóstico e tratamento periodontal, auxiliando na execução deste estudo.

Aos participantes do estudo, por aceitarem e contribuírem para a concretização desta pesquisa.

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para
todo o propósito debaixo do céu.”*

RESUMO

Introdução: A periodontite é um processo inflamatório que pode levar à perda dentária e disseminação sistêmica de bactérias, ocasionando outros distúrbios como Diabetes Mellitus e Doenças Cardiovasculares que possuem uma relação bidirecional com a periodontite. Algumas citocinas pró-inflamatórias como IL-6 estão elevadas em pacientes com Periodontite e o mesmo ocorre com Diabetes, um fator importante pois essa molécula induz síntese de outras quimiocinas que atuam na diapedese e quimiotaxia e transmigração de monócitos e outras atividades, possibilitando a associação com outras condições sistêmicas como as DCV, o mesmo ocorre com o TNF- α que além de ativar citocinas e quimiocinas, ativa diretamente o fator de transcrição kappa B, que compromete a captação de glicose e promove resistência a insulina. A presença de peróxidos em níveis elevados na saliva destes pacientes compromete a regeneração tecidual bucal se a capacidade antioxidante estiver comprometida. **Objetivos:** Avaliar as citocinas no FCG e biomarcadores salivares (citocinas IL-6, IL-10, IFN-gama, TNF- α), peptídeos antimicrobianos (catelicidina e lisozima); imunoglobulina (IgA secretora) e estresse oxidativo (peróxidos totais e capacidade antioxidante total (TAC), ao longo do tratamento periodontal (basal e 30 dias). **Métodos:** Vinte e três amostras de FCG foram coletadas entre 2019 e 2022. Os pacientes foram classificados com periodontite grau B e grau C com Diabetes (N=16) e sem Diabetes (N=9). Foram avaliadas as concentrações das citocinas no FCG pelo Ensaio Multiplex-Luminex e as concentrações salivares das citocinas, do peptídeo antimicrobiano, da lisozima, da IgA secretora, dos peróxidos totais e da capacidade antioxidante total foram submetidas ao método ELISA e absorvância. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças significantes no FCG nas comparações intragrupos (Teste de Wilcoxon, basal comparado a 30 dias após o término do tratamento), bem como nas comparações intergrupos (Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, Com e Sem Diabetes). Na análise intragrupo (Teste T de Student pareado), enquanto as concentrações salivares de lisozima ($p=0,0260$) e de IL-10 ($p=0,0034$) mostraram-se significativamente reduzidas após o tratamento, houve aumento de TNF- α ($p=0,0443$) pós-tratamento quando comparado aos valores basais no grupo Com Diabetes. Além disso, as concentrações salivares de TNF- α ($p=0.0313$) observadas no grupo Sem Diabetes foram menores do que no basal. Foi observada

diferença significativa entre as concentrações salivares nos grupos Sem e Com Diabetes pós-tratamento ($p=0,008$). Com relação à análise intragrupo, foi possível evidenciar aumento das razões entre IL-6/IL-10 ($p=0,0134$) e IFN-gama/IL-10 ($p=0,0313$) no grupo Sem Diabetes e da razão TNF-alfa/IL-10 ($p=0,003$) após tratamento quando comparados aos valores observados no basal. Na análise intergrupos (Testes ANOVA de fator único com pós-teste de Tukey), foi verificada maior razão de TNF-alfa/IL-10 ($p=0,0418$) no grupo Com Diabetes do que no grupo Sem Diabetes após tratamento. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na razão entre as concentrações salivares dos peróxidos totais e da TAC. **Conclusão:** Foram mostrados diferentes efeitos, em curto prazo, do tratamento não cirúrgico da Periodontite em indivíduos que apresentavam ou não diabetes. Melhora do estado inflamatório salivar no grupo sem Diabetes, o que não foi encontrado no grupo com Diabetes.

Palavras chaves: Periodontite, Diabetes, Citocinas, Fluido crevicular gengival e Saliva.

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is an inflammatory process that can lead to tooth loss and systemic dissemination of bacteria, causing other disorders such as Diabetes Mellitus and Cardiovascular Diseases that have a bidirectional relationship with periodontitis. Some pro-inflammatory cytokines such as IL-6 are elevated in patients with Periodontitis and the same occurs with Diabetes, an important factor as this molecule induces the synthesis of other chemokines that act in diapedesis and chemotaxis and transmigration of monocytes and other activities, enabling the association with other systemic conditions such as CVD, the same occurs with TNF- α , which in addition to activating cytokines and chemokines, directly activates the kappa B transcription factor, which compromises glucose uptake and promotes insulin resistance. The presence of peroxides at high levels in the saliva of these patients compromises oral tissue regeneration if the antioxidant capacity is compromised. **Objectives:** To evaluate cytokines in GCF and salivary biomarkers (cytokines IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α), antimicrobial peptides (cathelicidin and lysozyme); immunoglobulin (secretory IgA) and oxidative stress (total peroxides and total antioxidant capacity (TAC), throughout periodontal treatment (baseline and 30 days). **Methods:** Twenty-three FCG samples were collected between 2019 and 2022. Patients were classified with moderate to severe periodontitis with Diabetes (N=16) and without Diabetes (N=9). The concentrations of cytokines in the FCG were evaluated using the Multiplex-Luminex Assay and the salivary concentrations of cytokines, antimicrobial peptide, lysozyme, IgA secretion, total peroxides and total antioxidant capacity were subjected to the ELISA and absorbance method. **Results:** No significant differences were found in FCG in intragroup comparisons (Wilcoxon test, baseline compared to 30 days after the end of treatment), as well as in intergroup comparisons (Kruskal-Wallis test with Dunn post-test, with and without diabetes). (p=0.0034) were significantly reduced after treatment, there was an increase in TNF- α (p=0.0443) post-treatment when compared to baseline values in the Diabetes group. Furthermore, the salivary concentrations of TNF- α (p=0.0313) observed in the No Diabetes group were lower than at baseline. A significant difference was observed between salivary concentrations in the groups Without and With Diabetes post-treatment (p=0.008). Regarding the intragroup analysis, it was possible to demonstrate an increase

in the ratios between IL-6/IL-10 ($p=0.0134$) and IFN-gamma/IL-10 ($p=0.0313$) in the Without Diabetes group and the TNF ratio -alpha/IL-10 ($p=0.003$) after treatment when compared to values observed at baseline. In the intergroup analysis (one-way ANOVA tests with Tukey's post-test), a higher ratio of TNF-alpha/IL-10 ($p=0.0418$) was found in the With Diabetes group than in the Without Diabetes group after treatment. No significant difference was found in the ratio between salivary concentrations of total peroxides and TAC. **Conclusion:** Different short-term effects of non-surgical treatment of Periodontitis were shown in individuals with or without diabetes. Improvement in salivary inflammatory status in the group without Diabetes, which was not found in the group with Diabetes.

Keywords: Periodontitis, Diabetes, Cytokines, Gingival Crevicular Fluid and Saliva.

Lista de Abreviações e Siglas

ADA - American Diabetes Association

CAT - Capacidade antioxidante total

CCL2 - C-C quimiocina ligante 2

DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2

DCV - Doenças Cardiovasculares

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

EROs - Espécies reativas de oxigênio

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

FCG - Fluido Crevicular Gengival

HbA1c - Hemoglobina glicada

Ig - Imunoglobulinas

IFN- γ - Interferon-gama

IL - Interleucina

JEC - Junção esmalte-cimento

MG - Margem gengival

VCAM-1 - Molécula de adesão celular vascular 1

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular-1

MCP-1 - Monocyte Chemoattractant Protein-1

NCI - Nível clínico de inserção

AMPs - Peptídeos antimicrobianos

PS - Profundidade de sondagem

PCR - Proteína C Reativa

PBS - Solução isotônica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Periodontite: aspectos gerais	16
1.2 Diabetes <i>Mellitus</i> e Periodontite	18
1.3 Doenças Cardiovasculares e Periodontite	19
1.4 Resposta imune: Interleucinas no Fluido Crevicular Gengival	20
1.5 Resposta imune: Interleucinas e compostos da saliva	22
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivo específico	29
4. MÉTODOS	30
4.1 Desenho do Estudo	30
4.2 Cálculo do Tamanho Amostral	31
4.3 Avaliação Clínica Periodontal e Tratamento Periodontal	31
4.4 Coleta das Amostras do Fluido Gengival Crevicular	32
4.5 Quantificação de Quimiocinas no Fluido Crevicular Gengival	33
4.6 Coleta das Amostras de saliva	33
4.7 Análise salivar das interleucinas	34
4.8 Análise salivar da Capacidade Antioxidante Total	34
4.9 Análise salivar do Peróxido	35
4.10 Análise estatística	35
4.11 Aspectos Éticos	36
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	51

REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO A – PARECER SUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Periodontite: aspectos gerais

A Periodontite caracteriza-se por uma doença imuneinflamatória crônica consequência de uma disbiose microbiana que afeta o periodonto.¹⁻² Desenvolve-se uma infecção induzida por bactérias, sendo mundialmente a segunda maior causa de doença da cavidade oral na população humana, com prevalência maior em indivíduos adultos.² De acordo com o *Global Burden of Disease Study* (2016), a Periodontite grau C foi a 11ª condição mais prevalente no mundo, está associada à perda dentária e compreende de 10 a 15% dos casos mundiais.³⁻⁴ Nos EUA, estudos indicam que aproximadamente metade da população é acometida pela doença.⁵

Entre os anos de 1990 a 2010 houve um aumento significativo de 57,3% da incidência Global de Periodontite e estima-se um aumento nos próximos 10 anos decorrente do crescente índice de envelhecimento da população.⁴⁻⁶ Em um estudo epidemiológico verificou-se a maior prevalência de Periodontite crônica na população idosa (82%), adultos (73%) e adolescentes (59%).⁷ Além da perda natural dos dentes nessa população, a Periodontite está associada a outras condições sistêmicas comuns como o Diabetes e Doenças Cardiovasculares (DCV), que possuem uma maior prevalência na população com maior idade.⁸

A Periodontite é uma complicação da Gengivite (inflamação na gengiva), que em resposta à infecção bacteriana pode levar à perda de colágeno conforme a lesão aumenta. Portanto, ocorre uma reação inflamatória destrutiva, onde o potencial evolutivo contínuo da doença e sua cronicidade com períodos de exacerbação, resultam na destruição dos tecidos de sustentação e proteção dos elementos do periodonto (osso alveolar, ligamento periodontal e o cemento radicular), perda do rebordo alveolar, migração apical do epitélio juncional e formação de bolsas periodontais, afetando as estruturas de suporte dos dentes juntamente com a perda do ligamento periodontal e

reabsorção do osso alveolar, gerando mobilidade dentária, perda da função mastigativa, distúrbios estéticos e, se não tratada, ocorre esfoliação dentária.^{5,9,10}

A resposta exacerbada do hospedeiro à inflamação periodontal induz a essa disbiose microbiana das regiões submarginal e subgingival, onde o biofilme está depositado gerando resposta inflamatória.¹¹ O biofilme dental é uma película granular composta por bactérias e seus produtos, células descamadas e o dextran (polímero extracelular), que se forma na superfície oral, sendo que a quantidade e os tipos de microrganismos presentes variam de indivíduo para indivíduo.¹²

