

UNIVERSIDADE SANTO AMARO – UNISA

Mestrado em Ciências da Saúde

Bárbara Adelungue Cassiano

**PAPEL DAS MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES E
INTERLEUCINAS NA PERIODONTITE ASSOCIADA AO DIABETES**

São Paulo

2023

Bárbara Adelungue Cassiano

**PAPEL DAS MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES E
INTERLEUCINAS NA PERIODONTITE ASSOCIADA AO DIABETES**

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. Luiz Henrique da Silva Nali

São Paulo

2023

C336p

Cassiano, Barbara Adelungue.

Papel das micropartículas circulantes e interleucinas na periodontite associada ao diabetes / Barbara Adelungue Cassiano. – 2023.

50 p.

Orientador: Prof. Me. Carolina Nunes França.

Co-orientador: Prof. Me. Luiz Henrique da Silva Nali.

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

Bibliografia incluída.

1. Micropartículas. 2. IL-6. 3. IL-10. 4. Periodontite. 5. Diabetes. 6. Citocinas. I. França, Caroline Nunes. II. Nali, Luiz Henrique da Silva. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

CDD 617.632

Bárbara Adelungue Cassiano

**PAPEL DAS MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES E
INTERLEUCINAS NA PERIODONTITE ASSOCIADA AO DIABETES**

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

São Paulo, 06 de Dezembro de 2023

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a Marina Tiemi Shio

Prof. Dr Cesar Miguel Momesso dos Santos

Prof^a. Dr^a Carolina Nunes França

Conceito Final: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais e a todos que passaram em minha vida durante esse processo de crescimento e de grande aprendizado, muito obrigado a todos.

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela oportunidade de estar realizando mais essa etapa e por me dar forças nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Robson e Patrícia, eu devo mais do que um muito obrigado, devo toda minha admiração, mas agradeço principalmente por toda ajuda e apoio durante esse período, sem vocês essa etapa tão importante não seria possível. Vocês secaram minhas lágrimas nos momentos de apuro e comemoraram e aplaudiram as vitórias, não tenho palavras para agradecer por todo apoio. Ao meu irmão fica o meu muito obrigado por cada sorriso que arrancou de mim, não sabe o quanto isso fez a diferença. A minha querida vó Maria agradeço aos mimos e ao apoio que me deu. Ao Emanuel eu agradeço por me apoiar nos momentos de surtos e jamais me deixar desistir, sou imensamente grata por sempre estar ao meu lado me dando forças, carinho e dizendo o quanto sou capaz.

A Prof^a. Dra. Carolina Nunes França, por me orientar, confiar em mim e me dar a oportunidade de ser sua aluna, agradeço por todo conhecimento passado e pela chance de conhecer seu trabalho de perto, sem ela este estudo não seria possível.

A Prof^a. Dra. Marina Tiemi Shio eu agradeço imensamente por todo conhecimento, por cada bronca e conversa desde meu início na UNISA, isso só me fez crescer como estudante, profissional e como ser humano, agradeço por toda paciência e por todas as risadas, a senhora foi fundamental em todos esses passos da minha carreira acadêmica, muito obrigada por tudo.

Ao Dr. Jônatas Bussador do Amaral, que foi de grande ajuda e responsável pela orientação em cada processo de análises laboratoriais.

Ao Prof. Dr. André Bachi, por todo o suporte com as análises estatísticas e as periodontistas Prof^a. Dra. Debora Pallos e Prof^a. Dra. Yeon Jung Kim, por todo suporte odontológico, auxiliando na execução deste estudo.

*“Não se preocupe com o futuro, pois ele
está nas mãos de DEUS.”*

RESUMO

Introdução: A Periodontite é uma doença inflamatória crônica que afeta os tecidos que sustentam os dentes, podendo causar perda dentária e problemas de saúde sistêmicos, como doenças cardiovasculares e diabetes. Essa condição está associada à produção de micropartículas por várias células do corpo, que são importantes na coagulação sanguínea, inflamação e doenças cardiovasculares. Interleucinas como IL-6 e TNF- α estão envolvidas na inflamação e degradação dos tecidos periodontais, enquanto IL-10 tem um papel anti-inflamatório. Compreender essas proteínas é essencial para entender e controlar as respostas imunes em doenças como a Periodontite. **Objetivos:** Avaliar os níveis de micropartículas circulantes (plaquetárias, endoteliais e monocíticas) bem como de interleucinas no plasma, no basal e 30 dias pós-tratamento periodontal não cirúrgico. **Métodos:** Foram coletadas amostras de 44 pacientes, classificados com Periodontite moderada a grave com Diabetes (N=25) e sem Diabetes (N=19). As micropartículas endoteliais, plaquetárias e monocíticas foram avaliadas no plasma pobre em plaquetas, após incubação com anticorpos específicos e leitura em citômetro de fluxo. Para avaliar níveis das citocinas foi utilizado o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). **Resultados:** O estudo contou com a participação de 13 mulheres e 16 homens no grupo de pacientes com Diabetes e 13 mulheres e 12 homens no grupo sem Diabetes. A idade média dos participantes foi entre 57 e 48 respectivamente, apresentando uma HbA1c de 8,18 para os pacientes com Diabetes e 5,40 para os indivíduos sem Diabetes. Apesar de não haver diferenças significantes nos níveis de micropartículas antes e 30 dias após o tratamento, independente da presença ou não de Diabetes, pacientes com Diabetes apresentaram um aumento nas interleucinas IL-6, TNF- α e IFN- γ enquanto no grupo sem Diabetes, não foram encontradas diferenças. **Conclusão:** No estudo não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de micropartículas circulantes no contexto do tratamento periodontal avaliado, já as correlações entre micropartículas e citocinas mostram associações complexas entre esses elementos na periodontite e diabetes. O estudo ressalta a importância de entender os mecanismos imunológicos e inflamatórios em pacientes com diabetes, especialmente em relação à saúde bucal.

Palavras chaves: Micropartículas, IL-6, IL-10, Periodontite, Diabetes, Citocinas.

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is a chronic inflammatory disease that affects the tissues that support the teeth, which can cause tooth loss and systemic health problems, such as cardiovascular disease and diabetes. This condition is associated with the production of microparticles by various cells in the body, which are important in blood clotting, inflammation and cardiovascular diseases. Interleukins such as IL-6 and TNF- α are involved in inflammation and degradation of periodontal tissues, while IL-10 has an anti-inflammatory role. Understanding these proteins is essential to understanding and controlling immune responses in diseases such as Periodontitis.

Objectives: To evaluate the levels of circulating microparticles (platelet, endothelial and monocytic) as well as interleukins in plasma, at baseline and 30 days after non-surgical periodontal treatment. **Methods:** Samples were collected from 44 patients, classified as having moderate to severe Periodontitis with Diabetes (N=25) and without Diabetes (N=19). Endothelial, platelet and monocytic microparticles were evaluated in packet-poor plasma, after incubation with specific antibodies and reading on a flow cytometer. To evaluate cytokine levels, the Enzyme Immunosorbent Assay (ELISA) was used. **Results:** The study included the participation of 13 women and 16 men in the group of patients with Diabetes and 13 women and 12 men in the group without Diabetes. The average age of the participants was between 57 and 48 respectively, presenting an HbA1c of 8.18 for patients with Diabetes and 5.40 for individuals without Diabetes. Although there were no significant differences in the levels of microparticles before and 30 days after treatment, regardless of the presence or absence of Diabetes, patients with Diabetes showed an increase in interleukins IL-6, TNF- α and IFN- γ while in the group without Diabetes, no differences were found. **Conclusion:** In the study, no significant differences were observed in the concentrations of circulating microparticles in the context of the periodontal treatment evaluated, whereas the correlations between microparticles and cytokines show complex associations between these elements in periodontitis and diabetes. The study highlights the importance of understanding immunological and inflammatory mechanisms in patients with diabetes, especially in relation to oral health.

Keywords: Microparticles, IL-6, IL-10, Periodontitis, Diabetes, Cytokines.

