



UNIVERSIDADE SANTO AMARO – UNISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Danielle Borges Germano

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS DE MONÓCITOS
NA DOENÇA PERIODONTAL ASSOCIADA AO DIABETES**

São Paulo

2022

Danielle Borges Germano

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS DE MONÓCITOS
NA DOENÇA PERIODONTAL ASSOCIADA AO DIABETES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial 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

2022

G323e Germano, Danielle Borges.

Expressão de receptores de quimiocinas de monócitos na doença periodontal associada ao diabetes / Danielle Borges Germano. — São Paulo, 2022.

50 p.: il., P&B.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) — Universidade Santo Amaro, 2022.

Orientadora: Prof.^a Me Dr.^a Carolina Nunes França.

1. Doença periodontal. 2. Receptores de Quimiocinas. 3. Diabetes.
I. França, Carolina Nunes, orient. II. Universidade Santo Amaro. III.
Título.

Danielle Borges Germano

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS DE MONÓCITOS
NA DOENÇA PERIODONTAL ASSOCIADA AO DIABETES**

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

Cidade de São Paulo, 16 de setembro de 2022.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marina Tiemi Shio

Profa. Dra. Ana Carolina Soares de Oliveira

Profa. Dra. Carolina Nunes França

Conceito Final: _____

Ao meu querido filho Theo, por ser a maior felicidade da minha vida. Meu amor por você é de suma importância para eu seguir conquistando mais todos os dias.

Aos meus pais, Kelly e Ricardo, que sempre me apoiaram e incentivaram a minha caminhada em busca de conhecimento, e que me ensinaram a ser quem sou e estarão presentes em meu coração e a cada passo que eu der para sempre.

Aos meus irmãos Marcella e Ricardo, que são o resumo de amor em minha vida, e a alegria que me proporcionam é a maior responsável por tornar meus dias melhores.

Aos meus tios Kátia e Carlos pelo apoio e amor incondicional em cada momento.

Aos meus avós, primos e tios pelo suporte e alegrias que me dispõem sempre.

Às minhas amigas, que me apoiam e incentivam todas as conquistas almejadas e tornaram minha caminhada mais alegre e divertida.

À minha mãe Iansã por me guardar, me proteger e me guiar em minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Santo Amaro (UNISA), responsável pela minha formação acadêmica, ética e profissional. Agradeço toda a experiência e aprendizado desses últimos 2 anos.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Carolina Nunes França, pela honra de proporcionar o privilégio de me orientar, instruir e ensinar sempre com muito carinho e atenção, possibilitando experiências e aprendizados imensuráveis e imprescindíveis à minha formação.

À Dra. Marina Tiemi Shio, responsável pelo Unisa Research Center, pela sua orientação e ajuda durante os processos de análises, de suma importância para a concretização desse estudo.

Aos meus parceiros de pesquisa, pelo comprometimento, convivência e aprendizado. Sem vocês a realização desta pesquisa não seria possível.

Às periodontistas Dra. Debora Pallos e Dra. Yeon Jung Kim, por conduzir a avaliação, diagnóstico e tratamento periodontal, auxiliando na execução deste estudo. Suas contribuições foram essenciais.

Aos funcionários da Clínica de Odontologia da Universidade Santo Amaro pela paciência e colaboração no atendimento dos pacientes e coleta das amostras para a realização do estudo.

Aos pacientes, por aceitarem e contribuírem para a concretização desta pesquisa.

“Os grandes feitos são conseguidos não pela força, mas pela perseverança.”

Samuel, Johnson

RESUMO

Introdução: O surgimento da Doença Periodontal (DP) está relacionado com a presença de um biofilme disbiótico na cavidade oral composto por patógenos anaeróbios que produzem e liberam substâncias, originando a matriz de polissacarídeos que circundam essas comunidades bacterianas. Doença de aspecto multifatorial, caracterizada como infecciosa inflamatória crônica, compromete e lesiona progressivamente os tecidos de inserção e sustentação dos dentes. A inflamação gengival antecede a DP, onde o estado inflamatório modifica a composição das bactérias que normalmente são gram positivas, características da cavidade oral, em bacilos gram negativos e anaeróbios. A associação do Diabetes à doença periodontal se estabelece de maneira bidirecional, onde pacientes diabéticos parecem exibir maior tendência em desenvolver DP, assim como indivíduos com DP, além de apresentar maior risco de Diabetes, também se encontram predisponentes a terem complicações mais exacerbadas no controle dos índices glicêmicos. Alguns receptores possuem propriedade quimiotática de células mononucleares do sangue periférico e são caracterizados como marcadores inflamatórios. Receptores relacionados ao risco de DCV que atuam recrutando monócitos para locais de trauma, lesão, inflamação e isquemia compreendem CCR2, CCR5 e CX3CR1, dentre outros. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento Periodontal não cirúrgico em relação à expressão dos receptores de quimiocinas de monócitos CCR2, CCR5 e CX3CR1, na presença ou não de Diabetes. **Métodos:** Trata-se de um ensaio clínico e abrangeu pacientes em acompanhamento na Clínica de Odontologia da Universidade Santo Amaro diagnosticados com Doença Periodontal moderado e avançado, associada ou não ao Diabetes. As amostras de sangue periférico foram submetidas à avaliação da expressão dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1 por PCR em tempo real. **Resultados:** Não houve diferenças na expressão dos receptores CCR2, CCR3 e CX3CR1 quando comparadas as visitas inicial e um mês após o término do tratamento periodontal não cirúrgico ($p = 0,600$, $p = 0,600$ e $p = 0,612$, respectivamente. Teste de Wilcoxon). Entretanto, analisando os grupos com e sem Diabetes, houve diferenças entre as visitas basais para os receptores CCR2 e CCR5, sem diferenças para CX3CR1 ($p = 0,002$, $p = 0,018$ e $p = 0,972$, respectivamente. Teste de Mann-Whitney); tais diferenças deixaram de existir após o tratamento ($p = 0,368$, $p = 0,960$ e $p = 0,896$, respectivamente, Teste de Mann-Whitney). **Conclusão:** Propõe-se que a atuação do perfil inflamatório sistêmico de forma exacerbada presente nos pacientes com Diabetes + DP mediado, entre outros, pela expressão elevada de CCR2 e CCR5 em relação aos pacientes que possuem apenas DP, é passível de uma modulação favorável na expressão destes após 30 dias do final do tratamento periodontal não cirúrgico.

Palavras-chave: Doença Periodontal, Diabetes, Doenças Cardiovasculares, Receptores de quimiocinas, CCR2, CCR5 e CX3CR1.

ABSTRACT

Introduction: The ADVENT of Periodontal Disease (PD) is related to a dysbiotic biofilm in the oral cavity, which has anaerobic pathogens that produce and secrete substances, which makes the matrix of polysaccharides that surround these bacterial communities. It's a multifactorial disease characterized as a chronic inflammatory infectious disease, which progressively compromising and injury the tissues of tooth insertion and support. Gingival inflammation precedes PD, where the inflammatory state changes the composition of bacterias from gram positive to gram negative and anaerobic bacillus. The association of Diabetes and periodontal disease is established in a bidirectional way, where diabetic patients may have a tendency to develop PD, as well individuals with PD has a higher risk of Diabetes and, also are predisposed to have more complications in the control of their glycemic indices. Some inflammatory markers as the receptors have chemotactic properties of peripheral blood mononuclear cells. Receptors related to CVD risk that act by recruiting monocytes to a local of trauma, injury, inflammation and ischemia are CCR2, CCR5 and CX3CR1, among others.

Objective: To evaluate the effect of non-surgical periodontal treatment in relation to the expression of monocyte chemokine receptors CCR2, CCR5 and CX3CR1, in the presence or absence of diabetes. **Methods:** The current clinical trial included patients diagnosed with moderate and advanced periodontitis, associated or not with diabetes. Peripheral blood samples were submitted to evaluation of the expression of CCR2, CCR5, and CX3CR1 receptors by real-time PCR. **Results:** There were no differences in the expression of CCR2, CCR5 and CX3CR1 receptors when comparing the initial visit and one month after the end of non-surgical periodontal treatment ($p = 0.600$, $p = 0.600$, and $p = 0.612$, respectively. Wilcoxon test). However, analyzing the groups with and without diabetes, there were differences between the baseline visit for CCR2 and CCR5 receptors, with no difference for CX3CR1 ($p = 0.002$, $p = 0.018$, and $p = 0.972$, respectively. Mann-Whitney test). These differences were no longer observed after treatment ($p = 0.368$, $p = 0.960$, and $p = 0.896$, respectively, Mann-Whitney test). **Conclusion:** The expression of the systemic inflammatory profile present in an exacerbated form in patients with Diabetes associated to Periodontitis mediated, among others, by the elevated expression of CCR2 and CCR5, is likely to be modulated favorably one month after the end of periodontal treatment.