Um complexo de bactérias presentes na cavidade oral e oito espécies têm sido consistentemente associadas à Periodontite, incluindo *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *E. nodatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*, que produzem e liberam componentes da superfície celular no sulco gengival e na cavidade oral, alterando o pH no sulco gengival, e acredita-se que isso ocorra pela degradação bacteriana de proteínas, precipitando sais de cálcio na saliva e no Fluido Crevicular Gengival (FCG), com efeitos diretos ou indiretos nas células hospedeiras, afetando a resposta imune.¹² Por se tratar de uma doença que possui remissão com o tratamento e cronicidade caso não tratada, em longo prazo a resposta imune encontra-se aumentada e é moldada pelas alterações epigenéticas e metabólicas que evolutivamente conservadas promovem a sobrevivência do hospedeiro após a reinfecção, no entanto, essa resposta pode aumentar a inflamação crônica de forma danosa, assim como ocorre nas doenças cardiometabólicas, nas quais o aumento da atividade hematopoiética da medula óssea ocasiona leucocitose persistente e contribui para sua cronicidade.¹⁰⁻¹²

As reações diretas ocorrem quando a bactéria ou extrato bacteriano induzem diretamente uma célula a produzir respostas específicas, gerando aumento do FCG contendo produtos de degradação do colágeno e os fatores imunológicos do hospedeiro, incluindo imunoglobulinas, complemento, proteínas séricas, citocinas e quimiocinas, também são encontradas quantidades aumentadas de resíduos de células imunes,

células do epitélio de bolsa descamada e peptídeos de colágeno abundantes, provenientes da degradação do colágeno gengival por metaloproteinases de matriz.^{11,12}

A inflamação associada à Periodontite possivelmente decorre da disseminação hematogênica das bactérias periodontais ou do montante de mediadores inflamatórios dos tecidos periodontais para a corrente sanguínea, ocasionando distúrbios sistêmicos.¹²

1.2 Diabetes *Mellitus* e Periodontite

O Diabetes está incluído entre as síndromes metabólicas de maior impacto na saúde, com prevalência mundial em cerca de 7%. Possui etiologia múltipla e compreende alterações sistêmicas decorrentes de uma hiperglicemia e valores de hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$, conforme diretrizes da *American Diabetes Association* (ADA),¹³ gerando manifestação consistente associada à deficiência de insulina atribuída à destruição de células beta-pancreáticas e/ou pela produção insuficiente de insulina, atribuídos a fatores genéticos ou pela dificuldade do organismo de utilizar a insulina produzida de maneira eficiente, associada aos hábitos alimentares do indivíduo, que caracterizam Diabetes *Mellitus* tipos 1 e 2.¹⁴ A estimativa atual é de que no ano de 2021 cerca de 537 milhões de adultos no planeta foram afetados e a prevalência está projetada para aumentar cerca de 50% até o ano de 2030.¹³⁻¹⁴

Desde 1993 sabe-se da associação entre Diabetes e Periodontite.¹⁵ Vários mecanismos evidenciam a relação bidirecional entre as doenças, de forma que pacientes com Diabetes tendem a desenvolver Periodontite e o mesmo ocorre com indivíduos com Periodontite, que representa uma ameaça às estruturas de suporte dos dentes por meio de uma resposta inflamatória microbiana e imunomediada, na qual ocorrem alterações nos processos vasculares, celulares e de reparo do hospedeiro, comprometimento em todas as estruturas que constituem o periodonto, gerando uma resposta intensificada do sistema imunológico mediada por quimiocinas, que por meio da quimiotaxia recrutam um número abundante de leucócitos como monócitos e linfócitos para combater as bactérias do biofilme bacteriano, elevando os níveis de IL-6 e Proteína C Reativa (PCR).^{14,16-17}

Alguns trabalhos evidenciam que o processo induzido pela resposta imune do hospedeiro afeta negativamente o controle glicêmico e acarreta piora nas complicações do Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) e do Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2), decorrentes das alterações microvasculares, no fluido crevicular, estrutura e função do colágeno, que comprometem a regeneração tecidual, alterações das espécies bacterianas subgengival, alterações epigenéticas e glicação enzimática, ocasionando uma resposta imune exacerbada, incitada por meio do combate aos patógenos locais que alteram o processo inflamatório, desregulação na quimiotaxia e adesão, hiper-reatividade de monócitos e apoptose prematura de leucócitos polimorfonucleares, estimulando um aumento da resposta pró-inflamatória, que intensifica a erosão do tecido periodontal e disseminação hematogênica do montante bacteriano.¹⁸

1.3 Doenças Cardiovasculares e Periodontite

O surgimento de distúrbios sistêmicos associados à Periodontite tem se tornado recorrente e cada vez mais estudos relacionam essas condições com a Periodontite, incluindo as DCV.⁸ Os patógenos periodontais possuem capacidade de destruir o epitélio da bolsa periodontal, permitindo a entrada de endotoxinas e exotoxinas nocivas na corrente sanguínea onde essa disseminação bacteriana e infecção sistêmica provocam complicações ao hospedeiro e estudos detectaram esses patógenos em diferentes tecidos e órgãos do sistema cardiovascular.¹⁹

As DCV estão entre as principais causas de morte na população mundial,²⁰ implicando nos setores de saúde e econômico devido à alta taxa de mortalidade e internação hospitalar, gerando custo elevado aos sistemas de saúde. Entre os fatores de risco associados à incidência e complicações das DCV estão os hábitos alimentares, sedentarismo e obesidade, tabagismo e na última década a Periodontite também tem sido associada aos fatores de risco.²¹

Em contextos clínicos a relação potencial entre DCV e Periodontite tem sido observada, no entanto, o mecanismo detalhado que conecta as duas doenças ainda não

foi esclarecido. É sabido que patógenos periodontais conseguem invadir diretamente órgãos e tecidos do sistema cardiovascular. Louhelainen et al. relataram em 2014 que nos fluídos pericárdicos de pacientes com pericardite, houve uma relação positiva para bactérias relacionadas à endocardite (aproximadamente 60% dos pacientes) e na coorte restante (40%) foi positiva para patógenos periodontais.²² Outros relatos mostram que esses patógenos também são capazes de invadir paredes arteriais e colonizar placas ateroscleróticas.²³ Dessa forma, esses dados contribuem para elucidar a possível relação entre Periodontite e DCV.

O principal patógeno envolvido na Periodontite é o *Porphyromonas gingivalis*, responsável por induzir agregação plaquetária e expressão de várias moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e p-selectina.²¹ Li et al. (2000) mostrou que a protease liberada pela *Porphyromonas gingivalis*, um dos principais patógenos envolvidos na Periodontite grau B e C causou DCV pela ativação da proteína C, fator X e protrombina.²⁴ Esses mecanismos de ação levam à agregação plaquetária e formação de coágulos trombóticos, há também um aumento dos níveis sistêmicos da concentração de mediadores inflamatórios, como interleucinas e quimiocinas de monócitos. Essas são algumas evidências que possibilitam um possível esclarecimento da relação entre as duas doenças.²³⁻²⁴

1.4 Resposta imune: Interleucinas no Fluido Crevicular Gengival

Os microrganismos presentes no biofilme são fatores essenciais para o início da Periodontite, no entanto, a progressão da doença e a perda alveolar estão relacionadas não somente a esses patógenos, mas também à resposta do hospedeiro sistêmica e principalmente local.²⁵

O FCG é um importante complexo de misturas de substâncias do soro sanguíneo, leucócitos, células estruturais do periodonto e microrganismos orais. A identificação de

biomarcadores nesse fluido é uma importante abordagem para melhorar a capacidade de diagnóstico e prognóstico dos pacientes.²⁶

Na Periodontite, a resposta inflamatória que ocorre no FCG é induzida principalmente por interleucinas que são citocinas produzidas especialmente por linfócitos T e outros leucócitos que neste sítio possuem capacidade de modular a infecção.²⁶⁻²⁷

Dentre as citocinas no FCG, provavelmente a que possui maior relevância seja a IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória que desempenha papel fundamental na inflamação e imunidade, aumenta a expressão de enzimas colagenolíticas, que contribuem para a degradação da matrix extracelular, reabsorção óssea e destruição tecidual.²⁸ Nędzi-Góra et. al (2020) realizaram um estudo que incluiu 30 indivíduos com Periodontite grau moderado e 19 indivíduos com Periodontite em grau severo e analisaram as concentrações de IL-1 β no FCG pelo método ELISA e de acordo com os dados obtidos, essas concentrações foram semelhantes em ambos os grupos, sugerindo que o grau de Periodontite não pode ser diferenciado apenas de acordo com a análise da concentração de IL-1 β no FCG.²⁹

Gündoğar et. al em 2021 estudaram níveis de interleucinas no FCG comparando grupos com Gengivite, Periodontite e saudáveis e identificaram que os níveis de interleucinas como IL-6 estavam significativamente maiores no FCG dos indivíduos com DP.²⁷ Uma relação importante sobre os níveis elevados de IL-6 é que essa molécula regula a transcrição da inflamação aguda para crônica e induz a síntese de CCL2 (C-C quimiocina ligante 2) ou MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), que estimula a síntese de integrina necessária para quimiotaxia e controle da transmigração de monócitos e outras atividades associadas à diapedese, incluindo o fluxo de Ca²⁺,³⁰ fatores importantes para possíveis associações com outras condições sistêmicas como DCV.

O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos ativados, macrófagos e osteoblastos e está relacionado com a reabsorção óssea e estímulo dos fibroblastos produtores de colagenase.³¹ Um estudo publicado em 2021 verificou maior concentração de TNF- α no FCG em pacientes com Periodontite Grau B em comparação com indivíduos periodontalmente saudáveis.³²

Em relação às interleucinas, existem muitos achados conflitantes com relação aos níveis dessas moléculas no FCG. Gamonal et al. (2000) relataram diminuição nas quantidades totais de IL-10 após intervenção periodontal não cirúrgica, enquanto Del Peloso Ribeiro et al. (2008) encontraram aumento significativo de IL-10 após a intervenção e Goutoudi et al. (2004) não conseguiram encontrar diferenças nos níveis de IL-10 no FCG entre os sítios com Periodontite e sítios não doentes seguidos do tratamento.³³⁻³⁵

Oliveira et al. (2012) realizaram um estudo avaliando as citocinas Interferon-gama (IFN- γ), IL-10, IL-1 β , IL-2, IL-6 e TNF- α presentes no FCG após terapia periodontal em indivíduos com Periodontite grau C generalizada, foram coletadas até 14 amostras no FCG de cada indivíduo, dentre os 24 participantes do estudo, e os resultados indicaram que houve melhora dos perfis de citocinas no FCG desses pacientes apenas para IL-1 β e aumento de IL-10, para as outras citocinas não houve diferenças significantes.³⁶

Alguns achados mostram relevante diminuição no total de IL-8, IL-17, IL-4, CCL5 e TNF- α no FCG após terapia não cirúrgica.^{26,33} Um dos fatores que implica essa variabilidade de resultados são os diferentes métodos usados nos estudos, tempo de tratamento e segunda coleta, além da resposta individual de cada hospedeiro.