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Dados demográficos dos participantes do estudo. _____ 27
- Tabela 2** - Porcentagem de micropartículas circulantes no plasma pobre em plaquetas, comparações entre visitas. _____ 27
- Tabela 3** - Porcentagem de micropartículas circulantes no plasma pobre em plaquetas, comparações intra grupos (basal e após tratamento para cada grupo) e entre grupos (com e sem Diabetes) _____ 28
- Tabela 4** - Correlações das micropartículas e interleucinas no grupo sem Diabetes em ambas as visitas (T0 e T1). _____ 31
- Tabela 5** - Correlações das micropartículas e interleucinas no grupo com Diabetes em ambas as visitas (T0 e T1). _____ 32

Lista de Figuras

Figura 1 - Concentração plasmática das interleucinas pró-inflamatórias IL-6 (A), TNF- α (B), IFN- γ (C) e interleucina anti-inflamatória IL-10 (D). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ _____ 29

Figura 2 - Modulação das interleucinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, IL-6/IL-10 (A), TNF- α /IL-10 (B) e IFN- γ /IL-10 (C). * $p < 0,05$ _____ 30

Lista de Abreviações e Siglas

DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DP	Periodontite
DCV	Doença Cardiovascular
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção enzimática
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
HbA1c	Hemoglobina Glicada
IL-6	Interleucina 6
IL -10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IFN- γ	Interferon-gama
MP	Micropartículas
MPE	Micropartículas Endoteliais
MPM	Micropartículas Monolíticas
MPP	Micropartículas Plaquetárias

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
1.1 Periodontite.....	14
1.2 Diabetes Mellitus e Periodontite	15
1.3 Doença Cardiovascular e Periodontite	16
1.4 Micropartículas Circulantes	17
1.5 IL-6 na Periodontite	19
1.6 IL-10.....	19
1.7 IFN- γ	20
1.8 Fator de Necrose Tumoral (TNF- α).....	21
2 – JUSTIFICATIVA.....	22
3 – OBJETIVO	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivo Específico.....	23
4 – MÉTODOS.....	24
4.1 Avaliação Clínica Periodontal e Tratamento Periodontal	24
4.2 Quantificação e Caracterização Fenotípica de Micropartículas Circulantes	25
4.3 Quantificação das Citocinas	26
4.4 Análise Estatística.....	26
6 – DISCUSSÃO	33
7 – CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	47

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Periodontite

A Periodontite está entre uma das causas mais frequentes da perda dos dentes em adultos.¹ A Periodontite é definida como uma doença inflamatória crônica que acomete as estruturas de proteção e inserção dentária, de origem multifatorial, e está associada com o acúmulo do biofilme disbiótico que contém patógenos anaeróbicos, sendo considerado o fator etiológico inicial da Periodontite.¹⁻³ O biofilme consiste em uma película granular composta por bactérias e seus produtos, células descamadas e o polímero extracelular e pode se desenvolver mais facilmente nas superfícies próximas ao colo, podendo levar à lesão tecidual e, às vezes, à ruptura periodontal.⁴ Estudos mostraram uma relação direta entre quantidade de biofilme acumulado, nível de inflamação e destruição tecidual.⁵

As formas mais comuns da inflamação bucal compreendem a Gengivite, que antecede a Periodontite, onde ocorre a presença dos sinais clínicos como vermelhidão, sangramentos e edemas, limitando-se à gengiva, já a Periodontite está associada ao acometimento do periodonto de proteção e sustentação, causando uma destruição do osso alveolar, dos ligamentos dentários, perda do reboto do osso alveolar, migração apical do epitélio juncional e formação de bolsas periodontais, reabsorção do osso alveolar, causando a mobilidade dentária e perda da função mastigativa com o avanço da doença.^{1,6} Na Gengivite ocorre um processo inflamatório que altera o conjunto de bactérias gram positivas, que são comuns da cavidade oral, em bacilos gram negativos e anaeróbios.⁷

A progressão e manifestação da Periodontite vão decorrer da resposta imune do indivíduo, fatores comportamentais e socioeconômicos, tais como más higienizações bucal, tabagismo, etilismo, sexo, idade, renda e outras doenças sistêmicas (como Doença Cardiovascular e Diabetes).^{3,8}

A Periodontite é uma das principais doenças da cavidade oral que apresenta uma taxa de prevalência alta e de acometimento global, ocupando a segunda maior causa de doença dentária na população humana, estando mais frequente em

indivíduos adultos, variando nas diversas regiões do mundo.⁹⁻¹¹ Na América do Sul, incluído o Brasil, os estudos e informações são baixas, porém nos EUA a Periodontite tem uma prevalência de 50%.⁸

Nas últimas décadas, a Periodontite tem sido associada ao aparecimento de distúrbios sistêmicos, incluindo doenças cardiovasculares (DCV) e Diabetes.¹² Os patógenos presentes no biofilme destroem o epitélio da bolsa periodontal, permitindo a entrada de endotoxinas e exotoxinas nocivas na corrente sanguínea, levando à disseminação bacteriana e infecção sistêmica, conseqüentemente tendo um aumento da resposta inflamatória.⁷

1.2 Diabetes Mellitus e Periodontite

Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, causada por uma irregularidade na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas.¹³

A *American Diabetes Association* (ADA) define para o diagnóstico de DM valores de hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$.¹⁴ O Diabetes tipo 1 consiste na deficiência ou ausência completa de secreção de insulina que acontece pelo sistema imunológico atacar equivocadamente as células beta, e acomete cerca de 5 a 10% do total de pessoas com a doença. O Diabetes tipo 2 é quando o organismo não consegue usar adequadamente a insulina que produz ou não produz insulina suficiente para controlar a glicemia, ou seja, baseia-se na resistência a esse hormônio, sendo o tipo mais comum e estando presente em 90% das pessoas portadoras de DM.¹⁵

A prevalência de DM está aumentando nas duas últimas décadas por causa do crescimento e envelhecimento da população, maior urbanização, e o aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo. Estima-se que a população mundial com Diabetes seja de 382 milhões de pessoas e que chegará em 471 milhões em 2035.¹³

A Periodontite é a causa mais comum de inflamação crônica em pacientes com Diabetes. Estudos mostram a relação entre a destruição do tecido periodontal

e a gravidade da resistência à insulina, onde o Diabetes é um fator predisponente da Periodontite e a Periodontite dificulta o controle metabólico em pacientes com Diabetes, mostrando uma relação clara entre as doenças.¹⁶⁻¹⁸

Pode-se explicar a relação entre Diabetes e Periodontite por alguns mecanismos como as alterações microvascular e fluido crevicular, pois a inflamação associada à Periodontite não se limita apenas ao tecido gengival, mas também pode desencadear uma resposta inflamatória sistêmica causando distúrbio no metabolismo e alteração da resposta imune do hospedeiro e essa associação entre as duas doenças tem sido relatada por estudos desde a década de 1960, sendo que ambas estão associadas a um estado pró-inflamatório, com estresse oxidativo, maior recrutamento de leucócitos, aumento na produção de mediadores inflamatórios e apoptose.^{16,19}

1.3 Doença Cardiovascular e Periodontite

Há evidências crescentes que sugerem uma conexão entre a Doença Cardiovascular (DCV) e a Periodontite. A DCV abrange um grupo de doenças que afetam o coração e os vasos sanguíneos, incluindo angina, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e doença arterial periférica.^{20,21}

Por outro lado, a Periodontite é uma forma grave da Gengivite, caracterizada pela inflamação das estruturas que sustentam os dentes, como gengivas, ligamentos periodontais e osso alveolar, causando uma resposta imunológica exagerada às bactérias presentes na placa bacteriana que se acumula nos dentes, levando a uma inflamação sistêmica pela liberação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea. Acredita-se que essa inflamação sistêmica desempenhe um papel na progressão da Doença Cardiovascular.^{19,22,23}

As DCV estão presentes entre as principais causas de morte no mundo e entre os fatores de risco associados à DCV estão o sedentarismo, hábitos alimentares não saudáveis, obesidade, tabagismo e a Periodontite. Esses fatores podem aumentar o risco de desenvolver ambas as condições, o que pode tornar a associação entre elas mais complexa.^{19,23}

1.4 Micropartículas Circulantes

Micropartículas (MP) são uma população de vesículas liberadas por diversas células, conhecidas por carregarem conteúdo de sua célula de origem, como mRNA, lipoproteínas, citocinas, dentre outros. Essa liberação das MP acontece após apoptose ou ativação por diferentes estímulos, como por exemplo liberação de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas e citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1 β).²⁴⁻²⁶

Cerca de 70 a 90% das MP são de origem plaquetária (MPP), embora todas as células sanguíneas possam originá-las e indivíduos saudáveis assim como pacientes com diferentes doenças expressam MP circulantes de origens distintas.^{27,28}

O papel das MP não era muito bem descrito até a década de 90, mas um estudo em 1996 mostrou que as MP são importantes na resposta imune adaptativa e como vetores na troca intracelular de informações biológicas, mediante a caracterização e quantificação dessas MP em algumas situações, Diabetes, infarto, depressão e insuficiência renal.²⁹

A caracterização das MP pode ser feita no plasma por meio da positividade para as proteínas de superfície, que pode variar de acordo com o estímulo que recebe.³⁰ As MPP expressam proteínas de superfície CD42 e CD31, enquanto as micropartículas endoteliais (MPE) expressam diferentes proteínas de superfície, mas a maior parte dos estudos indicam CD105, CD51 e CD144 para definir essa subpopulação, que está relacionada à disfunção endotelial, proliferação, angiogênese, aumento de estresse oxidativo, crescimento tumoral, diferenciação de células progenitoras, dentre outros.³⁰⁻³² As micropartículas monolíticas (MPM) são identificadas pela presença da proteína de superfície CD14 e tem sido relacionada à sepse, coagulação, doença renal e disfunção endotelial.³³

Estudos mostram a função das MPP associada à trombose, coagulação e inflamação, assim como a importância na regeneração tecidual, por estarem relacionadas angiogênese, ou seja, à formação de novos vasos sanguíneos.³⁴

Atualmente existem vários trabalhos relacionando MP circulantes e Diabetes.³⁵ Um estudo mostrou liberação de MPP, MPM e MPE em diabéticos com

e sem Doença Renal estabelecida.³⁶ Pesquisas mostram que a MPP estimula a cascata de coagulação e aumentam as adesões de leucócitos e células endoteliais e ambos os eventos estão associados ao Diabetes.³⁷