Keywords: Periodontal Disease, Diabetes, Cardiovascular Diseases, Chemokine Receptors, CCR2, CCR5 and CX3CR1.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados demográficos dos participantes do estudo.....31

Tabela 2. Profundidade a sondagem e perda de inserção (mm).....31

Tabela 3. Perfil lipídico e glicose dos participantes do estudo, na visita basal.....32

Tabela 4. Comparação de T0 (Basal) e T1 (Final) da expressão dos receptores de quimiocinas de monócitos CCR2, CCR5 e CX3CR1 dos pacientes com DP no grupo dos Diabéticos e Não Diabéticos.....34

Lista de figuras

- Figura 1.** Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CCR2 dos pacientes com DP em T0 (Basal) e T1 (Final).....33
- Figura 2.** Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CCR5 dos pacientes com DP em T0 (Basal) e T1 (Final).....33
- Figura 3.** Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CX3CR1 dos pacientes com DP em T0 (Basal) e T1 (Final).....34
- Figura 4.** Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CCR2 dos pacientes com DP nos grupos Diabéticos e Não Diabéticos em T0 (Basal) e T1 (Final).....35
- Figura 5.** Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CCR5 dos pacientes com DP nos grupos Diabéticos e Não Diabéticos em T0 (Basal) e T1 (Final).....36
- Figura 6.** Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CX3CR1 dos pacientes com DP nos grupos Diabéticos e Não Diabéticos em T0 (Basal) e T1 (Final).....36

Lista de abreviatura

ADA	DP
AVC	EDTA
ApoE	GAGS
BMSCs	GAPDH
CCL2	HbA1c
CCL5	HP
CCL7	IAM
CCR2	IDF
CCR5	JEC
cDNA	LDL
CEP	<i>American Diabetes Association</i>
CX3CL1	Acidente Vascular Cerebral
CX3CR1	Apolipoproteína E
DAC	<i>Bone marrow stem cells</i>
DCV	C-C quimiocina ligante 2
DEPC	C-C quimiocina ligante 5

C-C quimioci na ligante 7	Doença Periodontal <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
C-C receptor quimioci na tipo 2	Glicosaminoglicanos Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
C-C receptor quimioci na tipo 5	Hemoglobina Glicada Hiperglicemia + Infecção periodontal
<i>Comple mentary DNA</i>	Infarto Agudo do Miocárdio <i>International Diabetes Federation</i>
Comitê de Ética e Pesquisa	Junção esmalte-cimento Lipoproteína de baixa densidade
CX3C quimioci na ligante 1	LDL-c Ly6C MG
CX3C receptor quimioci na 1	mRNA N NCI
Doença Arterial Coronari ana	PBMC PBS PCR
Doenças Cardiova sculares	PG PIC PS
<i>Diethylpy rocarbon ate water</i>	RNA RT-PCR TAC UNISA

Polymerase Chain Reaction
Porphyromonas gingivalis
Perda de inserção clínica
Profundidade de sondagem
Ribonucleic acid
Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Constricção aórtica transversa
Universidade Santo Amaro

Colesterol da lipoproteína de
baixa densidade

Lymphocyte antigen-6

Margem gengival

RNA mensageiro

Controle Normal

Nível Clínico de Inserção

Peripheral Blood
Mononuclear Cell

Phosphate buffered saline

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Doença Periodontal: aspectos gerais	13
1.2 Diabetes <i>Mellitus</i> e Doença Periodontal	14
1.3 Doenças Cardiovasculares e Doença Periodontal	16
1.4 Receptores de Quimiocinas	17
1.5 Receptor de quimiocinas CCR2 na Doença Periodontal e Doenças Cardiovasculares	18
1.6 Receptor de quimiocinas CCR5 na Doença Periodontal e Doenças Cardiovasculares	21

1.7 Receptor de quimiocinas CX3CR1 na Doença Periodontal e Doenças Cardiovasculares	22
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MÉTODOS.....	26
4.1 Desenho do Estudo	26
4.2 Avaliação Clínica Periodontal e Tratamento Periodontal	26
4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico	27
4.4 Extração e isolamento do RNA	28
4.5 Transcrição Reversa	29
4.6 PCR em tempo real	29
4.7 Aspectos Éticos	30
5. RESULTADOS.....	31
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Periodontal: aspectos gerais

O surgimento da Doença Periodontal (DP) está relacionado com a presença de um biofilme disbiótico na cavidade oral composto por patógenos anaeróbios que produzem e liberam substâncias, originando a matriz de polissacarídeos que circundam essas comunidades bacterianas.¹ Trata-se de uma doença de aspecto multifatorial, caracterizada como infecciosa inflamatória crônica que compromete e lesiona progressivamente os tecidos de inserção e sustentação dos dentes, ocasionando a destruição do tecido conjuntivo e osso alveolar, que quando não tratada possibilita a evolução até a perda dentária.¹⁻³

Conforme dados disponíveis até 2010, a forma mais grave de DP corresponde à sexta posição entre as doenças crônicas mais prevalentes na população em geral, apresenta dados que traduzem seu impacto, onde cerca de 750 milhões de pessoas são acometidas por essa doença em todo o mundo, acarretando consequências negativas dentre inúmeros aspectos, na capacidade de mastigação, estado nutricional e qualidade de vida.⁴

A escassez de estudos que forneçam informações epidemiológicas adequadas sobre as infecções periodontais, sobretudo em território brasileiro, dificulta a avaliação da difusão da doença, a fim de mensurar fatores potencialmente determinantes no risco do desenvolvimento e agravamento da doença, identificando assim um obstáculo na elucidação do papel e contribuição dos indicadores de risco associados à doença.⁵ Com base nos dados disponíveis mais recentes pode-se estimar que 14% da população adulta global possua DP grave, representando mais de 1 bilhão de casos em todo o mundo.^{6,7} Ainda, determina-se que a prevalência média de formas graves de DP, avaliadas para as Américas do Norte e do Sul de modo geral, evidenciam que para adultos com idades entre 35 e 44 anos a prevalência das formas menos graves da doença é de 20% e 40%.⁸

O tecido responsável por revestir e fornecer sustentação aos dentes denomina-se periodonto, sendo constituído pelas estruturas que compreendem o osso alveolar,

ligamento periodontal e o cemento, unidade funcional que insere ao tecido ósseo os dentes. Na cavidade oral, encontra-se presente constitutivamente a placa dentária, onde o dente é submetido a um ambiente que apresenta uma microflora que integra os biofilmes bacterianos.⁹

A inflamação gengival antecede a DP, onde o estado inflamatório iniciado em função da má higiene oral modifica a composição das bactérias que normalmente são gram positivas, características da cavidade oral, em bacilos gram negativos e anaeróbios.¹⁰ O desenvolvimento da DP exibe um dinamismo pela influência de diversos fatores, em âmbito individual e coletivo, assim como o resultado da interação de ambos.¹¹ Condições como particularidades do indivíduo, características comportamentais, como higiene oral, tabagismo, etilismo, e sociodemográficas, como idade, sexo e renda, comorbidades sistêmicas, genética, anatomia dental, composição microbiológica do biofilme dental, entre outros fatores, mostram-se determinantes na progressão da doença.^{2,5,12}

As reações inflamatórias e imunológicas associadas a fatores sistêmicos existentes podem afetar terminantemente a saúde periodontal de um indivíduo. A atuação de distúrbios metabólicos sistêmicos no organismo, de modo a afetar a saúde do periodonto, tem mostrado uma relação dessa influência com o declínio na saúde gengival, sendo prejudicial aos tecidos periodontais duros e moles dos pacientes, onde o estado inflamatório crônico presente nesses indivíduos, que deriva da resposta imunológica ativada pelo processo patológico bacteriano, mostra-se determinante na progressão da DP em concomitância com o Diabetes, tal inflamação se manifesta de modo semelhante ao que ocorre nas Doenças Cardiovasculares (DCV).^{13,14}

1.2 Diabetes *Mellitus* e Doença Periodontal

Dentre as doenças que resultam em distúrbios metabólicos está o Diabetes, determinado por altos níveis de glicose na circulação sanguínea evidenciando um estado de hiperglicemia crônica. A deficiência ou ausência completa de secreção de insulina, ou presença de resistência a esse hormônio somada também a uma redução

em sua secreção, que caracterizam Diabetes *Mellitus* tipo 1 e 2, respectivamente, apresentam etiologia múltipla e ocasionam disfunções no processo de metabolização de carboidratos, lipídeos e proteínas.¹⁵

Traduzindo os altos níveis de glicose em circulação no sangue, para o diagnóstico de Diabetes são definidos valores de hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$, conforme diretrizes da *American Diabetes Association* (ADA). Em 2021, segundo a 10^o edição do “*Diabetes Atlas*” da Federação Internacional de Diabetes (IDF), foi contatado 537 milhões de pessoas com Diabetes ao redor do mundo.¹⁶

A associação do Diabetes à doença periodontal se estabelece de maneira bidirecional, onde pacientes diabéticos parecem exibir maior tendência em desenvolver DP, assim como indivíduos com DP, além de apresentar maior risco de Diabetes, também se encontram predisponentes a terem complicações mais exacerbadas no controle dos índices glicêmicos. A presença de ambas as doenças denota maior probabilidade de serem acometidos por complicações médicas graves que incluem os sistemas cardiovascular, renal, imunológico, entre outros.^{17,18}

Entre os mecanismos patogênicos oriundos da associação entre DP e Diabetes têm-se alterações microvasculares, no fluido crevicular, na estrutura e função do colágeno, que comprometem a capacidade de reconstrução do tecido destruído, alterações na flora subgengival, predisposição genética, glicação enzimática e resposta imune alterada do hospedeiro, onde o comprometimento do combate ao agente bacteriano pelo distúrbio do sistema imunológico que incita um processo inflamatório exacerbado, prejudicando sua atuação eficaz na eliminação das bactérias patogênicas, causa desordem na quimiotaxia e adesão, assim como hiper-reatividade de monócitos e apoptose prematura de polimorfonucleares, intensificando a ativação pró-inflamatória que ocasiona, como consequência, a deterioração do tecido periodontal.¹⁷

Embora ambos os tipos de Diabetes estejam vinculados ao declínio na saúde do tecido da cavidade oral, o tipo 2 exibe uma relação mais comum e recorrente com a DP, que pode ser justificado por ser uma doença mais frequente em adultos de meia idade.¹⁵

1.3 Doenças Cardiovasculares e Doença Periodontal

Do mesmo modo que ocorre com o Diabetes, ao longo das últimas décadas, cada vez mais associa-se a DP ao aparecimento de distúrbios sistêmicos, entre eles têm-se as DCV.¹⁴ O processo de disseminação bacteriana e infecção sistêmica, que provocam uma resposta imune nociva de forma massiva, afetam negativamente a integridade do sistema cardiovascular, onde estudos comprovaram a presença de patógenos periodontais em diferentes tecidos e órgãos desse sistema, como tecido cardíaco humano, fluidos pericárdicos e lesões ateroscleróticas.¹⁹⁻²¹

Em 2019, as DCV ocupavam a primeira posição entre as causas de morte na população mundial, sendo responsável por mais de 18 milhões de óbitos.²² Com isso, devido ao seu grande impacto na saúde mundial e no setor econômico, cada vez mais estudos vêm sendo conduzidos sobre os fatores de risco associados ao surgimento das DCV.²³

As infecções orais que ocasionam a DP evidenciam-se como um fator de risco associado. Bahekar et al. em 2007, por meio da combinação de 5 estudos de coorte envolvendo 86.092 indivíduos, publicou uma meta-análise que mostrou um risco aumentando de 1,14 vezes de pacientes com DP no desenvolvimento de doença coronariana quando comparados aos controles.²⁴ Desse modo, os estudos sobre a DP e DCV tendem a esclarecer a relação entre essas doenças, tendo o intuito de mensurar o real impacto da infecção periodontal nas DCV.

