ANA PAULA SASSA BENEDETE

Níveis salivares e de fluido gengival de Mieloperoxidase/Peroxidase em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada

São Paulo

2013

ANA PAULA SASSA BENEDETE

Níveis salivares e de fluido gengival de Mieloperoxidase/Peroxidase em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Benedete, Ana Paula Sassa.
Níveis salivares e de fluido gengival de mieloperoxidase/peroxidase em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada / Ana Paula Sassa Benedete; orientador Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima. -- São Paulo, 2013.

60 p.: fig., tab., 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1.Diabete *mellitus* tipo II. 2. Periodontite crônica. 3. Tratamento periodontal. 4. Saliva. I. Lima, Pugliesi Alves de. II. Título.

Benedete APS. Níveis salivares e de fluido gengival de Mieloperoxidase/Peroxidase em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: 26/06/2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Dedico este trabalho a

Deus.....obrigada por me iluminar sempre que necessitei, por nunca ter me abandonado, por me presentear a cada dia com suas bênçãos e por colocar pessoas abençoadas em minha vida. Sinto sua presença intensamente. Obrigada por mais essa conquista!!!!! O amor que sinto pelo Senhor é infinito.....

Aos meus pais **Nelson** e **Aparecida** que me propiciaram uma vida maravilhosa onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e que sonhar e concretizar os sonhos só dependerão de nossa vontade. E não bastaria um muito obrigado, a vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. Aos meus queridos vô **Bido** e vó **Nida** fonte de humildade, bondade e sabedoria. Aos meus irmãos **Gustavo, Nágilla e Isabela** que sempre me ajudaram nessa conquista (vocês foram excelentes babás). EU AMO MUITO VOCES!!!!

Ao amor da minha vida **Fabio,** meu exemplo de caráter, sabedoria, humildade, amor e família. Que me deu de presente meus tesouros mais preciosos **Vitor e Guilherme**. Vitor, divido esse momento com você, pois você esteve presente desde o primeiro dia em que entrei no mestrado (dentro de mim) e continuou meu companheiro até o fim. Foi em você que tirava forças todos os dias para eu continuar, no seu sorriso e no seu olhar encantador, precisava deixar você bem cedinho com a Didinha, para terminar meus créditos e minha pesquisa. Foi por você que eu não desisti, para te mostrar que com o estudo conseguimos alcançar nossos objetivos e realizar nossos sonhos....Você é lindo demais!!!!! Guilherme ainda não nos vimos pessoalmente mas o amor que já sinto por você é incondicional e infinito, não vejo a hora de te pegar em meus braços....

À **Stella** (Didinha) mais irmã que cunhada. Como você me ajudou durante esses anos, amamentou, cuidou e amou meu filho na minha ausência. Acordava ainda na madrugada para ficar com ele. Fez o que muitas irmãs de sangue não fariam. Muito obrigada mesmo!!!! Aos meus sogros **James e Dulce** que me deram todo o apoio e atenção que precisa para seguir em frente, aos meus cunhados **André, Luana, Eduardo, Stella** e **Éden** sempre presentes.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos **pacientes** que participaram desse estudo. Obrigada por confiarem em nosso trabalho, pela dedicação, pontualidade e paciência. Aprendi muito com cada um de vocês, vocês foram fundamentais para a construção do meu saber.....

Ao meu Orientador **Prof. Dr. Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima**. Obrigada por ter me aceitado como aluna, por ter apoiado minhas idéias e acreditado no meu potencial. Sempre muito educado e atencioso, esclarecia todas as minhas dúvidas e tornava os problemas do nosso projeto fáceis de serem resolvidos. Não hesitava em me ensinar, Obrigada.....

A minha primeira Orientadora de vida acadêmica **Sílvia Vanessa Lourenço**, obrigada por ter me mostrado a importância do conhecimento científico, ter me despertado a paixão pela pesquisa e por ter acreditado e "cuidado" tão bem de mim durante nosso trabalho. Eu te admiro demais!!!!!

À aluna de mestrado **Daniela Yumie Takahashi**, agradeço pela sua dedicação, responsabilidade, amizade e companheirismo durante esses anos que passamos juntas. Tentei encontrar outra palavra para você, mas a única que me surgiu foi *ANJO*, e é exatamente isso que você foi pra mim.....um anjo que Deus colocou na minha vida. OBRIGADA por tudo e pode ter certeza que sempre estarei pronta a te ajudar .....