A presença aumentada de micropartículas no fluido crevicular gengival está associada à resposta inflamatória local, à ativação celular e à liberação dessas vesículas extracelulares. Essas interações podem levar à disseminação das micropartículas para o sistema circulatório, contribuindo para seu aumento no plasma. MPs circulantes podem penetrar nas células, transferir antígenos, afetar a expressão gênica celular e ativar vias de sinalização celular que estão associadas à proliferação, sobrevivência, adesão e quimiotaxia.³⁸ Um estudo relatou que as MPs em pacientes com DM tipo 2 foi maior do que a de indivíduos saudáveis, e esse aumento foi relacionado principalmente ao aumento do número de MPs de origem plaquetária podendo estar envolvidas no desenvolvimento de complicações diabéticas principalmente pela sua ação pró-coagulante.³⁹

Um estudo mostrou a presença de micropartículas derivadas de neutrófilos e plaquetas no fluido crevicular gengival de indivíduos com Periodontite grave e Diabetes tipo 2. O estudo contava com doze pacientes ($56,2 \pm 7,2$ anos), o fluido crevicular gengival foi coletado usando tiras de filtro de locais profundos e rasos e todas as amostras foram positivas em locais profundos, mostrando a presença de micropartículas derivadas de neutrófilos e plaquetas no fluido crevicular gengival desses pacientes.⁴⁰

Em outro estudo realizado em pacientes pré-hipertensos e com Periodontite de moderada a severa, submetido a tratamento periodontal não cirúrgico por seis meses, foi encontrada redução na porcentagem das micropartículas endoteliais após tratamento e diminuição da pressão sanguínea, sem uso de medicamentos, mostrando a importância do tratamento periodontal no contexto da hipertensão e aterosclerose.⁴¹

1.5 IL-6 na Periodontite

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória secretada por uma variedade de células, incluindo macrófagos, células epiteliais, fibroblastos e linfócitos. Ela desempenha um papel crucial na mediação da resposta inflamatória, estimulando a produção de outras citocinas, promovendo a ativação de células imunes e regulando a diferenciação celular. No contexto da Periodontite, a IL-6 tem sido associada à destruição do osso alveolar, inflamação tecidual e progressão da doença.^{42,43}

Estudos *in vitro* mostraram que a exposição de células periodontais à bactéria *Porphyromonas gingivalis*, um importante patógeno periodontal, induz a produção de IL-6. Além disso, a IL-6 tem sido implicada na regulação do metabolismo ósseo, estimulando a atividade dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção do osso alveolar. Estudos em modelos animais e com pacientes com Periodontite também mostraram níveis elevados de IL-6 nos tecidos periodontais inflamados. A presença de IL-6 pode desencadear respostas inflamatórias locais exacerbadas, levando à degradação do tecido conjuntivo e perda óssea.⁴⁴

1.6 IL-10

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel importante na modulação da resposta imune na Periodontite. Vários estudos têm investigado o papel da IL-10 nessa condição e sugerem que ela exerça um efeito protetor no desenvolvimento e progressão da doença.⁴³

A resposta imune na Periodontite envolve a interação complexa entre bactérias patogênicas presentes na placa bacteriana e a resposta do sistema imunológico do hospedeiro. Em indivíduos saudáveis, essa resposta é equilibrada, resultando em um processo inflamatório controlado e resolução da infecção. No entanto, em pacientes com Periodontite, ocorre uma resposta imune exagerada,

levando a um desequilíbrio entre a destruição tecidual e a capacidade de reparação.⁴⁵

A IL-10 é produzida por diferentes células do sistema imunológico, incluindo linfócitos T regulatórios, macrófagos e células dendríticas. Ela desempenha efeitos anti-inflamatórios ao inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interferon gama (IFN- γ).⁴⁵

Estudos têm mostrado que a expressão de IL-10 está diminuída em pacientes com Periodontite. Essa redução pode estar associada a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e a uma maior destruição tecidual. Além disso, a deficiência de IL-10 em modelos experimentais de Periodontite resulta em maior perda óssea e inflamação mais intensa.^{46,47}

Intervenções terapêuticas visando aumentar os níveis de IL-10 têm sido investigadas como uma abordagem para o tratamento da Periodontite. Estratégias, como a administração de terapia com IL-10 exógena e a estimulação da produção endógena de IL-10, têm mostrado resultados promissores em estudos pré-clínicos. Essas abordagens têm como objetivo restabelecer o equilíbrio da resposta imune, reduzindo a inflamação e promovendo a regeneração dos tecidos periodontais.⁴⁸

1.7 IFN- γ

O interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina importante produzida pelas células T e células natural killer (NK). Ele desempenha um papel importante na resposta imune, regulando a ativação de macrófagos e outras células envolvidas na inflamação. Estudos recentes têm sugerido que o IFN- γ pode desempenhar um papel tanto protetor quanto prejudicial na Periodontite, dependendo do estágio da doença e do contexto imunológico.⁴⁹

Estudos têm mostrado que o IFN- γ está aumentado na Periodontite, indicando sua participação na resposta imune local. Ele tem sido associado à ativação de enzimas como as metaloproteinases (MMPs), que desempenham um

papel importante na degradação do tecido conjuntivo periodontal. Essa degradação resulta na perda do suporte ósseo alveolar e contribui para a progressão da Periodontite.^{43,49}

Além disso, o IFN- γ também influencia a resposta imune adaptativa na Periodontite. Ele pode modular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , bem como citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Essa regulação complexa pode influenciar a resposta imune global na Periodontite, afetando a progressão da inflamação e a destruição tecidual.⁴⁸

1.8 Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados e células T. Ele desempenha um papel fundamental na resposta imunológica, atuando como um mediador chave na cascata inflamatória. No contexto da Periodontite, o TNF- α tem sido associado a múltiplos efeitos prejudiciais aos tecidos periodontais.⁴⁹

Em primeiro lugar, o TNF- α desencadeia a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e a IL-6, amplificando a resposta inflamatória local. Essas citocinas têm a capacidade de recrutar e ativar células inflamatórias adicionais, resultando em um ambiente inflamatório crônico no periodonto.^{50,51}

Além disso, o TNF- α exerce efeitos diretos na degradação dos tecidos periodontais. Ele induz a expressão de enzimas destrutivas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs), que são responsáveis pela degradação do colágeno e da matriz extracelular. A atividade aumentada das MMPs compromete a integridade do ligamento periodontal e do osso alveolar, levando à reabsorção óssea e à formação de bolsas periodontais.^{52,53}

Outro mecanismo pelo qual o TNF- α contribui para a progressão da Periodontite é a indução da apoptose nos tecidos periodontais. A apoptose excessiva de células do epitélio gengival e de fibroblastos pode comprometer a integridade dos tecidos e dificultar a regeneração.⁶

O TNF- α também está envolvido na regulação da resposta imunológica adaptativa. Ele pode modular a função de células T e B, afetando a produção de anticorpos e a atividade das células imunes. Essa regulação desequilibrada pode levar a uma resposta imunológica descontrolada, contribuindo para a progressão da Periodontite.⁴⁵

2 – JUSTIFICATIVA

A associação entre Periodontite, Doença Cardiovascular e Diabetes é um campo de pesquisa importante, pois são problemas de saúde comuns e com alta carga de morbidade e mortalidade em todo o mundo.^{54,55}

Pesquisas sugerem que a inflamação sistêmica e a disfunção endotelial são características comuns em todas as três condições. A Periodontite, por exemplo, é uma doença inflamatória crônica, e a inflamação resultante pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose e do Diabetes tipo 2. Ao compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos compartilhados, podemos identificar estratégias de prevenção.²²

Portanto, a compreensão dos vínculos entre essas condições pode ter implicações significativas para a prevenção, diagnóstico precoce e tratamento adequado, o que pode melhorar a saúde geral da população e reduzir os custos relacionados ao tratamento dessas doenças.

3 – OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento Periodontal não cirúrgico em relação as micropartículas e interleucinas circulantes, na presença ou não de Diabetes.

3.2 Objetivo Específico

- Avaliar os níveis de micropartículas circulantes (plaquetárias, endoteliais e monocíticas) por citometria de fluxo ao longo do tratamento periodontal (basal e 30 dias).
- Avaliar os níveis de interleucinas plasmática (IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) ao longo do tratamento periodontal (basal e 30 dias).

4 – MÉTODOS

O estudo se baseia em um ensaio clínico que inclui pacientes em acompanhamento na Clínica de Odontologia da Universidade Santo Amaro – UNISA na faixa etária entre 40 e 75 anos, de ambos os sexos, diagnosticados com Periodontite moderado e avançado, associada ou não ao Diabetes.

Dados como fatores de risco, exames clínicos e coleta de amostras de sangue foram obtidos por meio de visitas clínicas, 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 (ReBEC RBR-35szwc).

Como critérios de inclusão: pacientes com Periodontite (moderada ou grave), diagnosticada por duas periodontistas e que tivessem no mínimo 10 dentes na cavidade bucal. Como critérios de exclusão ser desdentado, ter recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses, ser fumante, apresentar gengivite ou Periodontite leve.

Os pacientes foram distribuídos em dois grupos: Periodontite com Diabetes e Periodontite sem Diabetes. A presença de Diabetes Mellitus foi determinada por meio de:

- 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.