1.5 Resposta imune: Interleucinas e compostos da saliva

A resposta imune é regulada de diversas formas e um componente inicial da cascata de eventos é a secreção de proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMPs) pelas glândulas salivares, células epiteliais e neutrófilos.³⁷ Conhecidos como peptídeos de

defesa do hospedeiro, fazem parte da resposta imune inata encontrada em todas as fases da vida.

Nos fluidos orais são encontradas mais de 1100 proteínas e AMPs. Os AMPs conhecidos pertencem a seis famílias funcionais: Peptídeos catiônicos, Aglutinação e adesão bacteriana, Quelantes de íons metálicos, Peroxidades, Inibidores de protease e AMPs com atividade contra paredes celulares bacterianas.³⁸ Essa variabilidade de funções é uma estratégia bem-sucedida contra a resistência bacteriana ao AMP e a ausência de um único AMP pode levar ao aumento da Periodontite.³⁷

A principal fonte de AMPs são os grânulos de neutrófilos. Dentro desses grânulos existem proteínas e algumas delas encontradas na saliva e no FCG em concentrações superiores à concentração inibitória mínima para bactérias orais incluem adrenomedulina, elafina, estatina, lisozima e mieloperoxidase.³⁸ Em alguns casos em que os AMPs foram medidos na saliva, a regulação negativa foi mensurada por meio da degradação proteolítica do AMP por proteases bacterianas. Ainda não está elucidado se essa regulação da expressão de AMP é uma resposta funcional ao estímulo bacteriano ou se faz parte de uma estimulação mais geral das células-alvo.³⁹

Defensinas, histatinas e hCAP18/LL-37 são AMPs pertencentes a componentes-chave da defesa antimicrobiana da mucosa e foram inicialmente identificadas na infiltração de neutrófilos na cavidade oral, glândulas salivares e no epitélio gengival. Essas substâncias podem se agregar de maneira dependente da concentração, e isso pode enfraquecer a sensibilidade dos métodos dependendo do anticorpo de escolha.³⁹

A lisozima é um tipo de AMP, uma enzima que está presente em secreções como lágrima e saliva, variando em peso molecular, sequência de aminoácidos e propriedades enzimáticas, atuando na ação antimicrobiana. Ela causa a quebra das paredes bacterianas e atua principalmente sobre bactérias gram-positiva, e quando submetida à desnaturação por meio de aquecimento ou mudança do pH pode atuar contra bactérias gram-negativas.⁴⁰

A atividade de lisozima salivar com base em dados clínicos foi descrita em um estudo com sensibilidade e especificidade de 100%, indicando a gravidade da inflamação na Periodontite e atuando como possível biomarcador salivar.⁴¹ Katsiki P et al. compararam possíveis biomarcadores alvo e foi observado que a lisozima avaliada na saliva obteve uma atividade elevada no grupo controle pré-tratamento.⁴²

As respostas imunes adaptativas são ativadas para prevenir a invasão microbiana nos tecidos ao redor dos dentes ou na circulação, gerando condições sistêmicas. As imunoglobulinas (Ig), também conhecidas como anticorpos, são glicoproteínas do tipo gamaglobulina, a fração de globulinas mais abundante no plasma sanguíneo. Podem ser encontradas em forma solúvel no sangue e outros fluidos corporais.⁴³

Sistemas específicos de anticorpos como a IgA são encontrados em maiores concentrações na saliva, lágrimas, secreções respiratórias e gástricas, além do leite materno. A análise por meio da saliva fornece um método simples e não invasivo para avaliação de níveis de IgA locais na Periodontite, onde são encontrados em alta concentração em comparação com as IgM.⁴⁴

Pietiäinen M et al. (2019) realizaram um estudo onde determinaram a partir do sobrenadante de saliva obtido após centrifugação níveis de IgA de cinco espécies bacterianas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* e *P. endodontalis*, onde as IgA salivares mostraram estar em concentrações altas contra os antígenos bacterianos em pacientes com condições endodônticas incluindo Periodontite.⁴⁴

Um estudo realizado no Brasil analisou os níveis salivares de IgA em pacientes com e sem Diabetes, onde foi observada nos indivíduos diabéticos uma variabilidade onde: 53,6% (N=22) apresentaram níveis baixos de IgA salivar, 36,6% (N=15) apresentaram níveis dentro da normalidade e 9,8% (N=4) apresentaram níveis elevados de IgA no fluido salivar.⁴⁵

Doenças sistêmicas como Diabetes e DCV podem modular as respostas do hospedeiro, criando uma relação bidirecional entre as doenças. A relação entre os níveis de IgA e susceptibilidade à Periodontite em pacientes nessas condições sistêmicas não é bem compreendida, e os estudos realizados até o presente momento têm apresentado resultados antagônicos.^{44,45}

A saliva possui um amplo conjunto de oxidantes, incluindo ácido úrico, vitamina C, glutathiona reduzida, glutathiona oxidada e outros.⁴⁶ Tais antioxidantes atuam em conjunto e a capacidade antioxidante total (CAT) é uma medida que avalia a capacidade de um sistema biológico de forma global para neutralizar os radicais livres e promover proteção às células dos danos oxidativos, sendo um parâmetro mais relevante para avaliar as capacidades de defesa que ocorrem localmente na cavidade oral, especificamente, na saliva.⁴⁷

Alguns fatores sistêmicos relacionam a periodontite e Diabetes. No entanto, os dados acerca da CAT medida na saliva em pacientes com e sem Diabetes na presença de periodontite são conflitantes. Gowri e colaboradores (2013) avaliaram a CAT na saliva em pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) com e sem periodontite, onde a CAT foi inversamente proporcional à gravidade da inflamação, sugerindo que a periodontite tem um efeito negativo no estado oxidativo já comprometido de pacientes com DM2.⁴⁸ Estudos mais antigos sugerem que os níveis de CAT produzidos nos diabéticos estão associados à regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, complicações diabéticas e resistência à insulina.^{49,50,51}

Outro estudo publicado no ano de 2013 observou que a CAT na saliva foi significativamente menor em pacientes diabéticos com periodontite em comparação com o grupo controle saudável, indicando que a hiperglicemia crônica resultou na saturação da capacidade antioxidante celular, com a estimulação contínua de vias de sinalização celular sensíveis ao redox e a ativação de vias bioquímicas associadas ao desenvolvimento de diabetes e complicações da doença.⁵²

O oxigênio é necessário para a sobrevivência dos organismos vivos, no entanto, é potencialmente tóxico, pois possui natureza altamente reativa e é capaz de se tornar parte das moléculas prejudiciais chamadas radicais livres.⁵³ A presença de peróxido na saliva de pacientes diabéticos com periodontite pode ser um indicador de estresse oxidativo, que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo para neutralizá-las.⁵³ As EROs levam à peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática, formando o radical peróxido lipídico, que pode gerar perda das funções da membrana. Há evidências crescentes de capacidade antioxidante comprometida nos tecidos e fluidos periodontais, o que pode ser um fator complementar para a destruição tecidual na periodontite.⁵⁴

Acquier et al. (2016) encontraram associação positiva entre EROs e periodontite Grau C na saliva, sugerindo que esta seja um grande contribuinte para a doença periodontal e este estudo esteve intimamente associado ao estado clínico periodontal com aumento da perda de inserção clínica e profundidade de sondagem. No entanto, os participantes do estudo não possuíam Diabetes.⁵⁵ Outro estudo avaliou três grupos de acordo com os níveis de controle metabólico, não diabéticos (N=19), com bom controle metabólico (N=24) e pacientes com DM2 com mau controle metabólico (N=27), onde o grupo com mau controle metabólico com DM2 esteve associado a níveis mais altos de EROs e pior saúde periodontal, reforçando achados que sugerem maior nível de inflamação nesses indivíduos.⁵⁶

As interleucinas são um tipo específico de citocinas, que desempenham um papel fundamental na regulação e coordenação das respostas imunológicas, onde as concentrações dessas interleucinas variam de acordo com alguma condição específica, estágio da doença, atividade inflamatória e outros fatores individuais.⁵⁷ A presença dessas interleucinas na saliva pode ser um indicativo da atividade inflamatória na cavidade oral, como na periodontite, onde comumente níveis elevados de interleucinas pró-inflamatórias, como IL-6, INF-gama e TNF-alfa estão associados com o estágio avançado da periodontite.⁵⁸

Estudos indicam que níveis mais elevados de IL-6 são encontrados em grupos com periodontite quando comparados a grupos sem periodontite, essa citocina pró-inflamatória está associada com a destruição óssea na presença de infecção oral.^{59,60} A IL-10 possui efeito antagonista e pode ajudar na regulação da resposta imune, no entanto, é menos vista na Periodontite Grau C, onde um estudo mostrou não haver diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-10.⁵⁹ Outras citocinas como o INF-gama e TNF-alfa são consideradas prejudiciais no contexto da destruição tecidual na condição da periodontite. Yue et al (2013) avaliaram as concentrações de citocinas salivares (IL-6, IFN- gama e TNF- alfa) pós-tratamento, onde pacientes com Periodontite Grau C mostraram uma significativa diminuição dos níveis dessas citocinas em comparação com os níveis basais.⁶¹

Esses achados suportam o uso de fluidos corporais, mais especialmente a saliva de fluido de diagnóstico não invasivo, como tipos de amostra adequados para diagnóstico ou monitoramento do curso da periodontite e seus agravantes.

2. JUSTIFICATIVA

1. Há poucos estudos avaliando citocinas e compostos salivares (peptídeo antimicrobiano (catelicidina), lisozima, da IgA secretora, peróxidos totais e capacidade antioxidante total (TAC) na saliva na Periodontite), principalmente avaliando efeito de tratamento, seja cirúrgico ou não cirúrgico em curto prazo.

2. A presença de Diabetes associada à Periodontite pode ser um agravante associado às modificações nas concentrações das citocinas.

3. O presente estudo pode contribuir para a relevância do tratamento da Periodontite em pacientes sob risco de doença cardiovascular, além de buscar examinar possíveis diferenças entre diabéticos e não diabéticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento Periodontal não cirúrgico em relação às citocinas e compostos da saliva (peptídeo antimicrobiano (catelicidina), lisozima, da IgA secretora, peróxidos totais e capacidade antioxidante total (TAC)), na presença ou não de Diabetes.

3.2 Objetivo específico

Avaliar as quimiocinas de monócitos (MCP-1 e RANTES) no FCG e biomarcadores salivares (citocinas IL-6, IL-10, IFN-gama, TNF-a, peptídeo antimicrobiano (catelicidina), lisozima, da IgA secretora, peróxidos totais e capacidade antioxidante total (TAC) da resposta imune na saliva ao longo do tratamento periodontal (basal e 30 dias).

4. MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

O estudo envolveu pacientes em acompanhamento na Clínica de Odontologia da Universidade Santo Amaro – UNISA diagnosticados com Doença Periodontal nos níveis de classificação moderado e avançado, com idade entre 40 e 75 anos, de ambos os sexos, associado ou não ao Diabetes.

Foram obtidos dados demográficos dos participantes na visita inicial e amostras de sangue foram coletadas no basal e após 30 dias do término do tratamento periodontal não cirúrgico.