AGRADECIMENTOS

Aos colegas da pós-graduação **Dida, Caio, Carlos Mafra, Ecinele, Flavia, Henrique, Isabella, Lívia, Marcelo Sirolli, Mari Rabelo, Mari Rocha, Michelle, Priscila, Rodrigo Santos, Rodrigo Nahás, Vanessa, Verônica, Samuel e Karin**, obrigada pela amizade, parceria e companheirismo foi um privilégio tê-los como amigos.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia FOUSP, **Prof. Dr. Claudio Mendes Pannuti, Prof. Dr. Francisco Emílio Pustiglioni, Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito, Prof. Dr. Giorgio De Micheli, Prof. Dr. João Batista Cesar Neto, Profa Dra. Marinella Holzhausen, Prof. Dra. Luciana Saraiva de Campos, Prof. Dr. Cesário Antônio Duarte, Prof. Dr. Marco Antônio Paupério Georgetti e Prof. Dra. Marina Clemente Conde,** agradeço infinitamente o quanto vocês foram importante na minha trajetória acadêmica, desde a graduação até a pós-graduação, sempre dispostos a me ensinar, todos vocês tem um pouquinho de “culpa” por eu ter me apaixonado pela periodontia, OBRIGADA!!!!

À **Profa Dra. Marinella Holzhausen** sempre disposta a me ajudar e a esclarecer minhas dúvidas. Obrigada pelas orientações e sugestões durante meu estudo. Obrigada pela sua contribuição no laboratório.

As minhas amigas de longa data **Rogéria e Simone**, obrigada pela ajuda e dedicação desde o início da pesquisa, quantas coisas passamos juntas e Graças a Deus conseguimos superar e vencer tudo!!!!!

As minhas amigas **Elaine, Gislene e Hilana**, obrigada pela amizade, pelo companheirismo e a ajuda que vocês me deram quando eu precisei.....Até foram pro laboratório me ajudar.....Obrigada por terem tornado meu mestrado mais leve, divertido e agradável....Espero que nossos almoços continuem pra sempre!!!! *“A gente não faz amigos, reconhece-os”* (*Vinícius de Moraes)*

Ao responsável pela Clínica Odontológica **Adauto** que sempre abria uma exceção para eu usar a clínica quando um paciente aparecia inesperadamente. Obrigada pela compreensão!!!!!

À **Márcia e Marília,** equipe administrativa da Disciplina de Periodontia, muito obrigada pela disposição, paciência, auxílio com os prazos, relatórios e com os pacientes.

Aos **funcionários da FOUSP**, muitos deles participaram da pesquisa, obrigada pela educação e respeito que sempre tiverem comigo e com meus pacientes, muitas vezes acompanhavam pacientes perdidos, orientavam e esclareciam suas dúvidas com muita gentileza.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Atala Dib**, responsável pelo Centro de Diabetes da UNIFESP, sempre muito gentil e prestativo no esclarecimento de dúvidas sobre os pacientes com diabetes, obrigada por ter aberto as portas do seu ambulatório para triarmos os nossos pacientes.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará e a Simone Aparecida Teixeira**, obrigada por terem aceitado e acreditado em nosso estudo, por terem sido tão prestativos e participativos durante as análises das amostras, por estarem sempre dispostos a esclarecer minhas dúvidas sobre as reações e resultados. Obrigada por tudo!!!!

Aos Professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral **Dr. Fernando Neves Nogueira** e **Dra. Alyne Simões Gonçalves**, a aluna de doutorado **Flávia Ibuki** e ao técnico **Douglas Nesadal**, obrigada por todo o apoio e orientação que vocês me deram, sempre dispostos a esclarecem minhas dúvidas, sempre presentes durantes as reações, pela disponibilidade de tempo, nunca me deixaram sozinha no laboratório, obrigada pela gentileza de armazenarem minhas amostras no freezer e cederem gelo seco para minhas coletas. Vocês foram um exemplo de parceria!!!!

Aos **Professores da Banca Examinadora**, agradeço por terem aceitado o convite e por enriquecerem esse trabalho com suas sugestões e críticas.

À **FAPESP**, pelo Auxílio à Pesquisa (protocolo nº 2009/16373-5).

À **CAPES**, pela bolsa de mestrado no Programa de Demanda Social.

Agradeço a toda minha família (tios(as), primos(as), sobrinhos(as)) e aos meus amigos pessoais que de alguma forma participaram de todo o processo do meu mestrado, pela compreensão de minha ausência em muitas festas e reuniões familiares. Obrigada de coração, pois vocês foram fundamentais nessa minha conquista, sozinhos não somos nem conseguimos nada de importante em nossas vidas!!!!!

“Tomara

Que a tristeza te convença

Que a saudade não compensa

E que a ausência não dá paz

E o verdadeiro amor de quem se ama

Tece a mesma antiga trama

Que não se desfaz

E a coisa mais divina

Que há no mundo

É viver cada segundo

Como nunca mais...”