4.1 Avaliação Clínica Periodontal e Tratamento Periodontal

Os pacientes foram clinicamente avaliados por duas periodontistas previamente treinadas. Foram examinadas 10% da amostra 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, sendo 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-cimento (JEC) até a margem gengival (MG) somando à medida da PS. Ou seja: $NCI = PS + (JEC - MG)$.

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. A higiene bucal foi avaliada pelo Índice de Placa.

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

4.2 Quantificação e Caracterização Fenotípica de Micropartículas Circulantes

Após ser colhido o sangue periférico dos pacientes em tubos de sangue contendo citrato, as amostras foram centrifugadas a 160 g, 22°C por 10 minutos para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi então centrifugado a 1500 g, 22°C por 6 minutos, para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). A seguir, o PPP (70 uL) foi incubado por 20 minutos, temperatura ambiente com o anti-CD105 conjugado com APC, anti-CD42 conjugado com FITC combinado com o anti-CD31 conjugado com PE e anti-CD14, para identificar micropartículas endoteliais, plaquetárias e monocíticas, respectivamente. Como

controles foram utilizados os isotipos IgG1 FITC, IgG1 PE, IgG1 APC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Após incubação foram adicionados 300 μ L de PBS e imediatamente foi feita a leitura em citômetro de fluxo (FACSCalibur - BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), sendo adquiridos aproximadamente 30.000 eventos.

4.3 Quantificação das Citocinas

Para a quantificação das citocinas IL-10, IL-6, TNF e IFN- γ foi utilizado o kit comercial de ELISA (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante para cada kit.

Primeiro a placa de 96 poços foi revestida com anticorpo de captura durante a noite em 4°C. Foram feitas 3 lavagens, adicionados 200 μ L de Diluente ELISA/ELISPOT (1X) e incubado em temperatura ambiente por 1 hora, os poços foram lavados pelo menos uma vez com Tampão de Lavagem e foi adicionado 100 μ L de amostras (plasma) aos poços apropriados com 100 μ L de Diluente ELISA/ELISPOT (1X) ao poço em branco, a placa foi selada e incubada por 2 horas. Foram feitas mais 3 lavagens, foi adicionado 100 μ l de anticorpo de detecção diluído a todos os poços, selado e incubado por mais 1 hora. Após a incubação ocorreu mais uma lavagem e adicionado 100 μ L de Streptavidin-HRP diluído, incubado por 30 minutos, logo em seguida ocorre mais uma lavagem e coloca 100 μ l de solução 1X TMB aos poços e deixa por 15 minutos em temperatura ambiente por fim foi adicionado 100 μ l de solução de parada e realizado a leitura da placa a 450 nm.

4.4 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. Foi considerado nível de significância $p < 0,05$.

5 – RESULTADOS

A Tabela 1 representa os dados demográficos basais dos pacientes inseridos no estudo.

Tabela 1 - Dados demográficos dos participantes do estudo.

	Grupo com Diabetes	Grupo sem Diabetes
N	25	19
F/M	13/16	13/12
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

Na tabela 2 estão representadas as porcentagens de micropartículas circulantes no plasma pobre em plaquetas para todos os participantes do estudo; em uma comparação entre visitas, pode-se notar que as MPP são as mais abundantes em ambas as visitas (66,45 e 62,82). Não houve diferenças nas três populações de MP, quando se comparou o basal e 30 dias após o término do tratamento periodontal.

Tabela 2 - Porcentagem de micropartículas circulantes no plasma pobre em plaquetas, comparações entre visitas.

Micropartículas	Basal	30 dias	p intra grupos
Endoteliais	0,40 (0,10)	0,19 (0,05)	0,3
Plaquetárias	66,45 (3,52)	62,82 (5,15)	0,08
Monocíticas	6,06 (0,67)	6,63 (1,03)	0,88

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).

Na Tabela 3 foram comparados os níveis de micropartículas em cada grupo separadamente, antes e 30 dias após o término do tratamento. Não houve diferenças em ambos os grupos após o tratamento; também não foram

encontradas diferenças quando foram comparados os grupos no basal e após 30 dias do tratamento.

Tabela 3 - Porcentagem de micropartículas circulantes no plasma pobre em plaquetas, comparações intra grupos (basal e após tratamento para cada grupo) e entre grupos (com e sem Diabetes)

Micropartículas	Com Diabetes		p intra grupos	Sem Diabetes		p intra grupos	p entre grupos	
	Basal	30 dias		Basal	30 dias		Basal	30 dias
Endoteliais	0,57 (0,18)	0,20 (0,06)	0,15	0,24 (0,06)	0,18 (0,11)	0,83	0,43	0,56
	65,81	67,38		68,42	58,99			
Plaquetárias	(5,95)	(6,45)	0,38	(3,83)	(8,98)	0,14	0,68	0,49
Monocíticas	6,57 (1,06)	6,14 (1,04)	0,69	5,59 (0,86)	7,64 (2,07)	0,88	0,57	0,93

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).

Na figura 1 estão representados os resultados das interleucinas IL-6(A), TNF- α (B), IFN- γ (C) e IL-10 (D) nas visitas basal (T0) e 30 dias após o tratamento (T1) nos grupos com e sem Diabetes. Nos pacientes com Diabetes, as interleucinas pró-inflamatórias estão em maior abundância, mostrando o perfil mais inflamado desses pacientes, porém não houve diferenças antes e 30 dias após o tratamento.

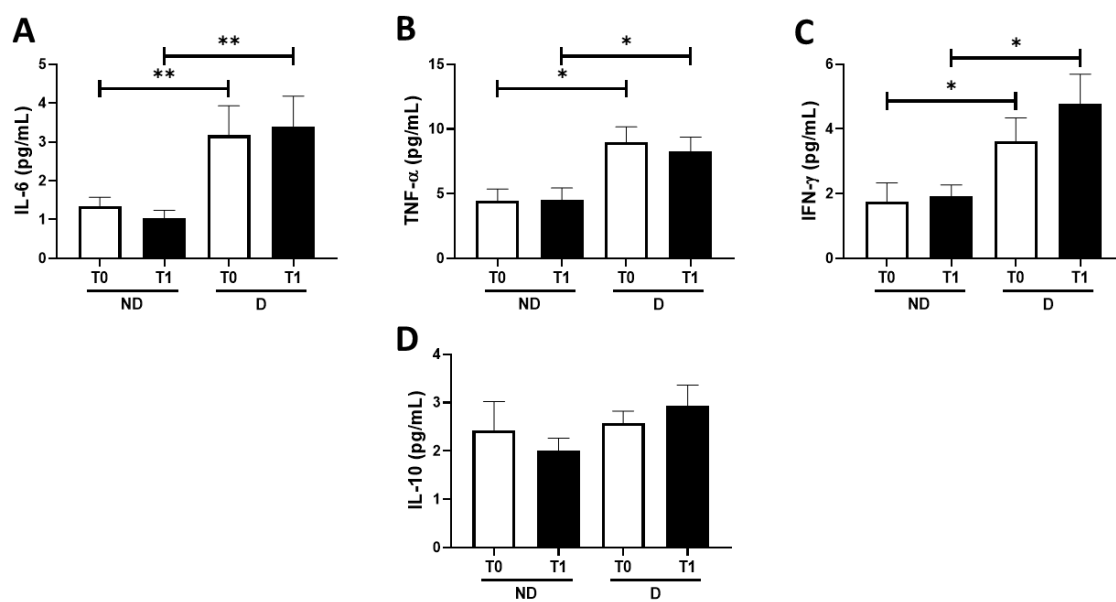


Figura 1 - Concentração plasmática das interleucinas pró-inflamatórias IL-6 (A), TNF- α (B), IFN- γ (C) e interleucina anti-inflamatória IL-10 (D). *p<0,05 e **p<0,01

Na Figura 2 estão representadas as razões entre as citocinas IL-6/IL10 (Figura 2-A), TNF- α /IL-10 (Figura 2-B), IFN- γ /IL-10 (Figura 2-C), nos grupos com Diabetes e sem Diabetes na presença de Periodontite. Com relação à análise intra grupos (comparações entre basal e 30 dias após o término do tratamento) não foram observados resultados estatisticamente significantes, no entanto, na análise entre grupos (comparações entre os grupos com Diabetes e sem Diabetes, tanto no basal quanto 30 dias após o término do tratamento), foram encontradas maiores razões IL-6/IL-10 (Figura A, $p < 0,05$) nos pacientes com Diabetes em T0 e T1, assim como em IFN- γ /IL-10 (Figura C, $p < 0,05$). Já na razão TNF- α /IL-10 (Figura 2-B) não houve estatística.