Entre os mecanismos atrelados à progressão da DP, os níveis sistêmicos de citocinas inflamatórias são aumentados, pois a resposta inflamatória sistêmica é incitada em caráter aberrante, resultando em níveis cronicamente elevados de citocinas, assim como, da quimiocina de monócitos CCL2, fator que se encontra relacionado à fisiopatologia da doença vascular aterosclerótica. Dessa forma, o estado inflamatório sistêmico desordenado e altamente estimulado parece se estabelecer de modo similar em ambas as doenças.²⁵

1.4 Receptores de Quimiocinas

Dentre os inúmeros marcadores inflamatórios e imunológicos existentes no organismo humano encontram-se as quimiocinas, que se caracterizam por serem proteínas de baixo peso molecular, sendo capazes de induzir resposta imune adaptativa por exibirem propriedades pró-inflamatórias. Essa resposta imune desencadeada por quimiocinas incita o recrutamento de leucócitos ao local de lesão tecidual, inflamação ou infecção. Há também quimiocinas que se localizam constitutivamente nos tecidos regulando a migração leucocitária, sendo de natureza homeostática.²⁶

As quimiocinas são classificadas conforme a quantidade de aminoácidos e sua disposição em ambos os resíduos iniciais de cisteína da extremidade N-terminal, resultando em 4 subfamílias: CXCL, CCL, CX₃CL e CL. Representada pela letra “C” têm-se a cisteína, seguida pela designação quanto à quantidade de aminoácidos, sendo um ou três identificados como, X ou X₃, respectivamente, e por fim a letra L, que indica a proteína secretora como um ligante, adicionada ao número equivalente a seu gene correspondente. A classificação dos receptores correspondentes é estabelecida da mesma maneira, onde são ordenados nas subfamílias CCR, CXCR, XCR e CX₃CR, onde a letra “R” é acrescida determinando o receptor.²⁷

Os receptores de quimiocinas se localizam na membrana da célula alvo, fixados por meio de sete domínios transmembranares, podendo estar acoplados à proteína G. Aproximadamente, 350 aminoácidos são responsáveis por constituir esses receptores, onde sua região extracelular é composta pela região N-terminal e por 3 ansas extracelulares e corresponde ao sítio de ligação da quimiocina, e sua porção intracelular, a qual é atribuída a função de transdução do sinal, é constituída pela região C-terminal e 3 ansas intracelulares.²⁷

Cada grupo de leucócitos apresenta sua expressão dos receptores de quimiocinas de maneira distinta. Cada tipo celular detém a capacidade de dispor de uma multiplicidade de receptores, estando aptos a responder ao estímulo de mais de uma quimiocina. A expressão pela ativação dos receptores pode acontecer por duas

vias distintas, a ativação dependente da proteína G é a mais comum, entretanto os receptores conhecidos como atípicos tendem a estabelecer gradientes de quimiocina pelo mecanismo sequestro das quimiocinas independente da proteína G.²⁶

Em meio extracelular é onde se inicia a ativação dos receptores de quimiocinas acoplados à proteína G, e advém da interação destes com seus ligantes correspondentes. Posteriormente à ligação, o processo de internalização dos receptores possibilita a não responsividade momentânea da membrana celular. Como resultado, inúmeras vias de transdução de sinal são ativadas, desencadeando eventos intracelulares, que suscitam na transcrição de genes que incitam o rearranjo do citoesqueleto e na quimiotaxia dos leucócitos.²⁷

Embora seja possível a expressão de múltiplos receptores pelas células, onde cada receptor pode ser promíscuo, e os ligantes também podem interagir com distintos receptores, esses exibem em sua maioria, sinalização complexa e tendenciosa para diferentes ligantes, sendo estes capazes de serem agonistas de um receptor e antagonistas de outro. Além disso, alguns ligantes são atuantes mais assíduos em determinados receptores.²⁸

Há a necessidade da existência de receptores aos quais as quimiocinas se ligam para exercerem suas respectivas funções, por isso a junção das quimiocinas e seus receptores são de grande importância clínica devido ao seu papel na migração e residência de células imunes.^{26,28}

1.5 Receptor de quimiocinas CCR2 na Doença Periodontal e Doenças Cardiovasculares

A quimiocina CCL2 (C-C quimiocina ligante 2) ou MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) é um dos ligantes do receptor CCR2, e além de ser responsável pelo controle da transmigração de monócitos e outras atividades associadas à diapedese, incluindo o fluxo de Ca^{2+} e a expressão de integrinas, também

possui a característica de indutor fraco da expressão de citocinas em monócitos, que em elevadas concentrações geram espécies reativas de oxigênio.²⁶

Além do CCL2, outra quimiocina de monócitos é o CCL7 (C-C quimiocina ligante 7), ambas são quimiocinas inflamatórias produzidas e secretadas por células estromais e imunes. CCL2 tem a capacidade de estabelecer um gradiente estável para os monócitos inflamatórios CCR2+.²⁶ O receptor CCR2 tem sua expressão presente em monócitos/ macrófagos, linfócitos B, linfócitos T ativados, células dendríticas e basófilos.²⁷ O receptor CCR2 e seu ligante de quimiocina CCL2 desempenham papéis cruciais em doenças inflamatórias, uma vez que são regulados positivamente em processos inflamatórios e fibróticos.²⁹

Um estudo conduzido por Wang et al. em 2016 avaliou os níveis de expressão proteica de várias quimiocinas e a migração de células-tronco da medula óssea (BMSCs) e macrófagos em modelo murino induzidos para DP pela infecção por *Porphyromonas gingivalis* (PG) e altos níveis de glicose, com o intuito de esclarecer o mecanismo intermediário entre inflamação local e sistema imune inato na Doença Periodontal diabética.³⁰ Para estabelecer o mecanismo subjacente da perda óssea alveolar na DP, foram avaliados por western blot os níveis de expressão proteica de CCL2 em BMSCs e CCR2 nos macrófagos. Os níveis de expressão proteica de CCL2 nas BMSCs foram significativamente aumentados nos grupos com hiperglicemia mais infecção periodontal por PG (HP), que apresentou um aumento mais acentuado, e grupo infecção periodontal por *P. gingivalis* (PG), em comparação com o grupo controle normal (N) ($P < 0,05$). Do mesmo modo, os níveis de expressão proteica de CCR2 em macrófagos exibiram um aumento significativo nos grupos HP e PG, em comparação com o grupo N ($P < 0,05$), sendo mais significativo no grupo HP.³⁰

A resposta inflamatória do periodonto é induzida e mantida pela liberação de quimiocinas por diferentes células do hospedeiro enquanto expostas aos componentes das bactérias contidas no periodonto. A proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) foi avaliada por Nisha et. al. em 2018 como um biomarcador salivar confiável na gengivite e Doença Periodontal, onde a MCP-1, que atua como ligante do receptor CCR2, foi detectada em todas as amostras de saliva. A análise da curva ROC mostrou

100% de sensibilidade e especificidade para MCP-1 em discriminar Doença Periodontal, desta forma foi possível estabelecer que há um aumento substancial na concentração MCP-1 com o aumento da gravidade da doença periodontal.³¹

A ativação do CCR2 também é identificada em algumas doenças do sistema circulatório, como na aterosclerose em células como macrófagos e musculares lisas. Estudos realizados evidenciaram a redução na formação de placas ateroscleróticas em animais deficientes em ApoE (Apolipoproteína E) que possuíam deficiência no receptor CCR2, promovendo a diminuição na progressão da lesão.³²

Resultados obtidos em estudos recentes mostraram que o infiltrado de monócitos inflamatórios pode incumbir negativamente no processo de cicatrização durante o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), diminuindo a função cardíaca e agravando o tamanho do infarto.³³ No mesmo trabalho, foi observada melhora significativa na cicatrização após IAM em camundongos *knockout* para CCR2 quando comparados com camundongos do tipo selvagem, em função da falta de expressão de CCR2, que impossibilita a migração de monócitos para o infarto, resultando na atenuação da remodelação do Ventrículo Esquerdo após IAM.³³

A interação CCL2 – CCR2 também desempenha um papel crucial na lesão tecidual após isquemia vascular, quadro que pode ocorrer decorrente de complicações comumente presentes nos portadores da insuficiência venosa crônica. Um estudo avaliando a expressão de quimiocinas em modelos animais de IAM mostrou que há um aumento marcante na expressão de CCL2 no tecido lesionado, acompanhado de uma regulação positiva correspondente do respectivo receptor CCR2.²⁹

Desse modo, comprovou-se que a utilização de um mutante não agonista do CCL2 com maior afinidade por glicosaminoglicanos (GAGS) é capaz de competir com CCL2, pois as quimiocinas geralmente são imobilizadas perto de seu local de produção em função da ligação aos glicosaminoglicanos³⁴ como parte do mecanismo de orientação celular, tal dinâmica reduz o recrutamento de monócitos inflamatórios, limitando a hiperplasia neointimal e a lesão por isquemia.²⁹

A junção desses dados obtidos em estudos anteriores corrobora para a possível associação existente entre a atuação e expressão aumentadas do receptor de quimiocinas CCR2 no controle da quimiotaxia de monócitos durante os processos inflamatórios associados à DP.