Vinícius de Moraes

RESUMO

Benedete APS. Níveis salivares e de fluido gengival de Mieloperoxidase/Peroxidase em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013.Versão Corrigida.

Objetivos: Avaliar os níveis de mieloperoxidase do fluido gengival (MPO) e de peroxidase salivar (SPO) de pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada (DMDP) antes e após o tratamento periodontal. **Material e Métodos:** Participaram do estudo 31 indivíduos com DMDP, 31 controle com DM 2 (DM), 31 com periodontite crônica generalizada sem diabetes (DP) e 31 Controles(C) saudáveis periodontalmente e sistemicamente. Foram coletados dados de parâmetros clínicos como profundidade clínica de sondagem (PCS), nível clínico de inserção (NCI), sangramento à sondagem (SS), índice de placa (IP) e amostras de sangue para hemoglobina glicada, saliva e fluido gengival (FG) de todos os pacientes antes e 30 dias após o tratamento periodontal (TP). A atividade das enzimas foi determinada pela técnica de espectrofotometria. Os dados clínicos e enzimáticos foram analisados por métodos estatísticos não-paramétricos. **Resultados:** No baseline, a atividade da MPO estava maior no grupo DMDP: 1893,27 comparado ao grupo DM: 1202,73 (p□0,015) e ao grupo C: 6,46 (p□0,001). Também se mostrou mais elevada no grupo DP: 2196,10 em relação ao grupo C: 6,46 (p□0,007). O tratamento periodontal se mostrou efetivo na redução de MPO nos grupos DMDP e DP (p□0,004). A atividade da SPO estava mais elevada na comparação entre os grupos DMDP: 138859,10 e grupo C: 26927,453 (p□0,001) e DMDP com o grupo DP: 59115,99(p<0,02). O tratamento periodontal se mostrou eficiente para a redução dos níveis de SPO nos grupos DMDP e DP, mas apenas foi significante para o grupo DP (p<0,005). **Conclusão:** A SPO apresentou níveis mais elevados nos grupos DMDP comparado ao grupo DP e ao grupo C. A MPO apresentou níveis mais elevados no grupo DMDP comparados aos grupos DM e C. E o grupo DP mostrou maiores níveis de MPO em comparação ao grupo C. O tratamento periodontal foi efetivo na melhora dos parâmetros clínicos periodontais, no volume do FG nos grupos DMDP e DP que se refletiu na redução dos níveis de

SPO no grupo DP e de MPO nos grupos DMDP e DP. Após o tratamento periodontal, os níveis de MPO se mostraram maiores para o grupo DMDP comparados aos níveis observados no grupo DP.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 2. Periodontite crônica. Mieloperoxidase. Peroxidase. Saliva. Fluido Crevicular Gengival. HbA1c.

ABSTRACT

Benedete APS. Salivary and gingival crevicular fluid levels of Myeloperoxidase/ Peroxidase in type 2 diabetes mellitus patients with generalized chronic periodontitis. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013.Versão Corrigida.

Objectives: To evaluate the levels of gingival crevicular fluid (GCF) myeloperoxidase (MPO) and salivary peroxidase (TSP) in type 2 diabetes mellitus patients with generalized chronic periodontitis (DMDP) before and after the non-surgical periodontal treatment (PT). **Material and Methods** Thirty-one individuals were included in each group: DMDP, DM, chronic periodontitis (DP), control (C). Plaque index (PI), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL), blood, saliva and GCF of all patients were collected at baseline and 30 days after PT. The enzyme activity was determined by spectrophotometer. Clinical and enzymatic data were analyzed by non-parametric statistical methods. **Results:** At baseline, the MPO activity was significantly higher in the DMDP: 1893.27 compared to the DM group: 1202.73 (p□0.015) and to C group: 6.46 (p□0.001). Results also showed significantly higher levels in the DP group: 2196.10 compared to the C group: 6.46 (p□0.007). PT reduced MPO levels in DP and DMDP groups (p□0.004). TPS activity was significantly higher in DMDP: 138859.10 and C: 26927.453 groups (p□0.001) when compared with DMDP and DP: 59115.99 groups (p<0.02). PT effectively reduced TPS levels of DMDP and DP groups, but achieved statistical significance for the PD group (p <0005). **Conclusion:** TPS showed higher levels for DMDP groups compared to PD and C group. MPO showed higher levels for DMDP group compared to DM and C. PD group showed higher levels of MPO compared to C group. Periodontal treatment resulted in significant improvement of clinical parameters and FG volume for both groups DP and DMDP. That was reflected in the low levels of TPS in DP group and the low levels of MPO in DP and DMDP groups. After periodontal therapy, MPO levels were higher for DMDP group compared to the levels observed in PD group.