Os critérios de inclusão no estudo abrangeram pacientes com Periodontite Grau B e Grau identificada por duas periodontistas e na cavidade bucal conter no mínimo 10 dentes. Os critérios de exclusão foram ser desdentado, ter recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses, ser fumante, apresentar gengivite ou DP leve.

Os pacientes incluídos foram distribuídos em dois grupos, sendo eles: Doença Periodontal com Diabetes e Doença Periodontal sem Diabetes. Utilizou-se como critério para determinar o Diabetes Mellitus:

- 1) Hemoglobina glicada (HbA1c) \geq 6,5%;
- 2) Glicemia \geq 200 mg associada a sintomas como emagrecimento, polidipsia/poliúria;
- 3) Uso de medicamentos antidiabéticos com história de diagnóstico prévio.

4.2 Cálculo do Tamanho Amostral

Para cálculo do tamanho da amostra, considerou-se uma prevalência duas vezes maior de Periodontite em diabéticos comparados aos não diabéticos, com nível de significância (α) de 5%, intervalo de confiança de 90% e poder do estudo de 80%, chegando-se ao n de 72 participantes. Pretende-se incluir, admitindo-se perda de seguimento de 10%, aproximadamente 80 indivíduos.

4.3 Avaliação Clínica Periodontal e Tratamento Periodontal

Toda a avaliação e acompanhamento dos pacientes foram realizados pelas duas periodontistas do estudo. Obteve-se a confiabilidade diagnóstica intra-examinador aferida pela estatística de Kappa (entre 0.8 e 1.0) por meio de avaliação em duplicidade de 10% da amostra para cada um dos critérios clínicos.

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

As informações do nível clínico de inserção (NCI) foram adquiridas de todos os sítios examinados por meio da medida da distância da junção esmalte-cimento (JEC) até a margem gengival (MG) somando à medida da PS. Ou seja: $NCI = PS + (JEC \text{ a } MG)$. 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 Gengival⁶² e higiene bucal pelo Índice de Placa.⁶³

O diagnóstico foi executado após exame clínico periodontal conforme condições que pudessem sobressair aos níveis moderado e avançado, segundo a classificação da

Academia Americana de Periodontia em 1999.⁶⁴ O nível de Periodontite crônica moderado obedeceu aos parâmetros com um ou mais sítios de PS ≥ 4 e PIC ≥ 3 em indivíduos que apresentaram quatro ou mais dentes. A Periodontite crônica avançada foi diagnosticada nos participantes que apresentaram quatro ou mais dentes com um ou mais sítios que contivessem PIC ≥ 5 . O tratamento periodontal não cirúrgico foi executado nos sítios diagnosticados com Periodontite, com raspagem da superfície dental, com auxílio de instrução de higiene bucal.

4.4 Coleta das Amostras do Fluido Gengival Crevicular

A primeira coleta do fluido crevicular gengival foi realizada após uma semana da realização do exame clínico periodontal e 30 dias após o término do tratamento periodontal, o biofilme bacteriano supragengival de três sítios doentes mais profundos foi removido com o auxílio de gaze estéril e a área foi isolada com rolo de algodão estéril e seco com jato de ar. O fluido crevicular foi coletado com uso de papel coletor (*Periopaper®*, Harco) que, após isolamento do campo, foi introduzido no sulco gengival permanecendo durante 30 segundos. As tiras contaminadas com sangue foram descartadas. Em seguida, as tiras foram acondicionadas em 500 μL de uma solução de cloreto de sódio acrescida de albumina bovina sérica estéril para estabilizar as moléculas, contida em frascos de centrifugação de 1,5 mL e etiquetadas, imediatamente congeladas em gelo seco e armazenadas a -20°C para análise laboratorial.

Após eluição em salina tamponada (PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 1000g por 5 minutos,⁶⁵ o sobrenadante foi utilizado para análise das quimiocinas CCL2, CCL5 e interleucinas.

Antes da etapa de análise todas as amostras foram submetidas a normalização de proteínas pelo método de Bradford.

4.5 Quantificação de Quimiocinas no Fluido Crevicular Gengival

Amostras de fluido gengival foram diluídas em PBS na proporção de 1:4, sendo adicionados 50 uL das amostras diluídas em cada poço (placas de 96 poços). A seguir, o material foi incubado por 2 horas à temperatura ambiente em um agitador a 800 rpm com 50 uL do coquetel de micropartículas diluídas em cada poço, e posteriormente lavado com 100 uL de tampão de lavagem (a lavagem foi realizada 3 vezes). Em seguida, foram adicionados 50 uL do coquetel Biotina-Anticorpo (anticorpos de detecção) e incubado por 1 hora à temperatura ambiente em um agitador a 800 rpm e, em seguida, lavado conforme anteriormente e adicionado 50 uL de Estreptavidina-Ficoeritrina e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente em um agitador de 800 rpm. Após a lavagem em cada poço, foi incubado à temperatura ambiente por 2 minutos em um agitador a 800 rpm. Após 90 minutos, as concentrações das quimiocinas foram calculadas de acordo com as curvas-padrão e os resultados obtidos por meio do equipamento LUMINEX 200 (LUMINEX). As quantidades finais serão apresentadas em pg/mL.

4.6 Coleta das Amostras de saliva

A saliva dos participantes foi coletada após às 13 horas, de acordo com o método descrito por Navazesh (1993)⁶⁵, o tempo de coleta não foi anotado. Os participantes do estudo realizaram enxágue da cavidade oral com água e, em seguida, expectoraram toda a saliva sem estímulo em tubo estéril. Posteriormente, as amostras coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 2.800 rpm, retirado o sobrenadante que foi transferido para microtubo previamente identificado e, por fim, as amostras salivares foram congeladas a -80°C até a etapa de análise.

4.7 Análise salivar das interleucinas

Os biomarcadores inflamatórios na saliva foram detectados utilizando o kit INVITROGEN Sandwich ELISA em uma placa de 96 poços pré-revestida com anticorpo durante a noite em 4°C. Após 3 lavagens utilizando lavadora de placas ELISA, foram adicionados 200 µL de Diluente ELISA/ELISPOT (1X) e incubado à temperatura ambiente durante 60 minutos, posteriormente os poços foram lavados uma vez com Tampão de Lavagem e foram adicionados 100 µL de amostra de saliva em cada poço com 100 µL de Diluente ELISA/ELISPOT (1X) ao poço em branco, a placa foi selada e incubada por 2 horas. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens, adicionados 100 µL de anticorpo de detecção diluído a todos os poços, selado e incubado pelo período de 1 hora. Após a incubação foi efetuada mais uma lavagem e adicionados 100 µL de Streptavidin-HRP diluído que foi mantido em incubação durante 30 minutos. Em seguida, foi realizada nova lavagem e adicionados 100 µL de solução 1X TMB aos poços no decorrer de 15 minutos em temperatura ambiente e por fim foram adicionados 100 µL de solução de parada. A análise foi realizada utilizando medidor de absorvância em um comprimento de onda a 450 nm.

4.8 Análise salivar da Capacidade Antioxidante Total

Os valores de CAT foram determinados utilizando o kit comercial QuantiChrom™ BioAssay Systems e preparados conforme indicações do fabricante. Resumidamente, os componentes do kit foram previamente centrifugados antes da utilização, após foram adicionados 5 µL do padrão em 245 µL dH₂O. Os padrões foram diluídos conforme a instrução e transferido o volume de 20 µL para os poços de uma placa com 96 poços de fundo plano. Após essa etapa, 20 µL de cada amostra foram adicionados aos poços, foram transferidos 100 µL de Reagente de Trabalho a todos os poços de ensaio e homogeneizados dando pequenas batidas na placa, a incubação foi realizada durante 10 minutos à temperatura ambiente. Os valores foram obtidos em detecção óptica a 570 nm.

4.9 Análise salivar do Peróxido

A quantificação das amostras salivares de peróxido foi realizada utilizando o kit QuantiChrom™ BioAssay Systems. Inicialmente, os padrões foram preparados e diluídos conforme indicação do fabricante e transferidos 40 µL destas soluções e das amostras para os poços de uma placa com 96 poços de fundo plano. Foram adicionados 200 µL do reagente de detecção a todos os padrões e amostras e incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente e a leitura foi realizada em densidade óptica a 540-610 nm (absorbância máxima a 585 nm).

4.10 Análise estatística

Todos os dados obtidos neste estudo foram inicialmente comparados com a curva de Gauss e, a seguir, a avaliação da normalidade e homogeneidade de cada resultado foi realizada utilizando os testes de *Shapiro-Wilks* e *Levene*, respectivamente.

Para as variáveis que apresentaram comportamento paramétrico, as mesmas foram representadas por suas médias e respectivos desvios-padrão, sendo utilizados os testes T de *Student* pareado, para as comparações intragrupos, e ANOVA de fator único com pós-teste de *Tukey*, para as comparações intergrupos. Para as variáveis que apresentaram comportamento não paramétrico, as mesmas foram representadas por suas medianas e intervalos interquartis, sendo utilizados os testes de *Wilcoxon*, para as comparações intragrupos, e *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunn*, para as avaliações intergrupos.

Além destes, para as análises da existência de associações entre os parâmetros aqui avaliados, foram aplicados os testes de coeficiente de correlação de *Pearson* para as variáveis paramétricas, ou de *Spearman* para as variáveis não paramétricas.

Para todas as análises foi considerado o risco α de 5% ($p \leq 0,05$) e foi utilizado o software GraphPadPrism8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4.11 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado segundo o parecer número 6.131.397, de 12 de setembro de 2023, após ser submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Santo Amaro (UNISA). O estudo foi registrado como ensaio clínico antes de seu início (ReBEC RBR-35szwc) e obedeceu às normas internacionais da boa prática clínica e harmonização de dados (GCP/ICH).

5. RESULTADOS

A Tabela 1 representa os dados demográficos dos pacientes incluídos no estudo e os valores de profundidade à sondagem (mm), perda de inserção (mm) e dentes ausentes estão relacionados na Tabela 2:

Tabela 1. Dados demográficos dos participantes do estudo.

	Pacientes diabéticos	Pacientes não diabéticos
N	16	7
F/M	9/7	5/2
Idade (média +/- DP)	57 ± 10	48 ± 13
Hemoglobina glicada pré-tratamento (média +/- DP)	8,18 ± 1,81	5,40 ± 0,41

F/M: Feminino/Masculino; DP: Desvio-padrão

As concentrações das citocinas presentes no fluido crevicular gengival dos participantes do estudo, antes e 30 dias após o término do tratamento para Doença Periodontal não cirúrgico, estão representadas na Tabela 3, enquanto os resultados acerca da razão entre as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1beta (Figura 1A), IL-6 (Figura 1B), IL-12p70 (Figura 1C), TNF-alfa (Figura 1D) e IL-18 (Figura 1E) e a citocina anti-inflamatória IL-10 são apresentados na figura 1. Todos os cálculos foram realizados de acordo com as curvas-padrão e os resultados foram obtidos por meio do equipamento LUMINEX 200 (LUMINEX).