1.6 Receptor de quimiocinas CCR5 na Doença Periodontal e Doenças Cardiovasculares

O CCL5 (C-C quimiocina ligante 5) corresponde à quimiocina ligante do CCR5, esse receptor tem sua expressão presente em células como monócitos / macrófagos, linfócitos, células do músculo liso e células endoteliais na aterosclerose. A ligação CCL5 – CCR5 induz a adesão e migração de monócitos e linfócitos T, que ocorre de modo dependente da integrina.³⁵

Esse receptor exibe um papel crucial na aterosclerose, especialmente no processo de diapedese de monócitos Ly6C^{low}³⁶, sendo que a inibição da sinalização do CCR5 levou a uma redução acentuada no número de monócitos circulantes, reduzindo o tamanho da lesão em estágios avançados da doença.³⁷

Apesar do papel do CCR5 na remodelação e disfunção cardíaca sob sobrecarga de pressão não ser bem estabelecida na literatura, um estudo de Wang et al. de 2021 mostrou que inibição de CCR5 protegeu contra anormalidades cardíacas induzidas por sobrecarga de pressão em modelo murino. Camundongos foram submetidos à constrição aórtica transversa (TAC) e após inibição do CCR5 miocárdico apresentaram diminuição da hipertrofia miocárdica, enquanto a superexpressão do CCR5 miocárdico agravou a hipertrofia miocárdica no coração TAC.³⁸

Em 2020, Joy et al. mostraram que um medicamento que antagoniza seletivamente a função do CCR5 é uma opção terapêutica em casos de acidente vascular cerebral (AVC), onde esse bloqueio farmacológico de curto prazo do CCR5 no primeiro mês após o AVC é eficaz na recuperação motora mesmo após o medicamento não se encontrar mais em circulação no organismo.³⁹

O receptor de quimiocina CCR5 foi descrito por Cavalla et. al. em 2017 em uma coorte com 669 brasileiros em que foi mostrada a mutação de perda de função no gene CCR5 causada pelo CCR5 Δ 32 (rs333), que modula a resposta do hospedeiro e implica diretamente o resultado da Doença Periodontal. Foi mostrado que os portadores deste alelo mutante exibiram uma proteção significativa contra Doença Periodontal crônica e agressiva.⁴⁰

Há poucos estudos que abordam o nível de expressão de CCR5 no contexto da DP. Ferreira et al. em 2011 mostraram que entre dois grupos de camundongos, do tipo selvagem e com bloqueio de CCR5, tanto a migração de células inflamatórias quanto a perda óssea alveolar ao longo da DP foram significativamente reduzidas no grupo *knockout* para CCR5.⁴¹

1.7 Receptor de quimiocinas CX3CR1 na Doença Periodontal e Doenças Cardiovasculares

CX3CR1 (*fractalkine*) é um receptor acoplado à proteína G que possui sete domínios transmembranares, como seu ligante apresenta-se a quimiocina CX3CL1 (CX3C quimiocina ligante 1), expressa nas formas solúvel e transmembrana, capaz de estabelecer ligação de alta afinidade com o receptor, ativando a sinalização intracelular, sendo capaz de combinar funções quimioatraentes juntamente com propriedades das moléculas de adesão por meio de um mecanismo não dependente de integrina, ou seja, a interação CX3CL1 - CX3CR1 é atualmente considerada uma via precoce que leva à adesão firme de monócitos ao endotélio estimulado.³⁵

Um estudo de Balci et al. realizado em 2021 mostrou níveis elevados da quimiocina CX3CL1 e seu receptor CX3CR1 no fluído crevicular gengival de pacientes com DP avançada em comparação com controles saudáveis, sugerindo que o eixo de ligação CX3CL1 – CX3CR1 pode ser potencialmente determinante na patogênese da DP e na resposta inflamatória local.⁴²

Em estudo realizado por Kanzler et al. 2012 foi encontrado que o bloqueio de CX3CR1 na aterosclerose culminou na redução da infiltração de macrófagos e no atraso no desenvolvimento de lesões na aorta, sugerindo que os níveis séricos do ligante de CX3CR1 parecem estar relacionados a quadros de doenças inflamatórias, representando um marcador útil de eficiência da reabilitação em pacientes cardiopatas.²⁹

Os efeitos mediados por CX3CL1 desempenham um papel significativo em doenças vasculares.³⁵ Um ensaio clínico recente evidenciou taxas mais elevadas de monócitos CX3CR1 positivos em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) em comparação com indivíduos com angiografia coronariana normal.⁴³

Além disso, estudos determinaram o potencial terapêutico do CX3CL1 em camundongos *knockout* duplos (ApoE^{-/-}, CX3CR1^{-/-}), onde foi possível mostrar uma diminuição significativa no tamanho da lesão em animais sem o mecanismo de sinalização CX3CL1-CX3CR1.⁴⁴ Em outro estudo com modelo animal com três nocautes (CX3CR1^{-/-}, CCR2^{-/-} e ApoE^{-/-}) foi mostrado que a exclusão de CX3CL1 em camundongos CCR2^{-/-} reduziu acentuadamente o acúmulo de macrófagos na parede arterial, relacionando prováveis estratégias terapêuticas inovadoras tendo como alvo múltiplas quimiocinas ou receptores de quimiocinas.³⁵

A via CX3CL1 / CX3CR1 é um alvo terapêutico relacionado à quimiocina muito promissora nas DCV, pois se sabe que as interações desse receptor com seu ligante conferem um sinal de sobrevivência essencial aos monócitos, uma vez que a ausência de CX3CL1 ou CX3CR1 resulta em uma redução significativa dos níveis de monócitos no sangue em condições inflamatórias e no estado estacionário.³⁵

2. JUSTIFICATIVA

Devido às consequências negativas ocasionadas à saúde do indivíduo, oriundas da presença da DP que dentre inúmeros aspectos, afeta a capacidade de mastigação, estado nutricional e qualidade de vida destes,⁴ atrelada à alta prevalência de Diabetes em meio à população mundial e brasileira¹⁶ e sua associação a diversos fatores relacionados ao surgimento e evolução da DP, encontra-se a necessidade de uma avaliação mais detalhada sobre os mecanismos atrelados ao desenvolvimento e progressão da DP, sua relação com o Diabetes e seu potencial como preditor de risco aumentado no desenvolvimento de DCV, visando uma melhor evolução e redução das taxas de possíveis complicações ao estabelecer uma adequada e eficaz estratégia de tratamento, possibilitando a prevenção de desfechos cardiovasculares, assim como melhor controle do Diabetes.

Em virtude de resultados das poucas pesquisas publicadas sobre a expressão dos receptores de quimiocinas de monócitos no contexto da doença periodontal, assim como sua associação ao diabetes, e seus achados referentes ao potencial presente na relação entre o mecanismo dos receptores de quimiocinas de monócitos e sua ação determinante no perfil inflamatório sistêmico, constatou-se a indispensabilidade da produção de novos dados que fazem parte deste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento Periodontal não cirúrgico em relação à expressão dos receptores de quimiocinas de monócitos CCR2, CCR5 e CX3CR1, na presença ou não de Diabetes.

3.2 Objetivos específicos

Analisar a expressão dos receptores de quimiocinas de monócitos CCR2, CCR5 e CX3CR1 por PCR em tempo real na visita inicial e após 30 dias do tratamento periodontal não cirúrgico.

Avaliar a relação entre a expressão de receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1 e a Doença Periodontal, na presença ou não de Diabetes.

4. MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um ensaio clínico e abrangeu pacientes em acompanhamento na Clínica de Odontologia da Universidade Santo Amaro – UNISA com idade entre 40 e 75 anos, de ambos os sexos, diagnosticados com Doença Periodontal nos níveis de classificação moderado e avançado, associada ou não ao Diabetes.

Foram obtidos dados demográficos dos 54 participantes incluídos, na visita inicial e amostras de sangue foram coletadas no basal e após 30 dias do término do tratamento periodontal não cirúrgico.

Como critérios de inclusão no estudo, ter DP de moderada a grave identificada por duas periodontistas e no mínimo 10 dentes na cavidade bucal. 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 Avaliação Clínica Periodontal e Tratamento Periodontal

A avaliação clínica 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.

A coleta de informações do nível clínico de inserção (NCI) foi adquirida 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: $NCI = PS + (JEC - MG)$. 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 Gengival⁴⁵ e higiene bucal pelo Índice de Placa.⁴⁶

O diagnóstico foi realizado após exame clínico periodontal conforme condições que pudessem evidenciar os níveis moderado e avançado, segundo a classificação da Academia Americana de Periodontia em 1999.⁴⁷ Avaliando-se a profundidade de sondagem e a perda de inserção clínica (PIC), o nível de DP crônica moderado obedeceu aos parâmetros com um ou mais sítios de $PS \geq 4$ e $PIC \geq 3$ em indivíduos que apresentaram quatro ou mais dentes. A DP crônica avançada foi diagnosticada nos indivíduos que apresentaram quatro ou mais dentes com um ou mais sítios que contenham $PIC \geq 5$. O tratamento periodontal não cirúrgico foi aplicado nos sítios diagnosticados com DP, com raspagem da superfície dental, com auxílio de instrução de higiene bucal.

4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

As amostras de sangue periférico foram obtidas em tubos com EDTA (aproximadamente 5 mL), evitando assim a coagulação, e foram primeiramente transferidas para tubos cônicos devidamente identificados. O sangue foi submetido à centrifugação por 800 g, 22°C por 5 minutos para retirada do conteúdo excedente de

plasma. Então, adicionou-se ao volume restante *Ficoll-Hypaque* (*Ficoll Paque Plus*, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) em proporção 1/1 obtendo-se a separação de células mononucleares do sangue periférico (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) por gradiente de concentração. Procedeu-se à retirada das PBMC, que foram transferidas para um novo tubo, lavadas em PBS (*phosphate buffered saline*) e, após o descarte do sobrenadante, adicionou-se durante 2 minutos, em temperatura ambiente, 3 mL de cloreto de amônio para lise de hemácias residuais. As células foram lavadas novamente com PBS e o sobrenadante foi descartado.