Keywords: Diabetes mellitus type 2. Chronic periodontitis. Myeloperoxidase. Peroxidase. Saliva. Gingival crevicular fluid. HbA1c

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SPO/TPS	peroxidase salivar / total salivary peroxidase
MPO	mieloperoxidase
FG/GCF	fluido gengival / gingival crevicular fluid
PCS/PD	profundidade clínica de sondagem / periodontal probing depth
NCI/CAL	nível clínico de inserção / clinical attachment level
SS/BOP	sangramento à sondagem / bleeding on probing
IP/PI	índice de placa / plaque index
TP/PT	tratamento periodontal / periodontal treatment
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
Cl^-	cloreto
DM1	diabetes *mellitus* tipo 1
DM2	diabetes *mellitus* tipos 2
C	pacientes sistemicamente e periodontalmente saudáveis
DMDP	pacientes diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada
EUA	Estados Unidos da América
AGE(s)	advanced glycation end-products (produtos finais de glicação avançada)
LPS	lipopolissacarídeos
CPR	proteína C-reativa
IL-6	interleucina 6
SCN^-	íon tiocianato
$OSCN^-$	íon hipotiocianito
DM	pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 com periodonto saudável
DP	pacientes saudáveis sistemicamente com periodontite crônica generalizada
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Hb1Ac	hemoglobina glicada

mg	miligramas
dL	decilitros
ADA	American Diabetes Association
AAP	Academia Americana de Periodontia
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
CEP	comitê de ética em pesquisa
n	número de pacientes
mm	milímetros
NY	New York
h	hora
LEC	linha esmalte-cemento
MG	margem gengival
µL	microlitros
rpm	rotações por minutos
nm	nanômetros
pH	potencial hidrogeniônico
HTAB	brometo de hexadeciltrimetilamônia
µM	micromolar
mL	mililitros
ELISA	enzyme-linked-immunoabsorbent assay
UMPO	unidades de mieloperoxidase
µmol	micromol
µl	microlitro
µg	micrograma
g	grama
L	litro
N	normal
PBS	phosphate buffer saline (tampão fosfato e salina)
DEPC	diethylpyrocarbonate (dietilpirocarbonato)
SDS	sodium dodecyl sulphate (dodecil sulfato de sódio)
SPSS	software aplicativo-statistical package for the social sciences (pacote estatístico para as ciências sociais)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
±	mais ou menos
º C	graus Celcius
=	igual
x	vezes
≠	diferente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DA LITERATURA 19
2.1 Diabetes como fator de risco para a doença periodontal 20
2.2 Doença periodontal como um fator de risco para o diabetes 21
2.3 Mieloperoxidase/Peroxidase Salivar 22
3 PROPOSIÇÃO 24
4 MATERIAL E MÉTODOS 25
4.1 Seleção da Amostra 25
4.2 Critérios de Inclusão 26
4.3 Critérios de Exclusão 27
4.4 Critérios de Pareamento dos Grupos 28
4.5 Exame Clínico Intrabucal 28
4.6 Coleta de Saliva Total 29
4.7 Coleta do Fluido Gengival 30
4.8 Coleta de Sangue Periférico 30
4.9 Tratamento Periodontal 31
4.10 Preparação das Amostras para a Análise Laboratorial 32
4.11 Análise Enzimática SPO e MPO 33
4.12 Análise Estatística 34
5 RESULTADOS 35
5.1 Resultados Clínicos 36
5.2 Resultados Enzimáticos 39
6 DISCUSSÃO 42
7 CONCLUSÕES 47
REFERÊNCIAS 48
ANEXOS 55

1 INTRODUÇÃO

O sistema de peroxidase salivar é um dos mais importante sistemas de defesa inata na saliva. Ele consiste da peroxidase salivar (SPO), originária das glândulas salivares e a mieloperoxidase (MPO) enzima encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, originária do fluido gengival (FG) (Tenovuo; Pruit 1984). A SPO contribui para a manutenção da saúde oral devido a sua ação bactericida que protege os dentes e mucosas pela regulação das espécies microbianas e de seu número (Mandel, 1989). Ela também previne o acúmulo de produtos tóxicos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e inativa inúmeros compostos carcinogênicos e mutagênicos (Tenovuo; Pruit 1984). A MPO em combinação com H_2O_2 e cloreto (Cl^-), constitui um potente sistema antimicrobiano (Klebanoff, 2005).