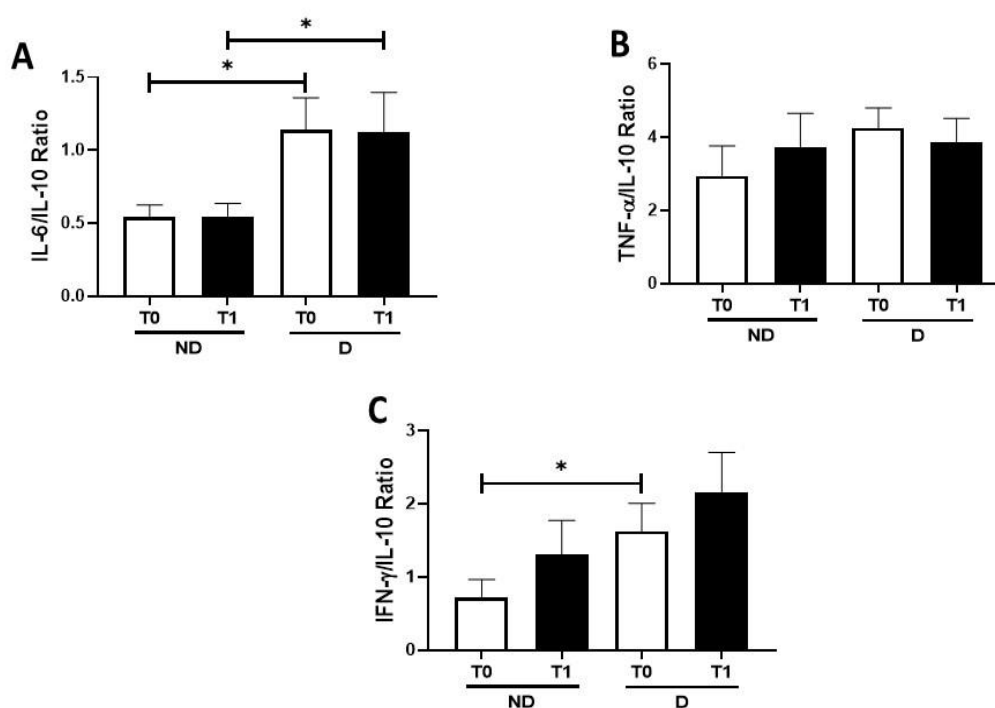


Figura 2 - Modulação das interleucinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, IL-6/IL-10 (A), TNF- α /IL-10 (B) e IFN- γ /IL-10 (C). * $p < 0,05$

Na tabela 4 estão representadas as análises de correlação entre os analitos avaliados no presente estudo. Houve correlação positiva entre a IL-6 e IL-10 no grupo sem Diabetes no basal, onde o paciente que apresenta mais interleucina pró-inflamatória vai também apresentar um maior valor de interleucina anti-inflamatória, estando regulados (Figura 2-A), assim como IFN- γ e IL-10 (Figura 2-C).

Após 30 dias do tratamento, houve uma correlação negativa da TNF- α entre IL-10, indicando um perfil mais pró-inflamatório, ao contrário do basal.

Tabela 4 - Correlações das micropartículas e interleucinas no grupo sem Diabetes em ambas as visitas (T0 e T1).

Grupo sem Diabetes	T0		Grupo sem Diabetes	T1	
	rho	p		rho	p
IL-6 X IL-10	0,569	0,0358	TNF-a X IL-10	-0,7	0,0432
MPP X IL-6	-0,608	0,021	MPP X TNF-a	-0,7	0,0432
MPP X TNF-a	-0,53	0,0534			
IFN-g X IL-10	0,712	0,0042			

Os dados acima representam as correlações positivas e negativas entre as interleucinas e micropartículas circulantes no grupo sem Diabetes, nas visitas basais (T0) e após tratamento (T1).

Com relação ao grupo com Diabetes no basal (Tabela 5), observou-se uma correlação positiva entre TNF- α e IL-6, mostrando um perfil realmente inflamado e também uma correlação positiva entre a IL-10 e MPE e uma relação negativa entre IL-10 e MPP. Após 30 dias do término do tratamento, houve uma correlação positiva entre TNF- α com IFN- γ e IL-10.

Tabela 5 - Correlações das micropartículas e interleucinas no grupo com Diabetes em ambas as visitas (T0 e T1).

Grupo com Diabetes	T0		Grupo com Diabetes	T1	
	rho	p		rho	p
IL-6 X TNF-a	0,503	0,0168	IL-6 X TNF-a	0,561	0,0257
MPE X IL-10	0,601	0,0003	IFN-g X TNF-a	0,697	0,0035
MPP X IL-10	-0,468	0,0279	IL-10 X TNF-a	0,718	0,0017
			MPP X IFN-g	0,589	0,0231
			MPE X IL-6	0,534	0,0402
			MPE X TNF-a	0,69	0,0056
			MPE X IFN-g	0,582	0,025

Os dados acima representam as correlações positivas e negativas entre as interleucinas e micropartículas circulantes no grupo com Diabetes, nas visitas basais (T0) e após tratamento (T1).

Foram avaliadas, também, possíveis correlações entre as interleucinas e MP, conforme Tabela 5. As MPE apresentam uma correlação positiva com IL-6, TNF- α e IFN- γ 30 dias após o término do tratamento, enquanto as MPM apresentaram correlação positiva com IFN- γ .

6 – DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento Periodontal não cirúrgico em relação às MP circulantes e citocinas plasmáticas e o estado inflamatório na presença ou não de Diabetes. Os principais achados referentes às MP não mostraram diferenças significantes, quando foram realizadas comparações intragrupos (antes e 30 dias após o término do tratamento) e comparações entre grupos (com e sem Diabetes), sugerindo que o tempo de tratamento possa não ter sido suficiente para uma modificação sistêmica de MP.

Um estudo realizado em 2017 com 107 participantes pré-hipertensos e com periodontite moderada a grave mostrou uma melhora significativa nas condições periodontais após seis meses de tratamento intensivo, sem o uso de terapia medicamentosa. Os participantes foram divididos em dois grupos: controle-tratamento e tratamento intensivo. O grupo de tratamento intensivo recebeu raspagem, alisamento radicular e aplicação local de pomada de cloridrato de minociclina, enquanto o grupo controle-tratamento teve apenas um ciclo padrão de raspagem. A avaliação ao longo de 1, 3 e 6 meses de tratamento mostrou uma redução na pressão arterial e nas MPE circulantes no grupo de tratamento intensivo em comparação com o grupo controle, indicando benefícios para pacientes pré-hipertensos com periodontite moderada a grave.⁴¹

No presente estudo, quando foram comparados os níveis de MP no basal e 30 dias após o término do tratamento não cirúrgico, não foram encontradas diferenças significantes, talvez pelo menor tempo de acompanhamento dos pacientes quando se compara ao estudo desenvolvido por Zhou e colaboradores (2017).⁴¹

O estudo de Figueiredo et al. (2017)⁴⁰ foi um dos primeiros a detectar a presença de micropartículas derivadas de neutrófilos (CD66b+) e plaquetas (CD41b+) no fluido crevicular gengival, embora tenha sido um estudo que avaliou apenas 12 participantes e não houve grupo controle.

Zahi Badran et al. (2015)⁵⁶ propuseram a ideia de que a Periodontite localmente gera altos níveis de MP, que circulam no sangue, possivelmente explicando o aumento do risco de doenças sistêmicas em pacientes com essa

condição. Estudos indicam que as doenças bucais podem desencadear distúrbios sistêmicos, especialmente na Periodontite, onde os biofilmes do periodonto entram em contato direto com o epitélio ulcerado da bolsa, constituindo uma possível via de entrada para bactérias e toxinas. A Periodontite é vista como uma fonte potencial de citocinas pró-inflamatórias, pois as citocinas do ambiente periodontal local podem ser transportadas na corrente sanguínea, participando de processos patológicos distantes, assim como as MP que circulam constantemente na vasculatura periodontal e, subsequentemente, na vasculatura geral, alcançando órgãos diversos.

Em um estudo de 2016, 39 pacientes com Diabetes Mellitus (DM), sendo 21 com DM e 18 com DM e Doença Renal Crônica (DRC), foram submetidos a tratamento hipolipemiante (sinvastatina 40 mg e ezetimiba 10 mg diariamente) por 8 a 10 semanas. Foi avaliada a influência desses agentes farmacológicos, especialmente estatinas, na modulação dos níveis de MP e marcadores pró-trombóticos. Pacientes com DM e DRC apresentaram níveis elevados de MP endoteliais, plaquetárias e monocíticas em comparação com aqueles com apenas DM. O tratamento com sinvastatina reduziu os níveis de MP pró-trombóticas derivadas de plaquetas e monócitos, bem como sua expressão de marcadores de ativação. Esses resultados sugerem que a redução da ativação plaquetária e a modulação da produção de MP podem contribuir para efeitos benéficos nas complicações aterotrombóticas em pacientes com DM e DRC, considerados de alto risco.⁵⁷

Um estudo com o objetivo de avaliar as respostas de EMP à hipoglicemia foi realizado com indivíduos com diabetes tipo 2 e um grupo controle sem diabetes, onde a hipoglicemia (<40 mg/dL) foi induzida por infusão intravenosa de insulina solúvel. Foram coletadas amostras de sangue no início do estudo e aos 0, 30, 60, 120, 240 minutos e 24 horas após a hipoglicemia. Após a hipoglicemia induzida por insulina, os níveis de EMPs circulantes foram máximos em 240 minutos e retornaram aos valores basais em 24 horas para ambos os grupos. Além disso, o grupo com diabetes mostrou aumento da área sob a curva (AUC) de EMPs CD31+ e EMPs CD105+ comparada ao controle, indicando que a avaliação de EMPs dentro de 24 horas poderia identificar um evento hipoglicêmico nesta população.⁵⁸

Xuguang Zhang et al (2014)⁵⁹ estudou o impacto do diabetes tipo 2 e da obesidade, separadamente ou em combinação, nas quantidades absolutas de MPP e MPM. Foram comparados 30 indivíduos que foram caracterizados como obesos e não obesos ou com diabetes tipo 2 e sem diabetes. Os indivíduos com diabetes tipo 2 apresentaram concentrações elevadas de MPP, já as concentrações de MPM não foram diferentes entre indivíduos com ou sem diabetes.