Utilizando 1 mL de PBS, o *pellet* foi ressuspensionado e o material foi transferido para microtubos, onde posteriormente à centrifugação foi descartado o sobrenadante, e o *pellet* armazenado em freezer -80°C.

4.4 Extração e isolamento do RNA

Por meio do procedimento de extração orgânica com Trizol realizou-se a extração e isolamento do RNA proveniente das PBMC. Adicionou-se 1000µL de Trizol ao *pellet* de PBMC, pipetando *up/down* até a dissolução total das células. Adicionou-se 200µL de clorofórmio às amostras, que foram levadas ao vórtex por 10 segundos, centrifugadas a 15000 RPM durante 15min a 4°C e o sobrenadante foi retirado e descartado (o equivalente a 500µL). O volume de 500µL de isopropanol gelado, com armazenamento em -20°C foi acrescentado às amostras, que foram levadas ao vórtex por 10 segundos e centrifugadas a 15000 RPM por 10 minutos e foi descartado o sobrenadante. Adicionou-se 1000µL de Etanol gelado, vórtex por 10 segundos, centrifugação a 15000 RPM pelo tempo de 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Por fim, para eluição e aquisição do RNA extraído os microtubos foram mantidos completamente secos, adicionou-se 40µL de H₂O ultra pura e armazenou-se a -80°C .

4.5 Transcrição Reversa

Por meio do aparelho *NanoDrop One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*) com 1µL da amostra de RNA obtida no procedimento de extração, foi quantificada a concentração de RNA presente em cada amostra individualmente. O DNA complementar (cDNA - *Complementary DNA*) foi obtido a partir de 300µg de RNA isolado para adquirir o volume final de 10 µL em água DEPC.

Adicionou-se 2 µL de uma preparação *MasterMix I* contendo 1µL de *Random Primers* 250ng e 1µL de *dNTP Mix* do kit *Invitrogen SuperScript II Reverse Transcriptase* (*Thermo Fisher Scientific*) em 10µL de cada amostra e incubadas em banho-maria durante 5 minutos, que ao final do tempo foram levadas rapidamente para o gelo com o intuito de interromper a reação.

Um total 7 µL de *MasterMix II* composto por 4µL de *5X First-Strand Buffer*, 2µL de 0.1 M *DTT* e 1µL de *RNaseOUT* foi incorporado em cada amostra e incubado em T°amb, por 2 minutos. Posteriormente, 0,5µL de *SuperScript II RT* e incubou-se em T°amb, por 10 minutos para reação do *Random Primers*. Ao final deste tempo, uma nova incubação foi feita a 42°C, por 50 minutos. A inativação da reação foi realizada por aquecimento a 70°C durante 15 minutos, então a amostra de cDNA foi armazenada em -20°C.

4.6 PCR em tempo real

Foram utilizadas duplicatas para os experimentos de PCR em tempo real, incluindo o controle interno (*GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*), usado a fim de normalizar a expressão dos genes alvo, para a amostra de cada paciente. Em placa de 96 poços *MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL* (*Applied Biosystems*) mensurando-se em duplicata para cada visita de todos os pacientes em todos os receptores, foram pipetados 19µL em cada poço contendo 1µL de 20x *TaqMan*

Gene Expression Assay (Applied Biosystems) do receptor analisado, 10µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)* e 8µL de *RNase Free Water* por meio de uma mistura *MasterMix*, posteriormente acrescidos de 1µL de cDNA correspondente em cada poço. De acordo com o receptor de interesse individualmente nos poços para cada paciente, alterou-se o *target 20x TaqMan Gene Expression Assay*, que pode ser correspondente ao GAPDH, CCR2, CCR5 ou CX3CR1.

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real foi feita utilizando *StepOnePlus System (Thermo Fisher Scientific)*, configurado para 40 ciclos com temperaturas e tempos de cada ciclo de 50° por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, respectivamente. Após o término dos ciclos, o gráfico de amplificação (*amplification plot*) com uma cor específica para cada *target* foi gerado, e os valores de detecção da expressão de cada receptor foram liberados.

4.7 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado segundo o parecer número 4.650.414, de 14 de abril de 2021 (Anexo A) 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 estudados 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	29	25
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

Tabela 2. Profundidade a 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 = após 30 dias do tratamento

A tabela 2 abrange dados referente à hemoglobina glicada dos pacientes nos grupos diabéticos e não diabéticos, onde em ambos os grupos a média + DP de T0/T1 não sofreu grandes alterações.

A seguir a tabela 3 apresenta dados referente ao perfil lipídico dos pacientes avaliados nas visitas basais e após 30 dias do término do tratamento periodontal não

cirúrgico, nos grupos com e sem diabetes, intra e entre grupos. As análises das visitas basais comparando o grupo de diabéticos com o de não diabéticos com relação à dosagem de triglicérides apresentou diferença estatística significativa (p 0,046), assim como os níveis de glicose (p 0,017). Ainda, para a avaliação entre os grupos após 30 dias, a dosagem de HDL-C também foi estatisticamente significativa (p 0,041).

Tabela 3. Perfil lipídico e glicose dos participantes do estudo, na visita basal

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

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

Em relação a expressão dos receptores de quimiocinas de monócitos à nível de mRNA, quando avaliados em um único grupo, independentemente da presença ou não de diabetes, as figuras de 1-3 mostram que não houve diferenças quando comparado antes e após tratamento (CCR2, p = 0,600; CCR5, p = 0,600; CX3CR1, p = 0,612. Teste de Wilcoxon).

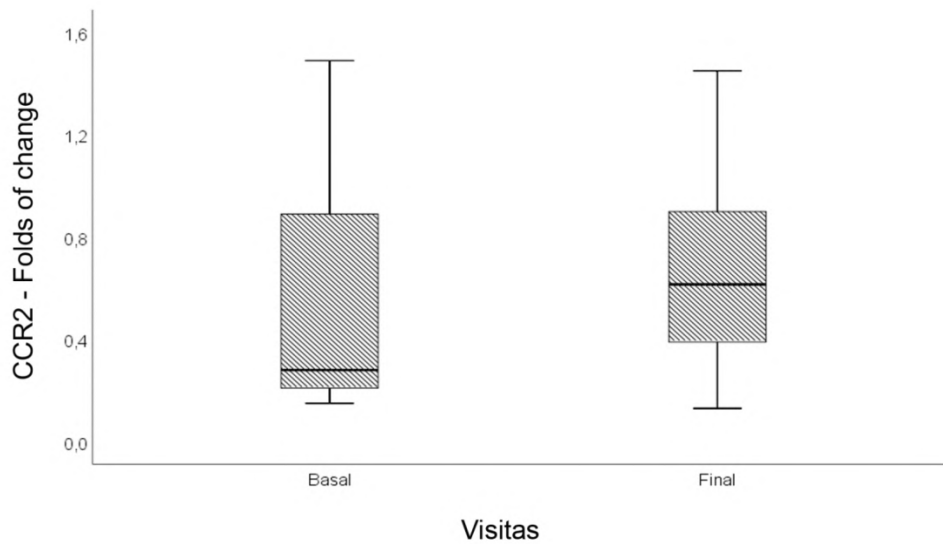


Figura 1. Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CCR2 dos pacientes com DP em T0 (Basal) e T1 (Final). Teste de Wilcoxon, $p = 0,600$.

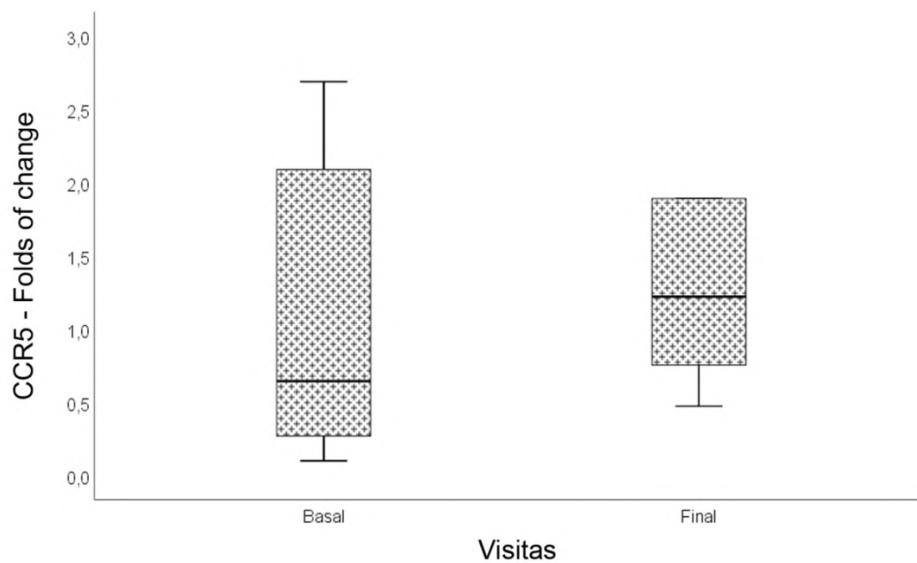


Figura 2. Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CCR5 dos pacientes com DP em T0 (Basal) e T1 (Final). Teste de Wilcoxon, $p = 0,600$.