Níveis elevados de MPO no FG estão associados com a severidade da doença periodontal (Wei et al*.,* 2004). Tanto os níveis de SPO (Smith et al*.,* 1984) quanto o de MPO na doença periodontal (Smith et al*.,* 1986; Cao; Smith, 1989; Wei et al*.,* 2004; Marcaccini et al., 2010; Hernández et al., 2010) estão aumentados, sendo que após o tratamento periodontal (TP) esses níveis diminuem significativamente (Buchmann et al*.,* 2002; Gonçalves et al., 2008; Marcaccini et al., 2010; Hernández et al., 2010). Dessa forma, alguns autores sugerem que a MPO no FG possui um potencial como marcador de doença periodontal (Smith et al., 1992; Jentsch et al., 2004, Aras et al., 2007; Borges et al., 2007).

Com relação aos pacientes portadores de diabetes, a literatura sugere uma limitação na capacidade fagocítica assim como na capacidade microbicida relacionada à atividade da MPO (de Souza Ferreira et al*.,* 2012). A alteração na atividade da MPO nesses pacientes pode ser resultado da hiperglicemia, modulando negativamente a sua atividade enzimática, essa hipótese sugere que a presença de altas concentrações de glicose no plasma pode causar alterações na conformação da enzima ou em seu sítio catalítico, possivelmente pela glicação de aminoácidos, levando a uma inativação enzimática e perda da função fisiológica (Ikeda et al., 1996; Ahmed et al., 1997). Existem poucos estudos que avaliam a atividade da MPO/SPO em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipos 2 (DM2). Dentre esses

poucos estudos estão o de Dodds et al. (2000) e Wiersma et al. (2008), que relataram maiores níveis de MPO/SPO nos portadores de DM2. E o estudo de Gonçalves et al. (2008) que mostrou que a atividade da MPO estava menor nos indíviduos portadores de DM2 e DP.

Considerando a importância desse biomarcador na resposta inflamatória em pacientes com periodontite crônica, a redução de seus níveis após o tratamento periodontal e a limitada informação disponível na literatura a respeito de seus níveis em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 e doença periodontal (Gonçalves et al., 2008) torna-se importante avaliar os níveis de mieloperoxidase do fluido gengival e de peroxidase salivar de pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada (DMDP).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Diabetes Mellitus é uma doença metabólica caracterizada pela tríade clássica polidipsia, poliúria e polifagia, consequência da quebra da homeostase no metabolismo da glicose. O diabetes afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo, a estimativa é de que, até 2025, esse número aumente para 380 milhões (ADA, 2011).

A ocorrência média de diabetes, segundo o relatório publicado pelo centro de controle e prevenção do diabetes nos Estados Unidos (EUA) é de 25,8 milhões de pessoas(8,3% da população) (ADA, 2011) e no Brasil esse número passa de 5,2% da população geral (Ministério da Saúde). Aproximadamente 90% dos casos mundiais correspondem a pacientes portadores de diabetes do tipo 2 (Mealey, 2000).

A alteração do metabolismo da glicose, lipídios e proteínas no diabetes produz alterações na circulação macro e micro-vasculares que estão associadas a cinco complicações clássicas da doença como retinopatia, neuropatia, nefropatia, complicações cardiovasculares e alterações na cicatrização de feridas (Mealey; Oates 2006). A doença periodontal é indicada como a sexta complicação do diabetes, baseado na alta frequência da presença de ambas as doenças no mesmo paciente (Mealey, 2000; Mealey; Oates, 2006, Loe, 1993; Grossi; Genco, 1998). Nesses pacientes a doença periodontal se apresenta em forma mais severa e evolui mais rapidamente do que no paciente sistemicamente saudável (Cianciola et al., 1982; Papapanou, 1996). É importante ressaltar, ainda, que a doença periodontal interfere negativamente no controle glicêmico desses pacientes (Mealey; Oates, 2006).

DM2 resulta na combinação do aumento da resistência à insulina endógena com o defeito na secreção dessa substância (Soskolne, 1998).

A periodontite é uma doença inflamatória crônica multifatorial desencadeada por um biofilme bacteriano composto por um complexo de periodontopatógenos que

interagem com os tecidos e células do hospedeiro. Em indivíduos susceptíveis, tais patógenos se propagam no sulco gengival/bolsa periodontal, liberam seus antígenos e promovem alteração na integridade dos tecidos periodontais, levando a destruição das estruturas de suporte do dente (cemento, ligamento periodontal e osso alveolar) (Bosshardt; Lang, 2005).

A importância clínica da periodontite se reflete na sua alta prevalência na população mundial. Baseado em um estudo recente, mais de 47% da população dos EUA sofrem de periodontite crônica, nos adultos com 65 anos ou mais, 64% apresentam periodontite moderada ou severa (Eke et al., 2012). No sul do Brasil, 66% da população jovem (15-21 anos) apresenta doença periodontal (Susin et al., 2011).