Tabela 2. Profundidade de sondagem e perda de inserção (mm)

	Com Diabetes	Sem Diabetes
Hemoglobina glicada T0	8,05 ± 1,39	5,44 ± 0,15
Hemoglobina glicada T1	8,10 ± 2,04	5,31 ± 0,46
Profundidade a sondagem T0	2,34 ± 0,45	2,30 ± 0,60
Profundidade a sondagem T1	1,86 ± 0,49	1,84 ± 0,80
Perda de inserção T0	2,90 ± 1,09	2,74 ± 0,80
Perda de inserção T1	2,63 ± 0,91	2,09 ± 0,90
Dentes ausentes T0	8,10 ± 2,04	5,80 ± 6,70
Dentes ausentes T1	8,30 ± 5,85	6,00 ± 6,70

T0 = pré-tratamento; T1 = 30 dias após o término do tratamento

A tabela 2 abrange dados referente à hemoglobina glicada dos pacientes no grupo diabético e não diabético, onde em ambos os grupos a média + DP de T0/T1 não sofreu grandes alterações.

De acordo com os resultados apresentados tanto na tabela 3 quanto na Figura 1, nenhuma diferença significativa foi encontrada nas comparações intragrupos (basal comparado a 30 dias após o término do tratamento, em cada grupo separadamente), bem como nas comparações intergrupos (Com e Sem Diabetes, tanto antes quanto ao término do tratamento).

Tabela 3. Citocinas avaliadas no fluido crevicular gengival.

Citocina	Com Diabetes		p intra grupos	Sem Diabetes		p intra grupos	p entre grupos	
	Basal	30 dias		Basal	30 dias		Basal	30 dias
TNF- α	0,19 (0,09)	0,32 (0,22)	0,334	0,08 (0,03)	0,18 (0,06)	0,327	0,879	0,975
IL-6	0,07 (0,03)	0,10 (0,06)	0,820	0,04 (0,01)	0,13 (0,05)	0,263	0,559	0,636
IL-8	16,78 (7,62)	14,09 (6,34)	0,650	5,89 (1,78)	10,97 (4,52)	0,674	0,859	0,975
IL-10	0,21 (0,07)	1,76 (1,60)	0,532	0,14 (0,06)	0,60 (0,36)	0,123	0,263	0,190
CCL-2	0,20 (0,10)	0,24 (0,15)	0,570	0,07 (0,02)	0,22 (0,09)	0,161	0,919	0,728
IL-1 β	26,55 (13,27)	28,91 (17,39)	0,733	7,30 (2,66)	11,86 (5,90)	0,327	0,178	0,728
IL-7	0,28 (0,12)	0,55 (0,41)	0,570	0,10 (0,03)	0,38 (0,15)	0,208	0,760	0,506
CCL-5	0,11 (0,03)	0,55 (0,48)	0,865	0,06 (0,03)	0,30 (0,17)	0,123	0,253	0,213
IL-4	0,30 (0,10)	1,16 (0,99)	1,000	0,14 (0,05)	0,62 (0,33)	0,161	0,204	0,265
IL-17	0,41 (0,14)	2,11 (1,88)	1,000	0,19 (0,06)	0,73 (0,37)	0,208	0,222	0,265
IL-13	0,79 (0,32)	1,39 (0,95)	0,609	0,31 (0,09)	0,65 (0,21)	0,161	0,666	0,776
IL-12p70	2,21 (0,69)	7,41 (5,95)	0,865	1,54 (0,62)	3,52 (1,51)	0,123	0,147	0,357
IL-18	1,03 (0,41)	3,84 (3,05)	0,955	0,39 (0,15)	2,93 (1,62)	0,161	0,213	0,428

Os dados representam as médias (erros-padrão das médias – EPM). Teste de Wilcoxon, comparação intragrupo (basal x final em cada grupo). Teste de Kruskal-Wallis, comparação intergrupo (com e sem Diabetes, para cada visita).

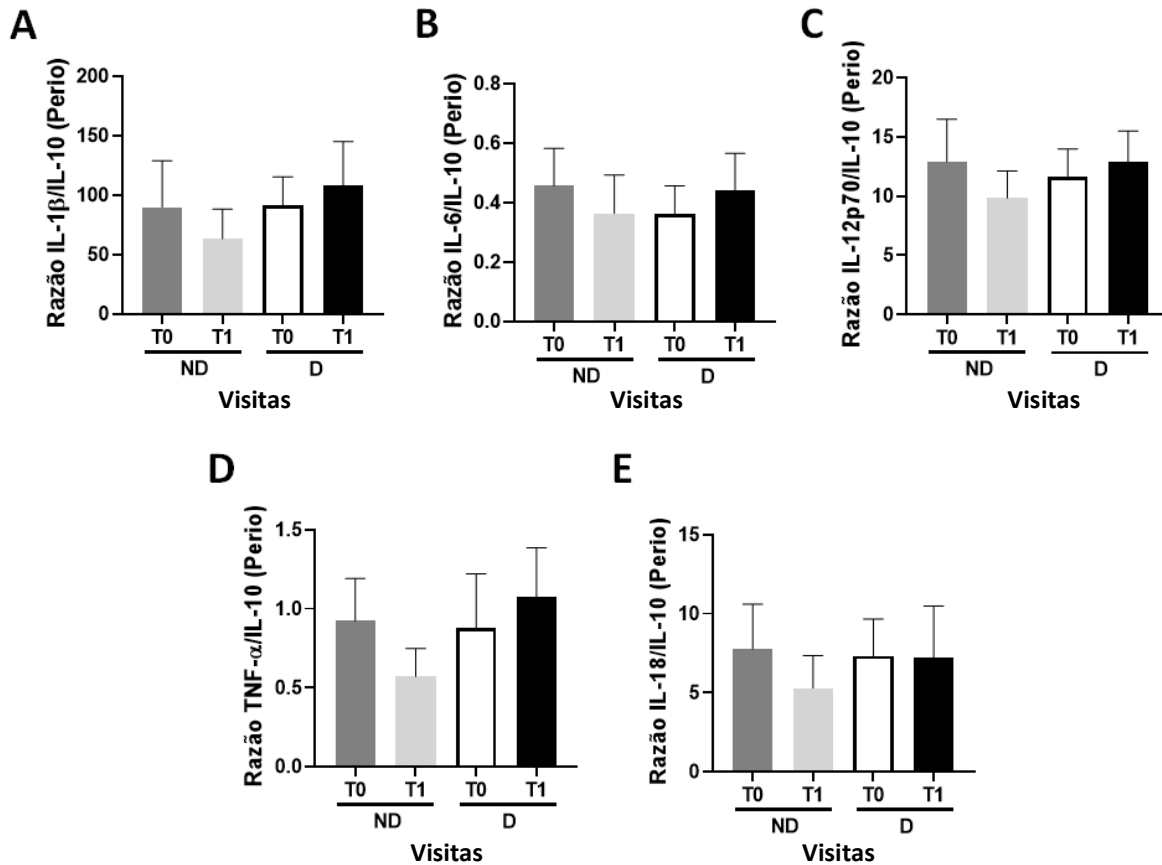


Figura 1. Razão entre as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1beta (A), IL-6, IL-12p70 (C), TNF-alfa (D) e IL-18 (E) e a citocina anti-inflamatória IL-10 no FCG de pacientes com Doença Periodontal na presença ou não de Diabetes nos momentos T0 (Basal) e T1 (Final do tratamento).

Além da avaliação do material obtido no FCF, também foi mensurada a concentração dos peptídeos antimicrobianos lisozima e catelicidina, de IgA secretora, de peróxidos totais, da capacidade antioxidante total, e das citocinas IL-6, IL-10, TNF-alfa e IFN-gama na saliva dos pacientes com periodontite com e sem diabetes, antes e após o tratamento não cirúrgico.

Conforme pode ser observado na Figura 2, na análise intragrupo, enquanto as concentrações salivares de lisozima (Figura 2A, $p=0,0260$) e de IL-10 (Figura 2I, $p=0,0034$) mostraram-se significativamente reduzidas, as de TNF-alfa (Figura 2G, $p=0,0443$) foram maiores pós-tratamento (visita T1) quando comparados aos valores

basais (visita T0) no grupo Com Diabetes. Além disso, as concentrações salivares de TNF-alfa (Figura 2G, $p=0,0313$) observadas no grupo Sem Diabetes pós-tratamento (momento T1) foram menores do que os valores basais (visita T0). Tanto a redução das concentrações salivares de TNF-alfa evidenciada no grupo Sem Diabetes quanto o aumento das concentrações desta citocina no grupo Com Diabetes impactaram na análise intergrupo, sendo, por isso, observada diferença significativa entre as concentrações salivares nos grupos Sem e Com Diabetes pós-tratamento (Figura 2G, $p=0,0008$). Nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi encontrada.

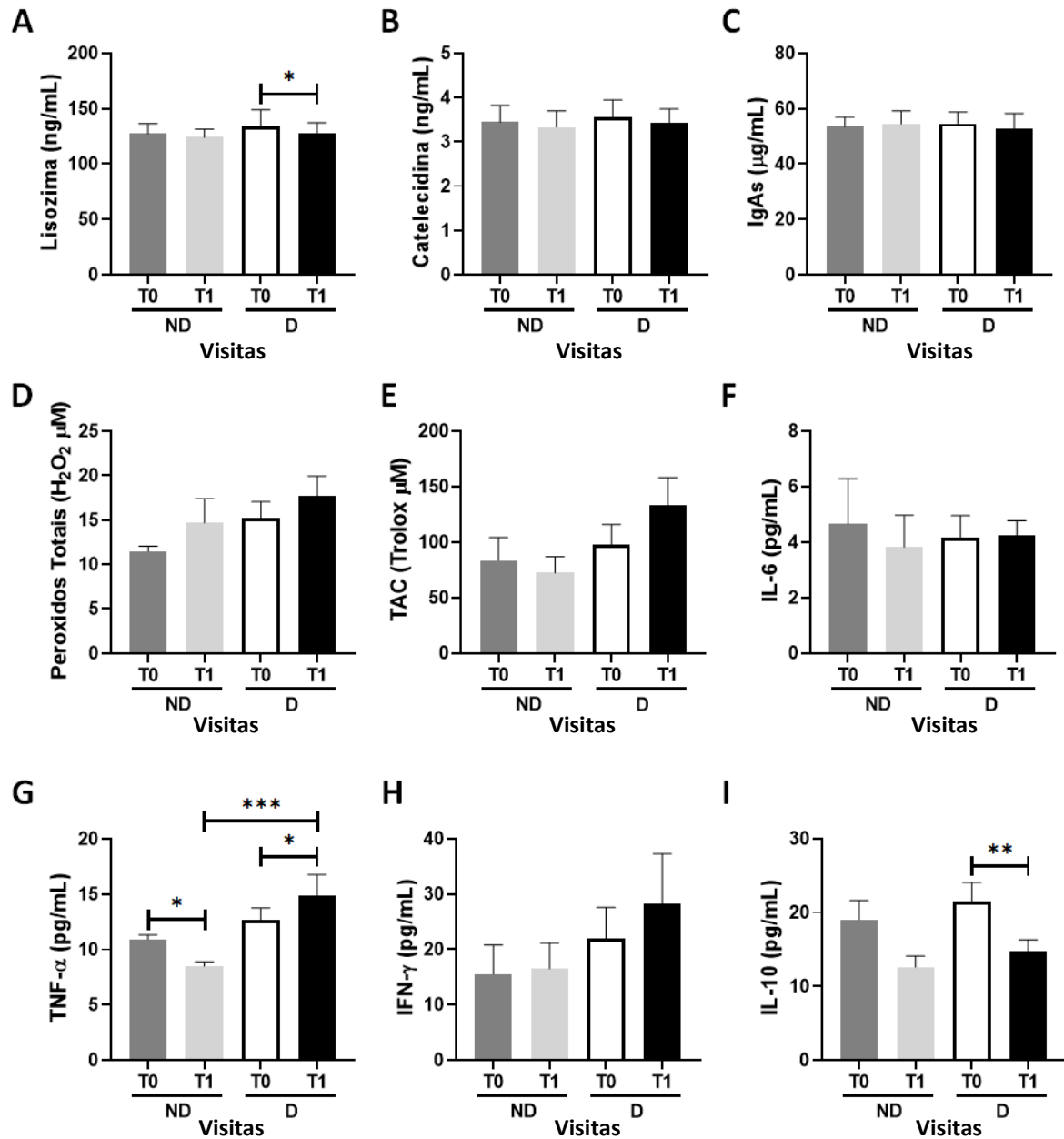


Figura 2. Concentração salivar de lisozima (A), catelecidina (B), IgA secretora (C), peróxidos totais (D), capacidade antioxidante total (E), IL-6 (F), TNF-alfa (G), IFN-gama (H) e IL-10 (I), nos voluntários do presente estudo (pacientes com Doença Periodontal Com e Sem Diabetes) em diferentes momentos: antes (T0, Basal) e após 30 dias do tratamento da Doença Periodontal (T1, Final). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