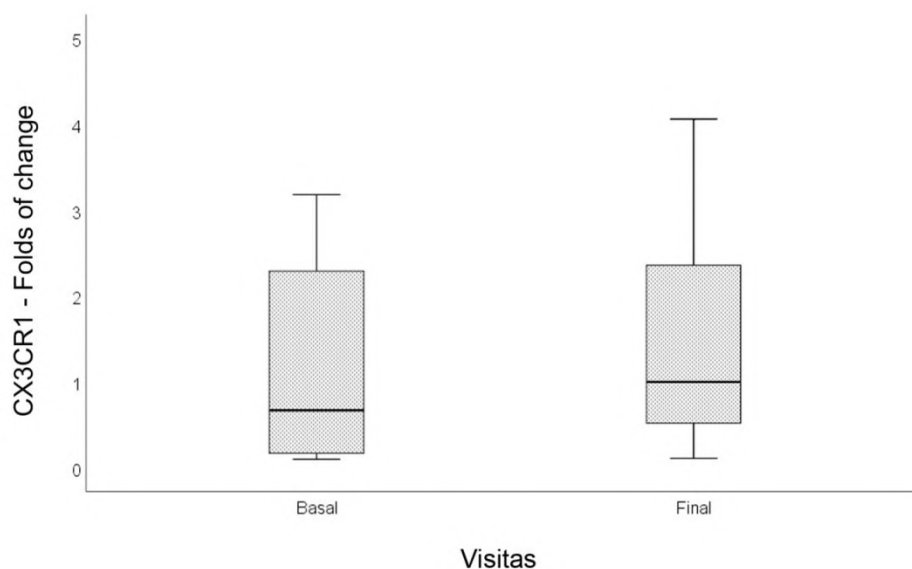


Figura 3. Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CX3CR1 dos pacientes com DP em T0 (Basal) e T1 (Final). Teste de Wilcoxon, $p = 0,612$.

Os níveis de expressão dos receptores de quimiocinas de monócitos para cada um dos receptores (CCR2, CCR5 e CX3CR1) quando analisados comparando T1 (Final) com T0 (Basal) entre os grupos de diabéticos e não diabéticos não exibiu diferenças significantes para os três receptores, como mostram as tabelas 4.

	CCR2 T1/T0	CCR5 T1/T0	CX3CR1 T1/T0
Diabéticos	0,285	0,593	0,465
Não Diabéticos	0,109	0,593	1,000

Tabela 4. Comparação de T0 (Basal) e T1 (Final) da expressão dos receptores de quimiocinas de monócitos CCR2, CCR5 e CX3CR1 dos pacientes com DP no grupo dos Diabéticos e Não Diabéticos. Teste de Wilcoxon (Basal x 30 dias após o término do tratamento; valores de p).

Já a comparação dos pacientes com DP entre grupos (Diabéticos vs Não diabéticos) da mesma visita (Diab T0 vs s/ Diab T0; e Diab T1 vs s/ Diab T1) evidenciou uma maior expressão de CCR2 e CCR5 no grupo dos Diabéticos em T0 em relação aos Não Diabéticos em T0 ($p = 0,0002$; $p = 0,0183$, respectivamente. Teste de Mann-Whitney). Tal diferença estatística significativa entre os grupos Diabéticos e Não Diabéticos não se encontra mais presente após o final do tratamento (T1- Final) para os receptores CCR2 e CCR5 ($p = 0,3676$; $p = 0,9593$, respectivamente. Teste de Mann-Whitney) desses pacientes com DP representadas nas figuras 4 e 5. Não houve diferenças na expressão do CX3CR1 quando comparados diabéticos e não diabéticos em T0 ou em T1 ($p = 0,9725$; $p = 0,8958$, respectivamente. Teste de Mann-Whitney) demonstrada na figura 6.



Figura 4. Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CCR2 dos pacientes com DP nos grupos Diabéticos e Não Diabéticos em T0 (Basal) e T1 (Final). Teste de Mann-Whitney, $p = 0,0002$; $p = 0,3676$, respectivamente.

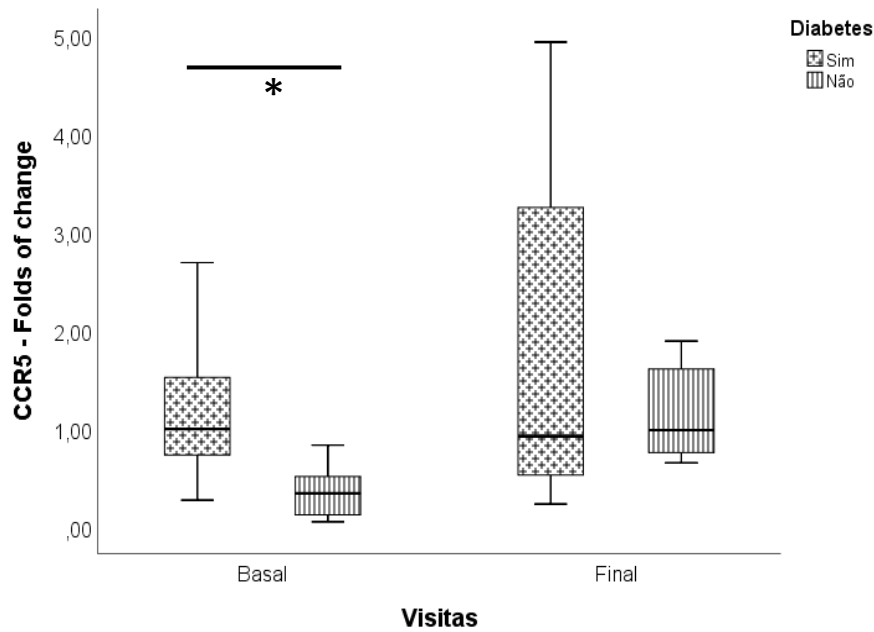


Figura 5. Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CCR5 dos pacientes com DP nos grupos Diabéticos e Não Diabéticos em T0 (Basal) e T1 (Final). Teste de Mann-Whitney, $p = 0,0183$; $p = 0,9593$, respectivamente.

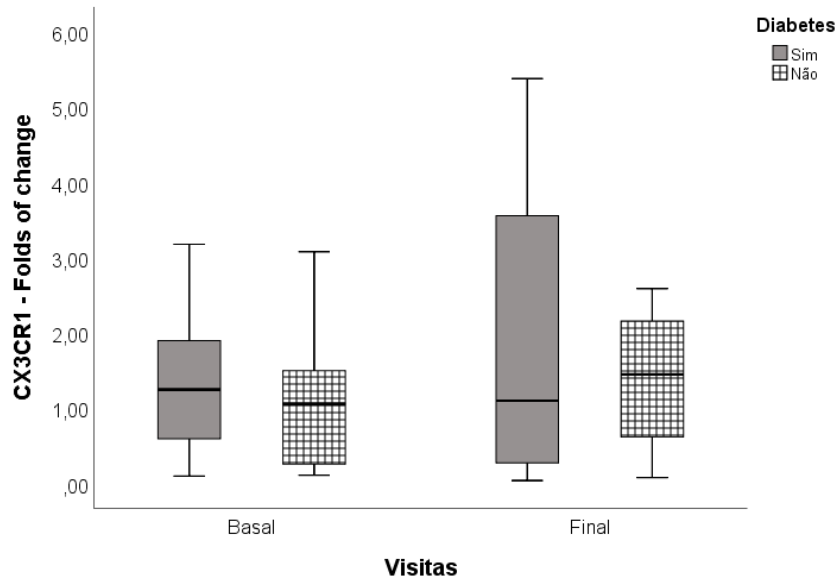


Figura 6. Expressão do receptor de quimiocina de monócitos CX3CR1 dos pacientes com DP nos grupos Diabéticos e Não Diabéticos em T0 (Basal) e T1 (Final). Teste de Mann-Whitney, $p = 0,9725$; $p = 0,8958$, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo, teve por objetivos avaliar a expressão dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1 antes e após tratamento periodontal não cirúrgico, em pacientes com e sem Diabetes. Segundo dados demográficos (Tab. 1), dos 54 pacientes diagnosticados com DP incluídos no estudo, 29 pertenciam ao grupo de Diabéticos, sendo 13 do sexo feminino e 16 do sexo masculino apresentando idade média de 57 anos e HbA1C média de 8,18. Já o grupo dos Não Diabéticos compreendiam 25 indivíduos, onde 13 eram mulheres e 12 eram os homens com idade média de 48 anos e média dos níveis de HbA1C de 5,40. Um estudo de Teixeira et. al. de 2019 envolvendo 420 participantes com diagnóstico de DP apresentou dados de idade média semelhante ao de nosso estudo (53,5 anos), corroborando a prerrogativa de que o público mais acometido pela DP compreenda indivíduos de meia idade.⁵

Os dados provenientes das dosagens de colesterol total, triglicérides, HDL-C, LDL-C e glicose (Tab. 3) foram avaliados nos grupos com e sem diabetes, sendo que os resultados intra grupos não apresentaram diferença estatística significativa em nenhum dos casos. Entretanto, para as análises entre grupos os índices de triglicérides, HDL-C e glicose demonstraram diferença estatística.

Considerando o efeito dos níveis séricos de lipídios na homeostase inflamatória, presume-se que a composição lipídica seja capaz de modificar também a resposta sistêmica individual pela infecção por patógenos periodontais.⁴⁸ Com relação ao nível de triglicérides dos grupos de diabéticos e não diabéticos, comparando as visitas basais de cada um deles, são estatisticamente significantes (p 0,046), evidenciando maiores níveis desse metabólito nos pacientes com diabetes. Ainda para os níveis de HDL-C, a comparação entre grupos após 30 dias do final do tratamento entre diabéticos e não diabéticos resultou em uma diferença estatística (p 0,041). Tal resultado indica a tendência de maiores dosagens de HDL-C, fator protetor para risco cardiovascular, em pacientes sem diabetes com tendência de melhora desses níveis após o tratamento periodontal. Um estudo de Haro et al. de 2012 mostrou que a associação entre a extensão da infecção periodontal e a proteína C-reativa (PCR)

ocorre entre os indivíduos que exibiam perfil lipídico desfavorável, de maneira dependente de níveis séricos de elevados LDL-C e reduzidos de HDL-C.⁴⁸

Quanto às dosagens de glicose viu-se que quando se compara as visitas basais entre os grupos de diabéticos e não diabéticos há uma diferença estatística significativa (p 0,017), onde pacientes com diabetes tendem a manifestar índices séricos mais elevados de glicose. Essa diferença estatística deixa de existir após 30 dias do término do tratamento periodontal.