2.1 Diabetes como fator de risco para a doença periodontal

Pacientes diabéticos apresentam maior prevalência (três vezes maior), progressão e severidade para a doença periodontal comparados a pacientes sistemicamente saudáveis (Cianciola et al., 1982; Papapanou, 1996).

Os mecanismos nos quais o diabetes pode influenciar negativamente a saúde periodontal são originários do prejuízo na defesa imune local e na redução da renovação dos tecidos periodontais. Nos indivíduos diabéticos, as funções alteradas das células imunes resultam de um lado na redução da eliminação das bactérias periodontopatógenas e por outro lado aumenta a secreção das citocinas pró-inflamatórias (Mealey; Oates, 2006). Estas citocinas pró-inflamatorias promovem destruição periodontal e, além disso, possuem um papel decisivo na patogênese da periodontite. Além do mais, maiores níveis de produtos finais de glicação avançada (AGEs) podem ser encontrados no periodonto de diabéticos comparados aos de indivíduos não diabéticos (Schmidt et al.,1996). A interação entre AGEs e colágeno gera macromoléculas de colágeno altamente instáveis, que são resistentes à degradação enzimática fisiológica (Monnier et al., 1996). Por isso, a renovação de

todo o tecido periodontal é efetivamente comprometida em indivíduos diabéticos, especialmente quando o controle glicêmico é deficiente. Esse fenômeno explica, em parte, as razões pelas quais os pacientes com diabetes são três vezes mais propensos a desenvolver periodontite do que indivíduos não diabéticos.

2.2 Doença periodontal como um fator de risco para o diabetes

A formação e acúmulo excessivos de AGEs nos tecidos é a maior causa das complicações diabéticas. A ligação dessas moléculas aos neutrófilos produz um estado hiperinflamatório que amplifica a resposta às citocinas. Esses neutrófilos previamente ativados também mostram uma resposta intensificada ao fazer contato com os LPS das bactérias gram-negativas, presentes no biofilme subgengival, desencadeando a cascata inflamatória e aumentando a destruição do tecido conjuntivo periodontal e a severidade do diabetes (Serrano-Rios; Corbaton, 2005).

A periodontite pode influenciar negativamente contribuindo para a resistência à insulina e, portanto, agravando o controle glicêmico. Em indivíduos com periodontite, mesmo o simples ato de mastigar pode causar uma disseminação sistêmica de patógenos periodontais e seus produtos metabólicos (Geerts et al., 2002). Esta disseminação pode induzir bacteremia ou endotoxemia que é caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de mediadores inflamatórios como a proteína C-reativa (CPR), IL-6 e fibrinogênio. Neste contexto, os dados científicos tem demonstrado que a terapia periodontal pode reduzir a quantidade de mediadores pro-inflamatórios circulantes e ainda pode contribuir para melhora do estado glicêmico (Gurav, 2012; Marcaccini et al., 2010).

2.3 Mieloperoxidase/Peroxidase Salivar

A saliva possui um papel importante na cavidade bucal, constituindo a primeira linha de defesa contra os agentes agressores. Os principais constituintes dos sistemas de defesa existentes na saliva são: lisozima, lactoferrina, antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, glutationa peroxidase, catalase), antioxidantes não-enzimáticos (vitamina E, coenzima Q, ácido ascórbico, flavonóides), células fagocíticas, imunoglobulinas e peroxidases (peroxidase salivar e mieloperoxidase)(Mandel, 1989; Halliwell, 2007). Já o FG consiste de uma complexa mistura de substâncias derivadas do soro sanguíneo, leucócitos, células estruturais do periodonto e microrganismos bucais. É composto de soro e materiais localmente gerados, como produtos da desorganização dos tecidos, antioxidantes, mediadores imunes e inflamatórios contra os patógenos presentes no biofilme subgengival (Genco, 1992; Armitage, 2004; Halliwell, 2007).

O sistema de peroxidase salivar é um dos mais importantes sistemas de defesa inato que contribui para a manutenção da saúde oral. Ele é constituído de peroxidase salivar (SPO) proveniente das células acinares das glândulas salivares e de mieloperoxidase (MPO) de origem leucocitária proveniente do fluido gengival e de outros componentes. Este sistema contribui para a manutenção da saúde bucal por meio de sua ação antioxidante e antibacteriana (Tenovuo; Pruitt, 1984), a SPO catalisa a reação de H_2O_2 com o íon tiocianato (SCN^-), derivado da secreção salivar, gerando o íon hipotiocianito ($OSCN^-$) com efeito citotóxico aos microorganismos (Thomas et al., 1980). A MPO catalisa a conversão H_2O_2 e Cl^- em ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante produzido pelos neutrófilos, com forte atividade antimicrobiana (Klebanoff, 2005).