De maneira semelhante ao realizado nas avaliações do FCG, na Figura 3 são apresentados os resultados obtidos nas análises relacionadas às razões entre as concentrações salivares não somente das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Figura 3A), TNF-alfa (Figura 3B) e INF-gama (Figura 3C) e a citocina anti-inflamatória IL-10, bem como dos peróxidos totais e da capacidade antioxidante total (Figura 3D), nos dois grupos de voluntários participantes do presente estudo (Com e Sem Diabetes), tanto antes quanto após o tratamento para Doença Periodontal não cirúrgico. Com relação à análise intragrupo, foi possível evidenciar aumento tanto da razão entre IL-6/IL-10 (Figura 3A, $p=0,0134$) e IFN-gama/IL-10 (Figura 3C, $p=0,0313$) no grupo Sem Diabetes quanto da razão TNF-alfa/IL-10 (Figura 3B, $p=0,0003$) no momento T1 (pós-tratamento) quando comparados aos valores observados no momento T0 (Basal). Já, na análise intergrupos, foi verificada maior razão de TNF-alfa/IL-10 (Figura 3B, $p=0,0418$) no grupo Com Diabetes do que no grupo Sem Diabetes no momento T1. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na razão entre as concentrações salivares dos peróxidos totais e da capacidade antioxidante total (TAC).

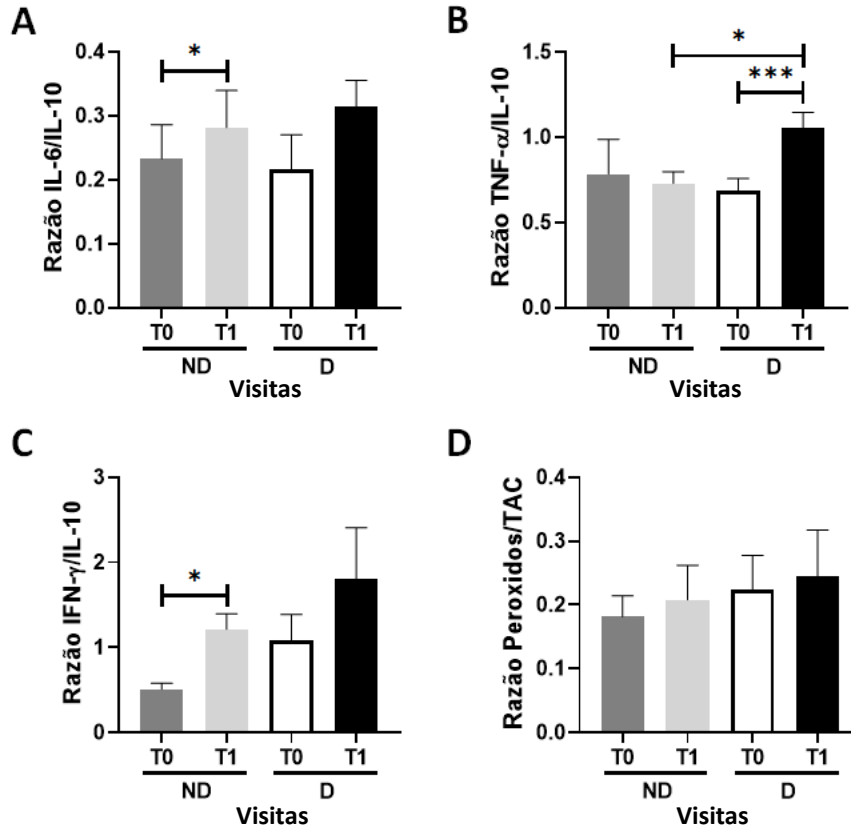


Figura 3. Razão entre as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (A), TNF-alfa (B) e IFN-gama (C) e a citocina anti-inflamatória IL-10, bem como dos peróxidos totais e da capacidade antioxidante total (TAC, D) na saliva de pacientes com Doença Periodontal na presença ou não de Diabetes nos momentos T0 (Basal) e T1 (Final do tratamento). * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi elaborado para avaliar a modulação das quimiocinas de monócitos (MCP-1 e RANTES) no FCG e biomarcadores salivares (citocinas IL-6, IL-10, IFN-gama, TNF- α , peptídeo antimicrobiano (catelicidina), lisozima, da IgA secretora, peróxidos totais e capacidade antioxidante total (TAC)) da resposta imune na saliva ao longo do tratamento periodontal (basal e 30 dias). De acordo com os dados representados na Tabela 1, os pacientes foram classificados com Periodontite Grau B e Grau C com Diabetes (N=16), idade média 57 anos e HbA1C média de 8,18 e pacientes sem Diabetes (N=9), com idade média de 48 anos e média dos níveis de HbA1C de 5,40. Um estudo de Kemp et al. de 2016 verificou que a idade média de pacientes com Periodontite Grau B e Grau C foi de 54 anos, compreendendo os indivíduos de meia idade e conforme o avanço da idade a prevalência também aumentava.⁷

As concentrações das citocinas presentes no FCG dos participantes do estudo, antes e 30 dias após o término do tratamento periodontal não cirúrgico, foram avaliadas no presente estudo. Os cálculos foram feitos de acordo com as curvas-padrão e os resultados foram obtidos por meio do equipamento LUMINEX 200 (LUMINEX). Não foram encontradas diferenças significantes na comparação intragrupos (basal comparado a 30 dias após o término do tratamento, em cada grupo separadamente) e não houve diferenças nas comparações entre os grupos Com e Sem Diabetes.

A maioria dos estudos encontrados avaliando os níveis de citocinas no contexto da Doença Periodontal envolveram um número restrito de participantes e não se verificou o efeito do tratamento periodontal a curto prazo.

Noh et al. (2013)⁶⁶ quantificaram IL-6, IL-8 e TNF- α no tecido gengival de pacientes com Doença Periodontal e encontraram maiores níveis de IL-8 quando comparado a IL-6 e TNF- α . Entretanto, o tamanho da amostra no referido estudo foi pequeno (n=19), não houve comparações com um grupo saudável e avaliação dos possíveis efeitos do tratamento da Periodontite nos níveis das citocinas avaliadas por eles.

Gamonal et al. (2000) relataram diminuição nas quantidades totais de IL-10 após intervenção periodontal não cirúrgica, enquanto Del Peloso Ribeiro et al. (2008)

encontraram aumento significativo de IL-10 após a intervenção e Goutoudi et al. (2004) não conseguiram encontrar diferenças nos níveis de IL-10 no FCG entre os sítios com Periodontite e sítios não doentes seguidos do tratamento.³³⁻³⁵

Em um trabalho de 2016²⁵ foi verificado se a associação entre Periodontite e Diabetes poderia acentuar o estado inflamatório. Foram dosados TNF- α , IL-6 e IL-4 e foi encontrado aumento de TNF- α e IL-6 no grupo que apresentava as duas doenças, sem diferenças para IL-4.

Recentemente, os testes de diagnóstico salivar passaram a servir como mais uma ferramenta diagnóstica e estão sendo reconhecidos como peça central em uma ampla variedade de doenças bucais e sistêmicas, pois a saliva contém biomarcadores solúveis específicos e é fácil de coletar e armazenar. Considerando a resposta inflamatória salivar em nível de citocinas, comumente níveis elevados de interleucinas pró-inflamatórias, estão associados com o estágio avançado da periodontite e possuem capacidade modulatória no avanço da inflamação, o mesmo ocorre com valores isolados de citocinas anti-inflamatórias.⁵⁸ Dados comparativos na análise intragrupo 30 dias após o tratamento periodontal dos pacientes com Diabetes (Figura 2I), demonstram que o tratamento reduziu os níveis de IL-10 que se mostraram significativamente menores em relação à visita basal dos mesmos pacientes com Diabetes.

Ainda para os níveis de IL-10 foi possível evidenciar aumento tanto da razão entre IL-6/IL-10 quanto IFN-gama/IL-10 no grupo Sem Diabetes quanto da razão TNF-alfa/IL-10 no momento T1 quando comparados aos valores observados no momento T0. A IL-10 liberada pelo T helper 2 (Th2) é uma citocina anti-inflamatória e imunossupressora tem a capacidade de inibir a síntese de citocinas pelas células T, o que pode ter um forte efeito regulador nas respostas imunes na periodontite.⁶⁷ É menos visto ou ausente na Periodontite Grau C, o que corrobora com os achados do presente estudo. Baker et al. (2000) destacou que a IL-10 pode regular negativamente a secreção de IL-1 β , TNF- α e IL-6.⁶⁸

O TNF-alfa é uma citocina pró-inflamatória liberada por macrófagos conhecida por seu papel substancial na perda óssea mediada pela Periodontite, inibe a transdução de insulina e contribui para a resistência à insulina no Diabetes e é capaz de induzir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-6.⁶¹ Na comparação dos

resultados deste estudo, o TNF-alfa mostrou-se significativamente diminuído na comparação intragrupo dos pacientes com Periodontite e sem Diabetes antes e 30 dias após o tratamento periodontal. De maneira controversa ocorreu na análise intragrupo dos pacientes com Periodontite na presença de Diabetes, onde houve um aumento dessa citocina 30 dias após a realização do tratamento quando comparadas com o momento T0. Os resultados obtidos por meio da análise intergrupo também obtiveram resultados estatisticamente significantes.