Embora não tenham sido encontradas diferenças significantes quando se comparou o nível de expressão dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1 de T1 em relação a T0 antes e após o tratamento, independente da presença de Diabetes (Fig. 1, 2 e 3), quando analisados os grupos com e sem Diabetes, houve diferenças entre as visitas basais (T0) para os receptores CCR2 e CCR5 (Fig. 4 e 5); tais diferenças deixaram de existir após o tratamento. Com isso, propõe-se que a atuação do perfil inflamatório sistêmico de forma exacerbada presente nos pacientes com Diabetes + DP mediado, entre outros, pela expressão elevada de CCR2 e CCR5 em relação aos pacientes que possuem apenas DP, é passível de uma modulação favorável na regulação da expressão destes após 30 dias do final do tratamento periodontal, equiparando o nível do estado inflamatório sistêmico de pacientes que possuem duas doenças inflamatórias concomitantemente (Diabetes + DP) àqueles que possuem apenas uma (somente DP) mediado pelos receptores CCR2 e CCR5.

Em 2003 um estudo de Garlet et al. mostrou uma expressão de CCL2 (ligante de CCR2), do receptor CCR5 e seu ligante CCL5 mais prevalentes no grupo de pacientes com DP agressiva e crônica em relação aos indivíduos do grupo controle.⁴⁹ Do mesmo modo, Silva et al. em 2005 mostraram que a análise da expressão de mRNA revelou níveis aumentados de CCR2 e CCR5 em granulomas de lesões periapicais de pacientes em comparação com os controles, informações que se encontram em consonância com achados do presente estudo.⁵⁰

Em 2010, Venza et al. por meio da quantificação por PCR em tempo real em biópsias gengivais de 135 pacientes com e sem diabetes, mostrou que indivíduos com

DP apresentaram maiores índices de CCR2 e uma superexpressão de CCL2 independente da dosagem de HbA1c. Já a expressão de CCR5 se evidencia em casos de DP associado ao mau controle glicêmico, onde os níveis de mRNAs estavam elevados.⁵¹ Pode-se levar em consideração esses dados referentes ao CCR5 para justificar a diminuição da expressão do receptor nos pacientes com diabetes após 30 dias do final do tratamento periodontal, o que não foi possível apreciar no grupo sem diabetes (Fig. 5).

A importância do controle da expressão aumentada de CCR2 pode ser evidenciada segundo a sua forte relação em desfechos cardiovasculares, que se mostra como um fator de risco relevante, principalmente em pacientes também acometidos por DP e Diabetes. Em um estudo realizado por Verweij et al. em 2017, foi mostrada a relação entre a expressão de CCR2 pelos monócitos e a concentração de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) em uma população com risco de DCV.⁵² A LDL é capaz de estimular a superexpressão do ligante de monócitos CCL2, proporcionando assim uma ligação entre a regulação positiva para receptores CCR2 e a hipercolesterolemia, como apresentado por Chistiakov et al. em 2018.⁵³

Semelhante ao que ocorre com o CCR2, o CCR5 desempenha um papel em casos de formas mais graves de DP tanto em humanos quanto em camundongos^{49,50}, mas os mecanismos pelos quais o CCR5 supostamente possa determinar grau de progressão mais acentuado da doença permanecem desconhecidos. Ferreira et al. em 2011 mostrou uma redução na migração de células inflamatórias e perda óssea alveolar em modelo de DP experimental na ausência de CCR5, demonstrando o papel do CCR5 em um fenótipo fortemente atrelado a uma maior gravidade na progressão da DP.⁴¹

CCR5 acumula evidências ao longo dos últimos anos que ele e seus ligantes desempenham um papel crítico na regulação da resposta inflamatória. Segundo Kitade et al. (2012), o CCR5 é responsável por agravar a resposta inflamatória no tecido adiposo de camundongos, regulando o recrutamento de macrófagos e a troca de fenótipos M1/M2, causando resistência à insulina e obesidade.⁵⁴

Não houve diferença estatística significativa na expressão de CX3CR1 para nenhuma das análises realizadas no presente estudo, sugerindo que a atuação desse receptor não se mostra determinante no desenvolvimento e progressão da DP, visto que seus níveis não sofrem influência do tratamento na comparação entre visitas assim como entre grupos. Tais dados estão em consonância ao estudo de Garlet et. al. de 2003, onde a expressão de CXCR1 por meio de RT-PCR em nível de mRNA não apresentou significância estatística na comparação entre grupos de pacientes e controles.⁴⁹

Atentando-se ao ambiente local característico da DP, Hosokawa em 2005 através de biópsias de tecido gengival (incluindo epitélio juncional, epitélio crevicular gengival e tecido conjuntivo gengival) obtidas no decorrer do tratamento cirúrgico dos sítios com sangramento persistente à sondagem e sem melhora na condição clínica 3-4 semanas após a terapia periodontal básica com técnicas de higiene bucal, remoção de placa dentária e cálculo supragengival, mensurou a expressão de fractalcina e mRNA de CX3CR1 foi detectada pela reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR). A partir de um total de 7 amostras com DP, 5 biópsias expressaram mRNA da fractalcina, sendo que em 2 das amostras positivas a expressão apreciada foi fraca, que foram confrontadas com 3 amostras de tecido gengival saudável que não expressaram mRNA de fractalcina.⁵⁵ Com isso, supõe-se que atuação do CX3CR1 seja caracteristicamente local, e ainda, que apesar de sua expressão nas amostra gengivais de DP, não é possível afirmar a sua atuação como fator determinante na progressão da DP pela necessidade de avaliações com amostras de pacientes com um N maior, que possibilite a minimização de um provável viés.

Ainda, estudos sugerem que o receptor de quimiocinas CX3CR1 também parece sofrer influência de dietas ricas em gordura, em 2015, Flierl et al. relatou uma redução significativa dos níveis circulantes de fractalcina, na insuficiência cardíaca congestiva em pacientes tratados com uma lipoproteína conhecida por ter propriedades antiinflamatórias, o HDL reconstituído (rHDL).⁵⁶

A fractalcina, ligante do CX3CR1, sofre influência de lipídios plasmáticos e terapias modificadoras de lipídios, no plasma e em sua expressão em placas

ateroscleróticas. Também foi mostrado que terapias com estatinas diminuem níveis de expressão de CX3CR1 em monócitos circulantes em ApoE^{-/-} camundongos.⁵⁶ Outro estudo desenvolvido por Riopel et al. em 2019 comprova que modelos murinos LDLr knockout tratados com CX3CL1Fc mostraram lesões ateroscleróticas significativamente reduzidas em modelos de prevenção e mudança de dieta, diminuindo assim os níveis de ingestão de lipídeos, esclarecendo assim a relação entre a expressão de CX3CR1 em pacientes com hipercolesterolemia acentuada.⁵⁷

Corroborando com esses dados, Rowinska et al em 2017 comprovou que o gene e a proteína CX3CL1, ligante de CX3CR1, apresentaram expressão aumentada na aorta em roedores com alto teor de gordura quando comparada a um estado de alimentação normal em modelo murino.⁵⁸ A junção dessas informações descritas anteriormente na literatura, mostram a susceptibilidade do CX3CR1 e de um de seus ligantes das alterações de níveis de lipídeos, dessa forma, a ausência de diferença estatística significativa na expressão deste em pacientes com DP associada ou não ao diabetes pode estar atrelada ao fato de nenhum dos grupos apresentarem alterações apreciáveis do perfil lipídico em nenhum dos tempos para cada grupo ou comparando diabéticos e não diabéticos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a atuação do perfil inflamatório sistêmico de forma exacerbada presente nos pacientes com Diabetes + DP mediado, entre outros, pela expressão elevada de CCR2 e CCR5 em relação aos pacientes que possuem apenas DP, é passível de uma modulação favorável na expressão destes após 30 dias do final do tratamento periodontal não cirúrgico.

8. REFERÊNCIAS

1. 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;49:1-18. doi:10.1590/1807-2577.02520
2. 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;13(3):135-139. doi:10.4067/s2452-55882020000300135
3. Albuquerque BN, Araújo MM, Silva TA, Cota LOM, Cortelli SC, Costa FO. Periodontal condition and immunological aspects of individuals hospitalized in the intensive care unit. *Braz Dent J*. 2018;29(3):301-308. doi:10.1590/0103-6440201802034
4. Wu CZ, Yuan YH, Liu HH, et al. Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):1-15. doi:10.1186/s12903-020-01180-w
5. 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;48:1-11. doi:10.1590/1807-2577.09519
6. Institute of Health Metrics and Evaluation (IHME). Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019). Published 2020. Accessed May 22, 2022. <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>
7. World Health Organization. Oral health. Published March 15, 2022. Accessed May 24, 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
8. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach. *J Periodontol*. 2005;76(12):2187-2193. doi:10.1902/jop.2005.76.12.2187
9. van Dyke TE. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Mol Aspects Med*. 2017;58:21-36. doi:10.1016/j.mam.2017.04.006