Nos sítios com doença periodontal ocorre o aumento do volume de FG (Payne et al., 1975). A saliva e o FG têm muitas substâncias associadas à defesa do hospedeiro. Os níveis aumentados de FG estão relacionados com a doença periodontal e podem permitir monitorar os pacientes com possibilidade de progressão da periodontite (Armitage, 2004; Lamnster; Ahlo 2007).

A literatura sugere que a MPO presente no FG pode ter um grande potencial como marcador de doença periodontal (Aras et al., 2007; Smith et al., 1992). Estudos como os de Smith et al. (1986); Cao; Smith (1989), Yamalik et al. (2000), Wei et al. (2004); Marcaccini et al. (2010) e Hernández et al. (2010) demonstraram que há um aumento no nível de MPO no fluido gengival na presença de doença periodontal em pacientes sistemicamente sadios. O tratamento periodontal convencional (Smith et al 1986; Wolff et al., 1988; Hernández et al., 2010; Marcaccini et al., 2010) pode produzir uma diminuição significante da atividade da MPO no FG.

Existem poucos estudos que avaliam a atividade da MPO/SPO em pacientes portadores de DM2. Dentre esses poucos estudos estão o de Dodds et al. (2000) e Wiersma et al. (2008), que relataram maior atividade da MPO/SPO nos portadores de DM2 em saliva e plasma respectivamente. Entretanto, o estudo de Gonçalves et al. (2008) mostrou que a atividade da MPO estava menor nos indíviduos portadores de DM2 e doença periodontal e não mostrou diferenças significativas nos níveis de SPO naqueles pacientes.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem o propósito de:

- Avaliar os níveis de mieloperoxidase do fluido gengival e de peroxidase na saliva de pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada (DMDP) e compará-los aos de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 com periodonto saudável (DM), aos de pacientes saudáveis sistemicamente com periodontite crônica generalizada (DP) e a pacientes sem periodontite (C).

- Avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico nos níveis de mieloperoxidase do fluido gengival e de peroxidase na saliva nos pacientes com periodontite crônica generalizada (DMDP e DP).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da Amostra

Os pacientes, num total de 961, foram triados no período de fevereiro de 2011 a outubro de 2012. Desses, 720 eram portadores de DM2 e passaram por avaliação no Centro de Diabetes da UNIFESP. O restante, 241 pacientes sistemicamente saudáveis foram avaliados na Clínica de Pós-Graduação de Periodontia da FOUSP.

Dos 241 pacientes triados saudáveis sistemicamente com e sem doença periodontal 138 eram homens e 103 eram mulheres. Desses 179 foram excluídos por não se enquadrarem ao perfil da pesquisa (critérios de inclusão e pareamento).

Durante a etapa do exame de hemoglobina glicada (Hb1Ac), 70 foram excluídos por apresentarem níveis de HbA1c superiores a 8,5%, pois deveriam estar entre 6,5-8,5% HbA1c. Os níveis de HbA1c dos pacientes selecionados variou 6,5-8,5% HbA1c.

Dos 720 pacientes com diabetes, restaram apenas 62 para o início do tratamento. Esses números mostram a dificuldade na seleção desse grupo, apenas 8,61% dos pacientes triados conseguiram finalizar o estudo.

De todos os 961 pacientes triados, foram selecionados 124 pacientes, sendo 31 indivíduos com diabetes tipo 2 e com periodontite crônica generalizada (DMDP), 31 indivíduos com diabetes tipo 2 saudáveis periodontalmente (DM), 31 indivíduos sistemicamente saudáveis com doença periodontal crônica generalizada (DP) e 31 indivíduos sistemicamente saudáveis e sem periodontite (C) (tabela 5.1).

Nos indivíduos sistemicamente saudáveis foram realizados a anamnese, exame clínico periodontal, teste rápido para a verificação da glicemia na qual deveria estar $\leq$100mg/dl (ADA), coletas de amostras da saliva total e do fluido gengival. E nos indivíduos com diabetes tipo 2 além desses exames foi realizado também a coleta de sangue periférico para a mensuração da hemoglobina glicada.

Os pacientes com DM2 foram triados no Centro de Diabetes da Universidade Federal de São Paulo, com a supervisão do Prof. Dr. Sérgio Atala Dib. Nesse centro os pacientes são atendidos trimestralmente para o acompanhamento da diabetes.