Com isso, é possível observar que o processo inflamatório dos pacientes com Diabetes tende a possuir níveis mais elevados de mediadores pró-inflamatórios como o TNF-alfa em comparação com indivíduos saudáveis. Após o tratamento periodontal a curto prazo esses níveis estão ainda elevados, corroborando com um estudo de 2014 onde níveis aumentados de TNF-alfa salivar estavam presentes em três grupos doentes, onde o grupo Diabetes Mellitus tipo 2 com periodontite crônica foi significativamente maior quando comparado ao grupo I (controle) e ao grupo II (periodontite crônica), sugerindo a associação entre diabetes e aumento da citocina pró-inflamatória TNF-alfa, apesar do estudo não ter avaliado tempo de tratamento.⁶⁹

A IL-6 é produzida por células T e B, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos em resposta a infecções, estresse e neoplasias. Também é liberado em resposta à estimulação de IL-1 e TNF de diversos tipos de células e está presente em altas concentrações na saliva de pacientes com Periodontite e de pacientes com Diabetes.⁶¹ No entanto, no presente estudo as concentrações dessa molécula não mostraram resultados estatisticamente significantes, o mesmo ocorreu em um estudo de Sccanapieco et al. (2007) que foi um estudo longitudinal de caso-controle realizado para medir a associação de biomarcadores salivares com perda óssea alveolar, envolveu 1.256 participantes e os níveis salivares de IL-6 também não foram elevados.⁷⁰

Um estudo semelhante avaliou níveis salivares de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-2, IL-6, interferon gama (IFN- γ), TNF- α e fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF), ou citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-10, e a quimiocina IL-8, e, também não encontraram diferenças significantes nos níveis de IL-6 após o tratamento periodontal não cirúrgico em comparação aos pacientes com Periodontite Grau C e Diabetes e o grupo controle Sem Diabetes.⁷¹

O IFN-gama é uma citocina pró-inflamatória e na saliva é um sinal de que a infecção está ativa e sendo combatida, seus níveis salivares podem ser utilizados para monitorar a resposta ao tratamento da Periodontite. Níveis mais baixos de IFN-gama na saliva indicam que a doença está sob controle.^{58,67}

Em contraste com o que relata alguns estudos, os níveis de IFN-gama não sofreram diminuição após 30 dias do tratamento periodontal no grupo com Diabetes. Embora os resultados não tenham expressado valores significantes, é possível observar um perfil inflamatório crescente nesses pacientes após o tratamento comparado ao grupo Sem Diabetes pós-tratamento.^{58,61} Yue et al (2013) avaliaram as concentrações de citocinas salivares (IL-6, IFN- gama e TNF- alfa) pós-tratamento, onde pacientes com Periodontite Grau C mostraram uma significativa diminuição dos níveis dessas citocinas em comparação com os níveis basais.⁶¹

De forma semelhante, Teles et al. (2009) não relataram diferenças significativas entre indivíduos com periodontite e controles para IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-gama e TNF- alfa.⁶⁷

Existe na saliva um complexo de imunoglobulinas (Ig), especificamente a IgA, em que a sua análise fornece um método simples e não invasivo para avaliação da resposta imune na Periodontite, onde são encontrados em alta concentração em comparação com as IgM.⁴⁴ No presente estudo, comparando em nível basal e 30 dias pós-tratamento, as IgA não demonstraram diferenças significantes.

Branco de Almeida et al. (2011) avaliaram os níveis salivares de IgA em pacientes com e sem Diabetes, onde foi observada nos indivíduos diabéticos uma variabilidade onde: 53,6% (N=22) apresentaram níveis baixos de IgA salivar, 36,6% (N=15) apresentaram níveis dentro da normalidade e 9,8% (N=4) apresentaram níveis elevados de IgA no fluido salivar.⁴⁵ Indicando que a os pacientes diabéticos expressaram níveis mais baixos de IgA salivar. Nossos resultados não obtiveram significância, no entanto, o estudo citado foi realizado sem intervenção e com um número de participantes maior comparado ao presente estudo.

A lisozima é um tipo de peptídeo antimicrobiano (AMP), uma enzima que está presente em secreções como lágrima e saliva, atuando na ação antimicrobiana.⁴⁰ Na

análise realizada neste estudo, houve diferença significativa nos níveis salivares de lisozima no grupo com Diabetes pós-tratamento periodontal, havendo redução nesses níveis.

Surna A et al. (2008) verificou a atividade de lisozima salivar com base em dados clínicos e obtiveram resultados de alta sensibilidade e especificidade, indicando a gravidade da inflamação na Periodontite e atuando como possível biomarcador salivar.⁴¹ Katsiki P et al. (2021) compararam possíveis biomarcadores alvo e foi observado que a lisozima avaliada na saliva obteve uma atividade elevada no grupo controle pré-tratamento, indicando que antes do tratamento os níveis de lisozima salivar estavam mais elevados em comparação com o grupo pós-tratamento, corroborando com os nossos resultados.⁴²

Acerca dos AMPs, a catelicidina não apresentou nesta análise resultados significantes estatisticamente. Na literatura, um estudo de Yilmaz et al. (2020) encontrou níveis de catelicidina mais elevados ($p < 0,001$) nos pacientes do grupo com Diabetes em comparação com os sistemicamente saudáveis, entretanto o estudo não realizou intervenção e houve uma coleta única conflitando com resultados do presente estudo.⁷²

A saliva possui um amplo conjunto de oxidantes que atuam em conjunto e a capacidade antioxidante total (CAT) é uma medida que avalia a capacidade de um sistema biológico de forma global para neutralizar os radicais livres e promover proteção às células dos danos oxidativos, sendo um parâmetro relevante para avaliar as capacidades de defesa que ocorrem localmente na cavidade oral, especificamente, na saliva.^{46,47}

Nossos resultados não obtiveram significância estatística para os compostos de Peróxidos totais e CAT. A presença de peróxido na saliva de pacientes diabéticos com periodontite pode ser um indicador de estresse oxidativo, que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo para neutralizá-las.⁵³

Encontramos na literatura dados acerca dos peróxidos sugerindo que em resposta as bactérias periodontais as células endoteliais sofrem estresse oxidativo e secretam

várias citocinas, como TNF-alfa, IL-6 e IFN-gama, pois parte dessas bactérias aceleram a aterosclerose intensificada pelo fator Kappa B, associando a Periodontite com as DCVs.⁷³ Outro estudo indicou um maior nível de inflamação nos indivíduos com Diabetes na presença de Periodontite, sem intervenção de tratamento, onde separou em três grupos de acordo com os níveis de controle metabólico, não diabéticos (N=19), com bom controle metabólico (N=24) e pacientes com DM2 com mau controle metabólico (N=27), onde o grupo com mau controle metabólico com DM2 esteve associado a níveis mais altos de peróxidos e pior saúde periodontal.⁵⁶

Os resultados referentes a CAT são conflitantes, Gowri et al. (2013) avaliaram a CAT na saliva em pacientes com Diabetes e Periodontite e Sem Diabetes com Periodontite, onde a CAT foi inversamente proporcional à gravidade da inflamação, sugerindo que a periodontite tem um efeito negativo no estado oxidativo já comprometido de pacientes com Diabetes.⁴⁸ Estudos mais antigos sugerem que os níveis de CAT produzidos nos diabéticos estão associados à regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, complicações diabéticas e resistência à insulina.⁴⁹⁻⁵¹

Apesar dos resultados acerca dos biomarcadores CCL2 e CCL5 no FCV não terem sido estatisticamente significantes sua expressão chama atenção para potenciais associações entre a Periodontite, o Diabetes e as Doenças Cardiovasculares, uma vez que esses marcadores estimulam a síntese de monócitos essenciais para o controle e agravamento dos processos inflamatórios e reparo tecidual. Lira-Junior R. (2020) evidenciou que monócitos circulantes de pacientes com Periodontite Grau C secretam abundantemente a proteína S100A12 (proteína de ligação de cálcio que atua como alarme para induzir uma resposta imune inata pró-inflamatória), foi descoberto que os níveis salivares dessa proteína estavam relacionados com o grau de inflamação gengival e presença de bolsas periodontais profundas, refletindo estágios graves da Periodontite.⁷⁴ Outros estudos demonstraram que os subtipos de monócitos estão aumentados na Periodontite Grau B e Grau C.

7. CONCLUSÃO

Foram mostrados diferentes efeitos, em curto prazo, do tratamento não cirúrgico da Periodontite em indivíduos que apresentavam ou não diabetes. Melhora do estado inflamatório salivar no grupo sem Diabetes, o que não foi encontrado no grupo com Diabetes.

REFERÊNCIAS

- 1- Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol*. 2021 Jul;21(7):426-440.
- 2- Almeida Rf, Pinho Mm, Lima C, Faria I, Santos P, Bordalo C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Rev Port Clín Geral*, 2016; 22: 379-82.
- 3- GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, “Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016,” *Lancet*, vol. 390, no. 10100, pp. 1211–1259, 2017.
- 4- L. Jin, I. Lamster, J. Greenspan, N. Pitts, C. Scully, and S. Warnakulasuriya, “Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health,” *Oral Diseases*, vol. 22, no. 7, pp. 609–619, 2016.
- 5- Eke, P I et al. “Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010.” *Journal of dental research* vol. 91,10 (2012): 914-20.
- 6- M. S. Tonetti, P. Bottenberg, G. Conrads, Peter Eickholz, Pedro Heasman, Marie-Charlotte Huysmans et al., “Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing—consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries be,” *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 44, no. 18, pp. S135–s144, 2017.
- 7- F. M. Tadjoeidin, A.H. Fitri, S.O. Kuswandini, B. Sulijaya, Y. Soeroso. “The correlation between age and periodontal diseases,” *Journal of International Dental and Medical Research*, vol. 10, no. 2, p. 327, 2017.
- 8- Nazir, Muhammad Ashraf. “Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention.” *International journal of health sciences* vol. 11,2 (2017): 72-80. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2020 Jun;83(1):26-39.
- 9- Ministério da Saúde. Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus – Manual de hipertensão arterial e diabetes mellitus. Brasília: Editora MS; 2002.
- 10- Cugini C, Klepac-Ceraj V, Rackaityte E, Riggs JE, Davey ME. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *J Oral Microbiol*. 2013;5 1-10.
- 11- Hajishengallis G., Abe T, Hosur KB, Hajishengallis E , Reis ES, Ricklin D, Lambris JD. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29:248-257.
- 12- IDF Diabetes Atlas 10th Edition. www.diabetesatlas.org

- 13- Stöhr J, Barbaresko J, Neuenschwander M, Schlesinger S. Bidirectional association between periodontal disease and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Sci Rep.* 2021 Jul 1;11(1):13686.
- 14- Loe H Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993 ; 16 (1): 329 - 334
- 15- Novotna M, Podzimek S, Broukal Z, Lencova E, Duskova J. Periodontal Diseases and Dental Caries in Children with Type 1 Diabetes Mellitus. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:379626.
- 16-Qasim SSB, Al-Otaibi D, Al-Jasser R, Gul SS, Zafar MS. An Evidence-Based Update on the Molecular Mechanisms Underlying Periodontal Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020 May 28;21(11):3829.
- 17-Reddy M, Gopalkrishna P. Type 1 diabetes and periodontal disease: a literature review. *Can J Dent Hyg.* 2022 Feb 1;56(1):22-30.
- 18-Ziebolz, D.; Jahn, C.; Pegel, J.; Semper-Pinnecke, E.; Mausberg, R.F.; Waldmann-Beushausen, et al. Periodontal bacteria DNA findings in human cardiac tissue—Is there a link of periodontitis to heart valve disease? *Int. J. Cardiol.* 2018, 251, 74–79.
- 19-Our World in Data, Hannah Ritchie and Max Roser. Causes of death. Published December 2019. Accessed October 19, 2022. <https://ourworldindata.org/causes-of-death#what-do-people-die-from>
- 20-Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, et al. Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 20;20(6):1414.
- 21-Louhelainen, A.M.; Aho, J.; Tuomisto, S.; Aittoniemi, J.; Vuento, R.; et al. Oral bacterial DNA findings in pericardial fluid. *J. Oral Microbiol.* 2014, 6, 25835.
- 22-Kozarov, E.V.; Dorn, B.R.; Shelburne, C.E.; et al. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, e17–e18.
- 23-Li, X.; Kolltveit, K.M.; Tronstad, L.; Olsen, I. Systemic Diseases Caused by Oral Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, 13, 547–558.
- 24-Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol* 2008, 79: 1592-1600.
- 25-Stadler AF, Angst PDM, Arce RM, Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2016, 43: 727-745.
- 26-Gündoğar H, Üstün K, Şenyurt SZ, Özdemir EÇ, Sezer U, Erciyas K. Gingival crevicular fluid levels of cytokine, chemokine, and growth factors in patients with periodontitis or gingivitis and periodontally healthy subjects: a cross-sectional multiplex study. *Cent Eur J Immunol.* 2021;46(4):474-480.