10. Carrizales-Sepúlveda EF, Ordaz-Farías A, Vera-Pineda R, Flores-Ramírez R. Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. *Heart Lung Circ.* 2018;27(11):1327-1334. doi:10.1016/j.hlc.2018.05.102
11. Fonseca EP, Ferreira EF e., Abreu MHNG, Palmier AC, Vargas AMD. Relação entre condição gengival e fatores sociodemográficos de adolescentes residentes em uma região Brasileira. *Ciencia e Saude Coletiva.* 2015;20(11):3375-3384. doi:10.1590/1413-812320152011.00142015
12. Boillot A, Halabi B, da Batty G, Rangé H, Czernichow S, Bouchard P. Education as a predictor of chronic periodontitis: A systematic review with Meta-Analysis Population-Based studies. *PLoS One.* 2011;6(7). doi:10.1371/journal.pone.0021508
13. Mariotti A, Hefti AF. Defining periodontal health. *BMC Oral Health.* 2015;15(1):1-18. doi:10.1186/1472-6831-15-S1-S6
14. Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, et al. Periodontal disease: A risk factor for diabetes and cardiovascular disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1414-1428. doi:10.3390/ijms20061414
15. Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis and diabetes. *Br Dent J.* 2019;227(7):577-584. doi:10.1038/s41415-019-0794-5
16. *IDF Diabetes Atlas 10th Edition.* www.diabetesatlas.org
17. Khumaedi AI, Purnamasari D, Wijaya IP, Soeroso Y. The relationship of diabetes, periodontitis and cardiovascular disease. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews.* 2019;13(2):1675-1678. doi:10.1016/j.dsx.2019.03.023
18. Baeza M, Morales A, Cisterna C, et al. Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Oral Science.* 2020;28:1-13. doi:10.1590/1678-7757-2019-0248
19. Ziebolz D, Jahn C, Pegel J, 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. doi:10.1016/j.ijcard.2017.09.001
20. Louhelainen AM, Aho J, Tuomisto S, et al. Oral bacterial DNA findings in pericardial fluid. *J Oral Microbiol.* 2014;6(1):25835. doi:10.3402/jom.v6.25835
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;8(3):687-693. doi:10.1016/j.micinf.2005.09.004

22. Our World in Data, Hannah Ritchie and Max Roser. Causes of death. Published December 2019. Accessed July 24, 2022. <https://ourworldindata.org/causes-of-death#what-do-people-die-from>
23. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J.* 2019;42(1):27-35. doi:10.1016/j.bj.2018.12.001
24. Bahekar AA, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: A meta-analysis. *Am Heart J.* 2007;154(5):830-837. doi:10.1016/j.ahj.2007.06.037
25. Zardawi F, Gul S, Abdulkareem A, Sha A, Yates J. Association Between Periodontal Disease and Atherosclerotic Cardiovascular Diseases: Revisited. *Front Cardiovasc Med.* 2021;7:625579. doi:10.3389/fcvm.2020.625579
26. Palomino DC arolina T, Marti LC avalheiro. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo).* 2015;13(3):469-473. doi:10.1590/S1679-45082015RB3438
27. Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. As Quimiocinas e os seus Receptores: Características e Funções Fisiológicas . *Acta Med Port.* 2011;24:967-976. Accessed November 21, 2022. ACTA MÉDICA PORTUGUESA
28. Solari R, Pease JE, Begg M. Chemokine receptors as therapeutic targets: Why aren't there more drugs? *Eur J Pharmacol.* 2015;746:363-367. doi:10.1016/j.ejphar.2014.06.060
29. Kanzler I, Liehn EA, Koenen RR, Weber C. *Anti-Inflammatory Therapeutic Approaches to Reduce Acute Atheroscle-Rotic Complications.* Vol 13.; 2012. doi:10.2174/138920112798868557
30. Wang J, Li H, Li B, Gong Q, Chen X, Wang Q. Co-culture of bone marrow stem cells and macrophages indicates intermediate mechanism between local inflammation and innate immune system in diabetic periodontitis. *Exp Ther Med.* 2016;12(2):567-572. doi:10.3892/etm.2016.3386
31. Nisha KJ, Suresh A, Anilkumar A, Padmanabhan S. MIP-1 α and MCP-1 as salivary biomarkers in periodontal disease. *Saudi Dental Journal.* 2018;30(4):292-298. doi:10.1016/j.sdentj.2018.07.002
32. Matoba T, Egashira K. Anti-Inflammatory Gene Therapy for Cardiovascular Disease. *Curr Gene Ther.* 2011;11(6):442-446. doi:10.2174/156652311798192888
33. Wang J, Seo MJ, Deci MB, Weil BR, Canty JM, Nguyen J. Effect of CCR2 inhibitor-loaded lipid micelles on inflammatory cell migration and cardiac function

- after myocardial infarction. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:6441-6451. doi:10.2147/IJN.S178650
34. Solari R, Pease JE, Begg M. Chemokine receptors as therapeutic targets: Why aren't there more drugs? *Eur J Pharmacol*. 2015;746:363-367. doi:10.1016/j.ejphar.2014.06.060
 35. Apostolakis S, Amanatidou V, Spandidos DA. Therapeutic implications of chemokine-mediated pathways in atherosclerosis: Realistic perspectives and utopias. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31(9):1103-1110. doi:10.1038/aps.2010.131
 36. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(1):185-194. doi:10.1172/JCI28549
 37. Quinones MP, Martinez HG, Jimenez F, et al. CC chemokine receptor 5 influences late-stage atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007;195(1):e92-e103. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.026
 38. Wang X, Li W, Yue Q, et al. C-C chemokine receptor 5 signaling contributes to cardiac remodeling and dysfunction under pressure overload. *Mol Med Rep*. 2020;23(1):1-1. doi:10.3892/mmr.2020.11687
 39. Joy MT, ben Assayag E, Shabashov-Stone D, et al. CCR5 Is a Therapeutic Target for Recovery after Stroke and Traumatic Brain Injury. *Cell*. 2019;176(5):1143-1157.e13. doi:10.1016/j.cell.2019.01.044
 40. Cavalla F, Biguetti CC, Dionisio TJ, et al. CCR5 Δ 32 (rs333) polymorphism is associated with decreased risk of chronic and aggressive periodontitis: A case-control analysis based in disease resistance and susceptibility phenotypes. *Cytokine*. 2018;103:142-149. doi:10.1016/j.cyto.2017.09.022
 41. Ferreira SB, Repeke CE, Raimundo FM, et al. CCR5 mediates Pro-osteoclastic and osteoclastogenic leukocyte chemoattraction. *J Dent Res*. 2011;90(5):632-637. doi:10.1177/0022034510395021
 42. Balci N, Cekici A, Kurgan Ş, Sahinkaya S, Serdar MA. Potential biomarkers reflecting inflammation in patients with severe periodontitis: Fractalkine (CX3CL1) and its receptor (CX3CR1). *J Periodontal Res*. 2021;56(3):589-596. doi:10.1111/jre.12859
 43. Apostolakis S, Krambovitis E, Vlata Z, Kochiadakis GE, Baritaki S, Spandidos DA. CX3CR1 receptor is up-regulated in monocytes of coronary artery diseased patients: Impact of pre-inflammatory stimuli and renin-angiotensin system modulators. *Thromb Res*. 2007;121(3):387-395. doi:10.1016/j.thromres.2007.04.005

44. Combadière C, Potteaux S, Gao JL, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation*. 2003;107(7):1009-1016. doi:10.1161/01.CIR.0000057548.68243.42
45. Löe H, Silness J. Periodontal Disease in Pregnancy I. Prevalence and Severity. *Acta Odontol Scand*. 1963;21(6):533-551. doi:10.3109/00016356309011240
46. Silness J, Löe H. Periodontal Disease in Pregnancy II. Correlation Between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand*. 1964;22(1):121-135. doi:10.3109/00016356408993968
47. American Academy of Periodontology. American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2015;86(7):835-838. doi:10.1902/jop.2015.157001
48. Haro A, Saxlin T, Suominen AL, et al. Serum lipids modify periodontal infection - C-reactive protein association. *J Clin Periodontol*. 2012;39(9):817-823. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01920.x
49. Garlet GP, Martins W, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontol Res*. 2003;38(2):210-217. doi:10.1034/j.1600-0765.2003.02012.x
50. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(5):310-316. doi:10.1111/j.1399-302X.2005.00232.x
51. Venza I, Visalli M, Cucinotta M, de Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory Gene Expression at Chronic Periodontitis and Peri-Implantitis Sites in Patients With or Without Type 2 Diabetes. *J Periodontol*. 2010;81(1):99-108. doi:10.1902/jop.2009.090358
52. Verweij SL, Duivenvoorden R, Stiekema LCA, et al. CCR2 expression on circulating monocytes is associated with arterial wall inflammation assessed by 18F-FDG PET/CT in patients at risk for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2018;114(3):468-475. doi:10.1093/cvr/cvx224
53. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Grechko A v., Myasoedova VA, Orekhov AN. Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*. 2018;104(2):114-124. doi:10.1016/j.yexmp.2018.01.008
54. Kitade H, Sawamoto K, Nagashimada M, et al. CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating

- both macrophage recruitment and M1/M2 status. *Diabetes*. 2012;61(7):1680-1690. doi:10.2337/db11-1506
55. Hosokawa Y, Nakanishi T, Yamaguchi D, Nakae H, Matsuo T. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in periodontal diseased tissue. *Clin Exp Immunol*. 2005;139(3):506-512. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02675.x
 56. Flierl U, Bauersachs J, Schäfer A. Modulation of platelet and monocyte function by the chemokine fractalkine (CX3CL1) in cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(6):624-633. doi:10.1111/eci.12443.
 57. Riopel M, Vassallo M, Ehinger E, et al. CX3CL1-Fc treatment prevents atherosclerosis in Ldlr KO mice. *Mol Metab*. 2019;20:89-101. doi:10.1016/j.molmet.2018.11.011.
 58. Rowinska Z, Koeppel TA, Sanati M, et al. Role of the CX3C chemokine receptor CX3CR1 in the pathogenesis of atherosclerosis after aortic transplantation. Merx MW, ed. *PLoS One*. 2017;12(2):e0170644. doi:10.1371/journal.pone.0170644.

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 dos subtipos de monócitos, micropartículas circulantes e quimiocinas na Doença Periodontal associada ao Diabetes

Pesquisador: Carolina Nunes França

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 20616219.8.0000.0081

Instituição Proponente: Universidade de Santo Amaro - UNISA

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.580.518

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

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

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 17 de Setembro de 2019

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

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