A análise da modulação entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no nosso estudo mostrou maiores razões IL-6/IL-10 nos pacientes com Diabetes em T0 e T1, assim como em IFN- γ /IL-10, mostrando uma modulação mais inflamatória dessa população. Uma razão IL-6/IL-10 e IFN- γ /IL-10 maior sugere uma predominância de citocinas pró-inflamatórias, indicando uma resposta inflamatória exacerbada. Isso pode ser interpretado como um desequilíbrio no sistema imunológico, com uma resposta inflamatória mais robusta, associada a uma resposta imunológica mais voltada para a inflamação. A interpretação desses resultados pode indicar que pacientes com Diabetes nos momentos T0 e T1 estão em desequilíbrio imunológico, com uma tendência para uma resposta mais inflamatória.

É importante mostrar que a avaliação da razão tem sido considerada uma forma indispensável para medir o equilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias, inclusive no diabetes.⁶⁰ Embora esses dados reforcem a natureza pró-inflamatória do diabetes, a ausência de diferença significativa na relação IFN- γ /IL-10 30 dias após o término do tratamento pode sugerir que esse procedimento foi capaz de influenciar esta proporção, aparentemente no grupo de não diabéticos.

Górska et al. (2003)⁶¹ mostrou a relação entre parâmetros clínicos e concentrações das principais citocinas (IL-1, TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10), fundamentais no início e na progressão da periodontite, em tecidos gengivais inflamados e amostras de soro de pacientes com periodontite grave. Os níveis de IL-1, TNF- α , IL-2, IFN- γ foram significativamente maiores em amostras de soro e tecidos gengivais inflamados de pacientes com periodontite do que em controles saudáveis. Porém, as amostras de soro de ambos os grupos mostraram grande variabilidade individual nos perfis de citocinas, e nenhuma associação entre as concentrações de citocinas e os parâmetros clínicos da periodontite foi encontrada,

no entanto as concentrações de TNF- α , IFN- γ e IL-2 encontradas em biópsias de tecidos de pacientes com periodontite foram maiores.

Pirih et al (2021)⁶² mostrou em meta-análise que indivíduos que apresentam a síndrome metabólica têm risco aumentado no desenvolvimento e progressão da Periodontite. Uma combinação de variantes genéticas do hospedeiro, microbioma e fatores de estilo de vida parece predispor a ambas as condições, mostrando uma associação bidirecional, com a presença de diabetes afetando a doença periodontal e, por sua vez, a doença periodontal afetando o diabetes. Esse mesmo estudo sugeriu que a Periodontite eleva os níveis de mediadores inflamatórios, como PCR e citocinas, e que o tratamento da doença auxilia na diminuição dos níveis circulantes desses mediadores inflamatórios. O estudo levantou que a resposta das células endoteliais a *P. gingivalis* e os ácidos graxos saturados podem desempenhar um papel no metabolismo da periodontite associada à síndrome, aumentando a expressão de citocinas inflamatórias induzidas por LPS.

Um estudo realizado em 2015 avaliou a associação do controle glicêmico e produção de citocinas em diabéticos tipo 2 com periodontite crônica. Foram realizadas biópsias gengivais de 40 pacientes, distribuídos em 4 grupos: saudável sem doença periodontal (S); pacientes saudáveis com periodontite (P); pacientes com diabetes tipo 2 controlado com periodontite (C) e pacientes com diabetes não controlado com periodontite crônica (D) e foi observado maior aumento dos níveis de IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ no grupo D quando comparado aos outros grupos, mostrando que o controle glicêmico pode estar associado à resposta imuno inflamatória de sítios com periodontite crônica.⁶³

A relação entre saúde bucal e saúde sistêmica tem sido objeto de estudo há alguns anos.¹⁰ Dois dos problemas de saúde mais prevalentes, a Periodontite e as doenças cardiovasculares, têm sido cada vez mais associados a outras condições médicas crônicas, como o Diabetes. Essas conexões complexas têm levado a um entendimento mais profundo de como diferentes sistemas do corpo estão interligados e podem influenciar-se mutuamente.^{22,23} E sabe-se que uma boa compreensão entre essas condições pode ter resultados significativos para uma melhora no tratamento e diagnóstico, impactando toda a saúde desses indivíduos.

Há vários estudos mostrando que o diabetes mal controlado afeta o desenvolvimento e a progressão da periodontite. Pacientes com Diabetes muitas vezes apresentam um perfil imunológico mais inflamado, o que pode contribuir para complicações da doença e para o desenvolvimento de outras condições médicas.¹³ Em pacientes com Diabetes, há um aumento na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e a IL-6.⁶⁴ No presente estudo, observou-se, confirmando dados da literatura, um perfil mais inflamado no grupo com Diabetes, tendo um aumento das interleucinas pró-inflamatórias estudadas (IL-6, TNF- α e IFN- γ), enquanto no grupo sem Diabetes esse perfil é mais controlado (Figura 1).

Stadler et al (2016)⁶⁵ demonstrou que a associação entre Periodontite e Diabetes pode aumentar o estado inflamatório do indivíduo. O estudo analisou os níveis de citocinas pro-inflamatórias e o TNF- α e IL-6 estavam aumentadas no grupo com as duas doenças.

Um estudo de Del Peloso Ribeiro et al. (2008)⁶⁶ mostrou um aumento significativo de IL-10 após o tratamento periodontal não cirúrgico, porém outro estudo realizado por Gamonal et al. (2000)⁶⁷ encontrou uma diminuição de IL-10 após o tratamento.

A relação das MP com a resposta inflamatória ocorre por diversos motivos, como por exemplo, a ativação celular induzida pelas citocinas durante eventos inflamatórios pode levar à liberação de MP. Células ativadas, como plaquetas, células endoteliais e leucócitos, liberam MP como parte de sua resposta ao estímulo inflamatório. Essas MP carregam consigo uma variedade de moléculas, incluindo citocinas como IL-6, IL-8, TNF- α , dentre outras, causando uma relação mútua.^{68,69}

Nesse contexto, no presente estudo foi possível observar que o grupo sem diabetes apresentava uma correlação negativa entre os níveis circulantes de IL-6 e MPP, sendo um achado interessante, visto que outros estudos mostraram uma correlação fortemente positiva entre estas essas moléculas,⁷⁰ enquanto o grupo com diabetes mostrou uma relação negativa entre IL-10 e MPP e positiva com MPE.

De acordo com a literatura, os níveis elevados de MPE estão relacionados à apoptose e ao dano epitelial, o que pode atuar como um biomarcador relevante no dano e no reparo do tecido endotelial, inclusive em indivíduos com diabetes,⁶⁰ as MPP têm um papel muito importante na comunicação celular, angiogênese, coagulação e associação com muitas doenças, como por exemplo o diabetes.⁷¹

A correlação positiva entre IL-10 e MPE no grupo com diabetes pode sugerir que havia um mecanismo regulatório, pois o aumento dos níveis de IL-10 está relacionado a uma melhora na função endotelial em pessoas com inflamação sistêmica e a correlação negativa entre IL-10 e MPP pode mostrar que esse estado regulatório não foi totalmente atingido.⁷²

Corroborando com os achados da literatura, os resultados obtidos 30 dias após o término do tratamento da Periodontite no nosso estudo, mostraram apenas correlações positivas significativas entre os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias e as MP circulantes. Enquanto no grupo sem diabetes detectamos apenas uma correlação positiva entre TNF- α e MPP, estando de acordo com a literatura, no grupo com diabetes verificamos várias correlações positivas entre MPE e TNF- α , IFN- γ e IL-6, que já foram relatadas em outros estudos com pacientes diabéticos.⁷³⁻⁷⁶ Já correlação positiva entre IFN- γ e MPM não foi relatada na literatura, porém está de acordo com a associação entre as citocinas pró-inflamatórias e as micropartículas.

7 – CONCLUSÃO

No presente estudo, no contexto do tratamento periodontal avaliado, não houve diferenças significativas nas concentrações de MP circulantes entre os grupos com e sem diabetes. Isso pode indicar que o tempo de tratamento pode não ter sido suficiente para causar uma modificação sistêmica nas MP.

Quanto às citocinas, os pacientes com diabetes apresentaram níveis mais elevados de interleucinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IFN- γ) em comparação ao grupo sem diabetes. Além disso, a análise das razões entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias indicou uma modulação mais inflamatória no grupo com diabetes.

As correlações entre MP e citocinas sugerem associações complexas entre esses elementos no contexto da periodontite e diabetes. Em resumo, o estudo fornece entendimentos sobre as interações entre saúde bucal e condições sistêmicas, destacando a importância de compreender os mecanismos imunológicos e inflamatórios subjacentes, especialmente em pacientes com diabetes.