- 27-Liu YCG, Lerner UH, Teng YTA. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000*, 2010 52: 163-206.
- 28-Nędzi-Góra M, Góraska R, Górski B. Is the progression rate of periodontitis related to subgingival biofilm composition or gingival crevicular fluid IL-1 β and MMP-8 concentrations? *Cent Eur J Immunol*. 2020;45(4):425-432.
- 29-Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F. IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 2013. 24: 25-29.
- 30- Nomura T, Ishii A, Shimizu H, Taguchi N, Yoshie H, Kusakari H, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1, matrix metalloproteinases-1 and -8, and collagenase activity levels in peri-implant crevicular fluid after implantation. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:430-40.
- 31- Aleksandrowicz P, Brzezińska-Błaszczyk E, Kozłowska E, Żelechowska P, Borgonovo AE, Agier J. Analysis of IL-1 β , CXCL8, and TNF- α levels in the crevicular fluid of patients with periodontitis or healthy implants. *BMC Oral Health*. 2021 Mar 16;21(1):120.
- 32-Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000;71:1535–1545
- 33-Del Peloso Ribeiro E, Bittencourt S, Sallum EA, Nociti FH, Jr, Goncalves RB, Casati MZ. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. *J Clin Periodontol*. 2008;35:789–798.
- 34-Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*. 2004;32:511–520.
- 35-de Lima Oliveira AP, de Faveri M, Gursky LC, Mestnik MJ, Feres M, Haffajee AD, *et al*. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*. 2012 Mar;39(3):295-302.
- 36- Gorr SU. Antimicrobial peptides in periodontal innate defense. *Front Oral Biol*. 2012;15:84-98.
- 37-Gorr S-U. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology*. 2009;51:152–180. 2000.
- 38-Güncü GN, Yilmaz D, Könönen E, Gürsoy UK. Salivary Antimicrobial Peptides in Early Detection of Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015 Dec 24;5:99.
- 39-RAMOS, Sidney Rodrigues. Lisozima: estrutura molecular e propriedade antimicrobiana. Anais I CONBRACIS. Campina Grande: *Realize Editora*, 2016.

- 40-Surna A, Sakalauskiene J, Vitkauskiene A, Saferis V. Microbiological and biochemical characteristics of inflammatory tissues in the periodontium. *Medicine (Kaunas)*. 2008;44(3):201-10.
- 41-Katsiki P, Nazmi K, Loos BG, Laine ML, Schaap K, Hepdenizli E, et al. Comparing periodontitis biomarkers in saliva, oral rinse and gingival crevicular fluid: A pilot study. *J Clin Periodontol*. 2021 Sep;48(9):1250-1259.
- 42-de Sousa-Pereira P, Woof JM. IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies (Basel)*. 2019 Dec 5;8(4):57.
- 43-Pietiäinen M, Liljestrand JM, Akhi R, Buhlin K, Johansson A, Paju S, Salminen A, et al. Saliva and Serum Immune Responses in Apical Periodontitis. *J Clin Med*. 2019 Jun 21;8(6):889.
- 44-Branco-de-Almeida LS, Alves CM, Lopes FF, Pereira Ade F, Guerra RN, Pereira AL. Salivary IgA and periodontal treatment needs in diabetic patients. *Braz Oral Res*. 2011 Nov-Dec;25(6):550-5.
- 45-Halliwell B. E Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 1991; 91 :14S–22.
- 46-Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Total local and systemic antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol*. 2004; 31 :515–21.
- 47-Pendyala G, Thomas B, Joshi SR. Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in Type 2 Diabetic Patients with and without Periodontal Disease: A Case-Control Study. *N Am J Med Sci*. 2013 Jan;5(1):51-7.
- 48-Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414 :813–20. s.
- 49-Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, et al. Mitochondrial reactive oxygen species induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2003; 52 :2570–7.
- 50-Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species play a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006; 440 :944–8.
- 51-Pendyala G, Thomas B, Joshi S. Periodontitis, diabetes mellitus, and the lopsided redox balance: A unifying axis. *J Indian Soc Periodontol*. 2013 May;17(3):338-44.
- 52-Pendyala G, Thomas B, Kumari S. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. *Journal of the Indian Society of Periodontology*. 2008; 12 (3):79–83.
- 53-Omeh YS, Uzoegwu PN. Oxidative stress marker in patients with periodontal disease. *Nigerian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2010; 25 (1):50–4.
- 54-Acquier AB, De Couto Pita AK, Busch L, Sánchez GA. Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. *Redox Rep*. 2017 May;22(3):119-126.

- 55-Arana C, Moreno-Fernández AM, Gómez-Moreno G, Morales-Portillo C, Serrano-Olmedo I, de la Cuesta Mayor MC, et al. Increased salivary oxidative stress parameters in patients with type 2 diabetes: Relation with periodontal disease. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2017 May;64(5):258-264.
- 56-Loos BG, Van Dyke TE The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontology 2000* . 2020; 83 (1):26–39.
- 57-Miller CS, Foley JD, Bailey AL, et al. Current advances in salivary diagnosis. *Biomarkers in Medicine.* 2010; 4 (1):171–189.
- 58-Reddahi S, Bouziane A, Rida S, Tligui H, Ennibi O. Salivary Biomarkers in Periodontitis Patients: A Pilot Study. *Int J Dent.* 2022 Mar 24;2022:3664516.
- 59-Rathnayake N., Akerman S., Klinge B., et al. Salivary biomarkers of oral health - a cross-sectional study. *Journal of Clinical Periodontology.* 2013; 40 (2):140–147.
- 60-Yue Y, Liu Q, Xu C, Loo WT, Wang M, Wen G, et al. Comparative evaluation of cytokines in gingival crevicular fluid and saliva of patients with aggressive periodontitis. *Int J Biol Markers.* 2013 Apr 23;28(1):108-12.
- 61-LOE, H, and J SILNESS. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta odontologica Scandinavica.* 21 (1963): 533-51.
- 62-Silness J, Løe H. *Acta Odontol Scandin* 1964;22:121-35.
- 63-Papapanou, Panos N, Mariano Sanz , Nurcan Buduneli, Thomas Dietrich, Magda Feres et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology* 89 Suppl 1 (2018): S173-S182.
- 64-dos S Luz, Diandra et al. Preparation time and perceptions of Brazilian specialists and dental students regarding simulated root canals for endodontic teaching: a preliminary study. *Journal of dental education.* 2015, 79,1:56-63.
- 65-Navazesh, M., Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci,* 1993. 694: p. 72-7.
- 66-Noh, M. K., Jung, M.; Kim, S. H. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Experimental and Therapeutic. Medicine;* 2013 6(3):847–51
- 67-Teles, R. P., Likhari, V., Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *Journal of periodontal research,* 2009 44(3), 411–417.
- 68- Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect.* 2000 2(10):1181-92.
- 69-Singh, P., Gupta, N. D., Bey, A., & Khan, S. Salivary TNF-alpha: A potential marker of periodontal destruction. *Journal of Indian Society of Periodontology,* 2014 18(3), 306–310.

- 70-Scannapieco FA, Ng P, Hovey K, Hausmann E, Hutson A, Wactawski-Wende J. Salivary biomarkers associated with alveolar bone loss. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007;1098:496–497.
- 71-Rabelo, M. S., Gomes, G. H., Foz, A. M., Stadler, A. F., Cutler, C. W., Susin, C., et al. Short-term effect of non-surgical periodontal treatment on local and systemic cytokine levels: Role of hyperglycemia. *Cytokine*, 2021 138, 155360.
- 72-Yilmaz D, Topcu AO, Akcay EU, Altindis M, GURSOY UK. Salivary human beta-defensins and cathelicidin levels in relation to periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Acta Odontol Scand.* 2020 78(5):327-331.
- 73-Lira-Junior R, Holmström SB, Clark R, Zwicker S, Majster M, Johannsen G, et al. Expression Is Modulated During Monocyte Differentiation and Reflects Periodontitis Severity. *Front. Immunol.* 11:86.
- 74- Pirih Flavia Q, Sepehr Monajemzadeh, Neelima Singh, Rachel Sheridan Sinacola, Jae Min Shin, Tsute Chen, et al. Association between metabolic syndrome and periodontitis: The role of lipids, inflammatory cytokines, altered host response, and the microbiome. *Periodontology 2000.* 2021;87:50–75.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modulação da expressão de quimiocinas na Periodontite associada ao Diabetes

Pesquisador: STEFFANY BERNARDO OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 70567823.0.0000.0081

Instituição Proponente: OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.296.263

Apresentação do Projeto:

Idem relatoria anterior

Objetivo da Pesquisa:

Idem relatoria anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem relatoria anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem relatoria anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Esclarecimento do autor do trabalho:

"Referente à pendência, solicitando carta de anuência da clínica de Odontologia atualizada, vale destacar que não é aplicável, por se tratar de um estudo retrospectivo."

O projeto faz parte de trabalho já aprovado anteriormente pelo CEP da UNISA com o parecer 3580518.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaurisa@unisa.br

Continuação do Parecer: 6.296.263

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_2141338.pdf	18/08/2023 18:40:17		Aceito
Outros	Esclarecimentos.pdf	18/08/2023 18:39:57	STEFFANY BERNARDO OLIVEIRA	Aceito
Outros	ANEXO23.pdf	18/08/2023 18:39:10	STEFFANY BERNARDO OLIVEIRA	Aceito
Declaração de concordância	Anuencia.pdf	25/06/2023 12:01:19	STEFFANY BERNARDO OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	StefanyCEP.docx	14/06/2023 12:00:15	STEFFANY BERNARDO OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLESTEFFFANY.doc	14/06/2023 11:59:43	STEFFANY BERNARDO OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	FRSteffany.pdf	14/06/2023 11:59:09	STEFFANY BERNARDO OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 12 de Setembro de 2023

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

Endereço: Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br