REFERÊNCIAS

1. Diógenes R, Lins AU, Silva T, Norões A, Alípio De Sousa A, Lemos AD, et al. Ocorrência da doença periodontal e da sua relação com as maloclusões. [cited 2022 Oct 19]; Available from: www.cro-pe.org.br
2. RODRIGUES KT, MEDEIROS LADM de, SOUSA JNL de, SAMPAIO GA de M, RODRIGUES R de QF. Associação entre condições sistêmicas e gravidade da doença periodontal em pacientes atendidos na Clínica-Escola da UFCG. *Rev Odontol UNESP*. 2020;49.
3. Rigo L, Flores Bervian J, Gheller G, Fernandes G, Dal Zot von Meusel DR. Condições periodontais e fatores associados a profundidade de sondagem em pacientes de uma faculdade do sul do Brasil. *International journal of interdisciplinary dentistry*. 2020 Dec;13(3):135–9.
4. Mariotti A, Hefti AF. Defining periodontal health. *BMC Oral Health*. 2015 Sep 15;15(1).
5. Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. Vol. 13, *J Clin Periodontol*. 1986.
6. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. Vol. 83, *Periodontology 2000*. Blackwell Munksgaard; 2020. p. 26–39.
7. Carrizales-Sepúlveda EF, Ordaz-Farías A, Vera-Pineda R, Flores-Ramírez R. Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. Vol. 27, *Heart Lung and Circulation*. Elsevier Ltd; 2018. p. 1327–34.
8. TEIXEIRA FCF, MARÍN-LEÓN L, GOMES EP, PEDRÃO AMN, PEREIRA A da C, FRANCISCO PMSB. Perda de inserção periodontal e associações com indicadores de risco sociodemográficos e comportamentais. *Rev Odontol UNESP*. 2019;48.
9. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach.
10. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United HHS Public Access. *J Periodontol* [Internet]. 2015 [cited 2022 Oct 19];86(5):611–22. Available from: www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm.
11. De F, Pion LB, Werneck Barata De Araujo M, Feres M, Cortelli SC. Periodontal status of a population subgroup from Guarulhos, SP. *Rev Bras Epidemiol*. 2006;9(3):335–80.
12. Beck JD, Offenbacher S. Systemic Effects of Periodontitis: Epidemiology of Periodontal Disease and Cardiovascular Disease.
13. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015. AC Farmacêutica. 2015;1–390.

14. IDF Diabetes Atlas 10th edition [Internet]. Available from: www.diabetesatlas.org
15. Home - Sociedade Brasileira de Diabetes [Internet]. [cited 2022 Nov 1]. Available from: <https://diabetes.org.br/#diabetes>
16. Baeza M, Morales A, Cisterna C, Cavalla F, Jara G, Isamitt Y, et al. Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: Systematic review and meta-analysis. Vol. 28, *Journal of Applied Oral Science*. Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de Sao Paulo; 2020.
17. Khumaedi AI, Purnamasari D, Wijaya IP, Soeroso Y. The relationship of diabetes, periodontitis and cardiovascular disease. Vol. 13, *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. Elsevier Ltd; 2019. p. 1675–8.
18. 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 Dec 1;11(1).
19. Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, et al. Periodontal disease: A risk factor for diabetes and cardiovascular disease. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
20. Louhelainen AM, Aho J, Tuomisto S, Aittoniemi J, Vuento R, Karhunen PJ, et al. Oral bacterial DNA findings in pericardial fluid. *J Oral Microbiol*. 2014;6(1).
21. Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulske-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect*. 2006 Mar;8(3):687–93.
22. Reddy M, Pratibha Gopalkrishna B; Type 1 diabetes and periodontal disease: a literature review PRACTICAL IMPLICATIONS OF THIS RESEARCH. Vol. 56, *Can J Dent Hyg*. 2022.
23. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. Vol. 42, *Biomedical Journal*. Elsevier B.V.; 2019. p. 27–35.
24. França CN, de Oliveira Izar MC, do Amaral JB, Tegani DM, Fonseca FAH. Micropartículas como possíveis biomarcadores da doença cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 2014;104(2):169–74.
25. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg ; P Gabriel, Freyssinet JM, et al. Elevated Levels of Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in the Peripheral Circulating Blood of Patients With Acute Coronary Syndromes [Internet]. 2000. Available from: <http://www.circulationaha.org>
26. Vasina EM, Cauwenberghs S, Staudt M, Feijge MA, Weber C, Koenen RR, et al. Aging-and activation-induced platelet microparticles suppress apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release [Internet]. Vol. 3, *Am J Blood Res*. 2013. Available from: www.AJBlood.us/

27. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Muscari S, Muscari A. The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. Vol. 26, *Can J Cardiol*. 2010.
28. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FPHTM, Hack CE, Sturk A. Cell-derived Microparticles Circulate in Healthy Humans and Support Low Grade Thrombin Generation. Vol. 85, *Thromb Haemost*. 2001.
29. Tlaposo G, Nijman HW, Stoorvogel ~willem, Leijendekker R, Hardingfl Cornelis C, Melief JM, et al. B Lymphocytes Secrete Antigen-presentingVesicles [Internet]. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/183/3/1161/1107814/1161.pdf>
30. Bittencourt CR de O, Izar MC de O, França CN, Schwerz VL, Póvoa RM dos S, Fonseca FAH. Effects of chronic exercise on endothelial progenitor cells and microparticles in professional runners. *Arq Bras Cardiol*. 2017 Mar 1;108(3):212–6.
31. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2003 Jun 1;145(6):962–70.
32. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Jan;31(1):27–33.
33. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, et al. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy in Obese Patients with Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2012 Apr 26;366(17):1567–76.
34. Zhou B da, Guo G, Zheng LM, Zu LY, Gao W. Microparticles as novel biomarkers and therapeutic targets in coronary heart disease. *Chin Med J (Engl)*. 2015 Jan 20;128(2):267–72.
35. Al-Qaissi A, Papageorgiou M, Deshmukh H, Madden LA, Rigby A, Kilpatrick ES, et al. Effects of acute insulin-induced hypoglycaemia on endothelial microparticles in adults with and without type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2019 Mar 1;21(3):533–40.
36. Ruzicka M, Xiao F, Abujrad H, Al-Rewashdy Y, Tang VA, Langlois MA, et al. Effect of hemodialysis on extracellular vesicles and circulating submicron particles. *BMC Nephrol*. 2019 Aug 2;20(1).
37. Ogata N, Imaizumi M, Nomura S, Shozu A, Arichi M, Matsuoka M, et al. Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005 Jun;68(3):193–201.
38. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? Vol. 34, *European Journal of Clinical Investigation*. 2004.
39. Tsimerman G, Roguin A, Bachar A, Melamed E, Brenner B, Aharon A. Involvement of microparticles in diabetic vascular complications. *Thromb Haemost*. 2011;106(2):310–21.

40. Figueredo CM, Lira-Junior R, Sete MR, Fischer RG. Cell derived microparticles in gingival crevicular fluid from periodontitis patients with type 2 diabetes. *Braz Dent J*. 2017 Nov 1;28(6):675–8.
41. Zhou QB, Xia WH, Ren J, Yu BB, Tong XZ, Chen YB, et al. Effect of Intensive Periodontal Therapy on Blood Pressure and Endothelial Microparticles in Patients With Prehypertension and Periodontitis: A Randomized Controlled Trial. *J Periodontol*. 2017 Aug;88(8):711–22.
42. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jun 4];6. Available from: www.cshperspectives.org<http://www.cshperspectives.org><http://www.cshperspectives.org>
43. Feng Y, Chen Z, Tu SQ, Wei JM, Hou YL, Kuang ZL, et al. Role of Interleukin-17A in the Pathomechanisms of Periodontitis and Related Systemic Chronic Inflammatory Diseases. [cited 2023 Jun 4]; Available from: www.frontiersin.org
44. Shao MY, Huang P, Cheng R, Hu T. Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. 2009 [cited 2023 Jun 4];10(12):920–7. Available from: www.zju.edu.cn/jzus/
45. Garlet GP, Martins W, Fonseca BAL, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):671–9.
46. Zhu L;, Zhou C;, Chen S;, Huang D;, Jiang Y;, Lan Y;, et al. Osteoporosis and Alveolar Bone Health in Periodontitis Niche: A Predisposing Factors-Centered Review. *Bone Health in Periodontitis Niche: A Predisposing Factors-Centered Review Cells* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 4];2022:3380. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells11213380>
47. Isaac F, Gomes F, Gerusa M, Aragão B, Cesar F, Barbosa B, et al. Inflammatory Cytokines Interleukin-1 β and Tumour Necrosis Factor- α -Novel Biomarkers for the Detection of Periodontal Diseases: a Literature Review. [cited 2023 Jun 4]; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
48. Zhang Z, Zheng Y, Li X. Interleukin-10 gene polymorphisms and chronic periodontitis susceptibility: Evidence based on 33 studies. Vol. 54, *Journal of Periodontal Research*. Blackwell Munksgaard; 2019. p. 95–105.
49. Paulo Eduardo Przysiezny. *Imunologia - O Básico*. Instituto Memória; 2023. 682.
50. Majeed MM, Ahmed I, Roome T, Alali Y, Al-Aali KA, Ahmed N, et al. Association of the Unstimulated Whole Salivary Cytokine IL-1 β Levels with Initial, Moderate and Severe Periodontitis. A Case Control Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19:2889.
51. Papathanasiou E, Conti P, Carinci F, Lauritano D, Theoharides TC. IL-1 Superfamily Members and Periodontal Diseases. Vol. 99, *Journal of Dental Research*. SAGE Publications Inc.; 2020. p. 1425–34.

52. Andrukhov O, Behm C, Blufstein A, Rausch-Fan X. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells: Implication in disease and tissue regeneration. [cited 2023 Jun 4]; Available from: <https://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v11.i9.604>
53. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions HHS Public Access. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(12):745–59.
54. Wu CZ, Yuan YH, Liu HH, Li SS, Zhang BW, Chen W, et al. Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health*. 2020 Jul 11;20(1).
55. Resources | IDF Diabetes Atlas [Internet]. [cited 2023 Aug 6]. Available from: https://diabetesatlas.org/resources/?gclid=Cj0KCQjwrMKmBhCJARIsAHuEAPRSu0ZTRK44iE9ccnzRQsT2jdIyEHUIkwJe7igekHs49LYynRIF84MaAnFREALw_wcB
56. Badran Z, Struillou X, Verner C, Clee T, Rakic M, Martinez MC, et al. Periodontitis as a risk factor for systemic disease: Are microparticles the missing link? *Med Hypotheses*. 2015;84(6):555–6.
57. Almquist T, Mobarrez F, Jacobson SH, Wallén H, Hjemdahl P. Effects of lipid-lowering treatment on circulating microparticles in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2016 Jun 24;31(6):944–52.
58. Al-Qaissi A, Papageorgiou M, Deshmukh H, Madden LA, Rigby A, Kilpatrick ES, et al. Effects of acute insulin-induced hypoglycaemia on endothelial microparticles in adults with and without type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* [Internet]. 2019 Mar 30;21(3):533–40. Available from: <https://dom-pubs.pericles-prod.literatumonline.com/doi/10.1111/dom.13548>
59. Zhang X, McGeoch SC, Johnstone AM, Holtrop G, Sneddon AA, MacRury SM, et al. Platelet-derived microparticle count and surface molecule expression differ between subjects with and without type 2 diabetes, independently of obesity status. *J Thromb Thrombolysis*. 2014;37(4):455–63.
60. Patel DP, Craig JR, Myers JB, Brant WO, Hotaling JM. Serum Biomarkers of Erectile Dysfunction in Diabetes Mellitus: A Systematic Review of Current Literature. Vol. 5, *Sexual Medicine Reviews*. Elsevier B.V.; 2017. p. 339–48.
61. Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalin K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. Vol. 30, *J Clin Periodontol*. 2003.
62. Pirih FQ, Monajemzadeh S, Singh N, Sinacola RS, Shin JM, Chen T, et al. Association between metabolic syndrome and periodontitis: The role of lipids, inflammatory cytokines, altered host response, and the microbiome. Vol. 87, *Periodontology 2000*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 50–75.
63. FRANCO MM, MORAES MMM, DUARTE PM, NAPIMOGA MH, BENATTI BB. Glycemic control and the production of cytokines in diabetic patients with chronic periodontal disease. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia*. 2015 Dec;63(4):432–8.

64. Maria Helena C. de Carvalho, André Luiz Colaço, Zuleica Bruno Fortes. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50:304–12.
65. Stadler AF, Angst PDM, Arce RM, Gomes SC, Oppermann R V., Susin C. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. Vol. 43, *Journal of Clinical Periodontology.* Blackwell Munksgaard; 2016. p. 727–45.
66. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of Interleukin-1,-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.
67. Del Peloso Ribeiro É, Bittencourt S, Sallum EA, Nociti FH, Gonçalves RB, Casati MZ. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: A clinical, microbiological and immunological study. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(9):789–98.
68. Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-Induced Thrombosis: Mechanisms, Disease Associations and Management. Vol. 18, *Current Pharmaceutical Design.* 2012.
69. Rg J, Distler HW, Jü A, Huber LC, Seemayer CA, Reich Iii CF, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles [Internet]. 2004. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409781102
70. Nomura S, Imamura A, Okuno M, Kamiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, et al. Platelet-Derived Microparticles in Patients with Arteriosclerosis Obliterans: Enhancement of High Shear-Induced Microparticle Generation by Cytokines. Vol. 98, *Thrombosis Research.* 2000.
71. Kailashiya J. Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. Vol. 546, *Analytical Biochemistry.* Academic Press Inc.; 2018. p. 78–85.
72. Babbitt DM, Diaz KM, Fearheller DL, Sturgeon KM, Perkins AM, Veerabhadrapa P, et al. Endothelial activation microparticles and inflammation status improve with exercise training in African Americans. *Int J Hypertens.* 2013;2013.
73. Tziatzios G, Polymeros D, Spathis A, Triantafyllou M, Gkolfakis P, Karakitsos P, et al. Increased levels of circulating platelet derived microparticles in Crohn’s disease patients. *Scand J Gastroenterol.* 2016 Oct 2;51(10):1184–92.
74. Kyselova A, Elgheznawy A, Wittig I, Heidler J, Mann AW, Ruf W, et al. Platelet-derived calpain cleaves the endothelial protease-activated receptor 1 to induce vascular inflammation in diabetes. *Basic Res Cardiol.* 2020 Dec 1;115(6).
75. Ngcobo SR, Nkambule BB, Nyambuya TM, Mokgalaboni K, Ntsethe A, Mxinwa V, et al. Activated monocytes as a therapeutic target to attenuate vascular inflammation and lower cardiovascular disease-risk in patients with type 2 diabetes: A systematic review of preclinical and clinical studies. Vol. 146, *Biomedicine and Pharmacotherapy.* Elsevier Masson s.r.l.; 2022.

76. Tan Z, Yuan Y, Chen S, Chen YI, Tong-Xin Chen #, Chen TX. Plasma Endothelial Microparticles, TNF- α and IL-6 in Kawasaki Disease. *Indian Pediatr.* 2013;501.

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: Papel das micropartículas e interleucinas circulantes na Periodontite associada ao Diabetes

Pesquisador: BARBARA ADELUNGUE CASSIANO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 70568323.6.0000.0081

Instituição Proponente: OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.230.992

Apresentação do Projeto:

- Proposta da pesquisa é avaliar o efeito do tratamento Periodontal não cirúrgico em relação a micropartículas e interleucinas circulantes na presença ou não de Diabetes. Este projeto visa um maior entendimento da relação de micropartículas circulantes na Periodontite, bem como possíveis modificações nesses biomarcadores induzidas pelo tratamento periodontal. A identificação, quantificação das 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 Periodontite associada ou não ao Diabetes. O maior entendimento do papel diferenciado das micropartículas na Periodontite 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 a micropartículas e interleucinas circulantes na presença ou não de Diabetes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Presença de desconforto nas coletas de sangue e durante o tratamento periodontal não cirúrgico.

Endereço: Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

Continuação do Parecer: 6.230.992

Benefícios:

O tratamento periodontal pode promover menor apoptose dos diferentes tipos celulares e, consequentemente, redução nos níveis de micropartículas e interleucinas circulantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Pesquisa com banco de dados retrospectiva. Após ser colhido o sangue periférico dos pacientes em tubos de sangue contendo citrato, as amostras serão centrifugadas a 160 g, 22C por 10 minutos para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP será então centrifugado a 1500 g, 22C por 6 minutos, para a obtenção do

plasma pobre em plaquetas (PPP). A seguir, o PPP (70 uL) será incubado por 20 minutos, temperatura ambiente com o anti-CD105 conjugado com

APC, anti-CD42 conjugado com FITC combinado com o anti-CD31 conjugado com PE e anti-CD14, para identificar micropartículas endoteliais,

plaquetárias e monocíticas, respectivamente. Como controles serão utilizados os isotipos IgG1 FITC, IgG1 PE, IgG1 APC. Após incubação serão

adicionados 300 uL de PBS e imediatamente será feita a leitura em citômetro de fluxo (FACSCalibur - BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), sendo adquiridos aproximadamente 30.000 eventos. Para avaliar níveis das citocinas será usado o Ensaio

de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Metodologia de Análise de Dados:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: adequada;
- Metodologia: adequada;
- Carta de anuência: assinada pela responsável pelo banco de dados;
- Termo de Compromisso: adequado e assinado;
- Parecer anterior: retirado;
- Orçamento: próprio;
- Cronograma: ok.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Endereço: Rua Profª Enéas de Giqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuas CEP: 02.450-000

UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 6.230.992

- Aprovado.

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_2144372.pdf	27/06/2023 11:18:22		Aceito
Outros	Compromisso.jpeg	27/06/2023 11:18:03	BARBARA ADELUNGUE CASSIANO	Aceito
Declaração de concordância	Anuencia.pdf	25/06/2023 12:12:58	BARBARA ADELUNGUE CASSIANO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BarbaraCEP.docx	14/06/2023 12:06:07	BARBARA ADELUNGUE CASSIANO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBARBARA.doc	14/06/2023 12:05:23	BARBARA ADELUNGUE CASSIANO	Aceito
Folha de Rosto	FRBarabara.pdf	14/06/2023 12:03:39	BARBARA ADELUNGUE CASSIANO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 10 de Agosto 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