Todos os indivíduos da pesquisa foram avaliados, examinados e suas amostras coletadas na Clínica de Pós-Graduação da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

4.2 Critérios de Inclusão

Todos os pacientes deveriam apresentar idade entre 35 e 70 anos e no mínimo 15 dentes naturais (excluindo os 3º molares). Foram incluídos indivíduos diagnosticados com periodontite crônica generalizada, de acordo com os critérios clínicos e radiográficos propostos pela Academia Americana de Periodontia (AAP 1999). Eles deveriam apresentar pelo menos 30% dos sítios com Profundidade Clínica de Sondagem (PCS) $\geq$ 5mm e no máximo 60% dos sítios com PCS $\leq$ 7mm, Nível Clínico de Inserção (NCI) $\geq$4mm, placa visível e Sangramento à Sondagem (SS). Indivíduos com bolsas periodontais $\geq$7mm foram excluídos do estudo.

Os pacientes portadores de diabetes tipo 2, deveriam ter no mínimo 5 anos do diagnóstico da DM2 e que apresentassem percentuais sanguíneos de hemoglobina glicada entre 6,5-8,5% no início do estudo. Foi reportado o uso e o tempo de uso de medicamentos para o controle do diabetes (agentes hipoglicemiantes, o uso de insulina ou a combinação de agentes hipoglicemiantes + insulina). Caso esses pacientes apresentassem múltiplas complicações decorrentes do diabetes (retinopatias, cardiopatias, nefropatias ou neuropatias) seriam excluídos da pesquisa.

A avaliação desses pacientes foi realizada por meio de uma ficha clínica/anamnese. Todos os pacientes aceitaram participar do estudo mediante a assinatura de um termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A), previamente aprovado pelos Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP/FOUSP: 152/2009 , Anexo B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São Paulo (CEP/UNIFESP: 0643/11, Anexo C).

4.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os pacientes que apresentaram alguma condição sistêmica (exceto diabetes) que pudesse afetar a progressão da doença periodontal (Ex: desordens imunológicas) ou que tenham feito uso de medicamentos tais como agentes anticoagulantes, antibióticos, anti-neoplásicos, contraceptivos ou antidepressivos nos últimos 6 meses e também pacientes que tenham feito uso de antiinflamatórios nos últimos 3 meses antes do início do estudo. Os indivíduos com história de reações anafiláticas, que utilizam aparelhos ortodônticos, fumantes e/ou gestantes também foram excluídos deste estudo. Além disso, nenhum paciente poderia ter recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses antes do início deste estudo.

Pacientes que apresentaram níveis maiores que 8,5% HbA1c de hemoglobina glicada foram excluídos do estudo, para melhor homogeneizar os grupos.

4.4 Critérios de Pareamento dos Grupos

Os grupos do estudo foram pareados de acordo com sexo, número de dentes presentes ($\pm$ 3 dentes) e tempo de duração de diabetes. Para os grupos DMDP e DP, o pareamento foi realizado de acordo o número de bolsas presentes $\leq$ 7mm ($\pm$ 3 bolsas).

4.5 Exame Clínico Periodontal

O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador previamente treinado e calibrado (k=0,92). Todos os dentes, exceto os terceiros molares, foram avaliados em seis sítios (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), para os seguintes parâmetros na seguinte ordem:

Índice de placa (IP) (O'Leary et al., 1972) – indica a presença de placa bacteriana nas faces: mesial, distal, vestibular e lingual. O índice é calculado pela divisão do número de superfícies coradas multiplicada x 100 pelo número total de faces.

Distância da Linha esmalte-cemento à margem gengival (LEC-MG) – A retração gengival será mensurada em todos os sítios do dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual).

Profundidade clínica de sondagem (PCS) – sondagem com sonda PCPUNC 15 (Hu Friedy, EUA) em seis sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual). Corresponde, em milímetros, à distância entre margem gengival e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

Nível clínico de inserção (NCI) – distância, em milímetros, entre a junção esmalte-cemento e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

Sangramento à sondagem (SS) – (Lenox et al., 1973): presença (positivo) ou ausência (negativo) de sangramento após 20 segundos da sondagem com sonda periodontal milimetrada em cada sítio provável (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual). A porcentagem de sangramento será calculada por paciente pela divisão do numero total dos sítios com sangramento pelo numero total de sítios nesse paciente (número de dentes presentes multiplicado por 6).

As avaliações foram realizadas no início do estudo e 30 dias após o tratamento periodontal. Para estes exames foram utilizadas sondas periodontais milimetradas tipo PCPUNC-BR 15 (HuFriedy EUA).

Todos os pacientes realizaram exame radiográfico intrabucal por tomadas periapicais. Essas radiografias foram utilizadas para o diagnóstico, planejamento e tratamento periodontal dos pacientes.

4.6 Coleta de Saliva Total

Primeiramente, os pacientes fizeram um bochecho com água durante 1 minuto, depois realizaram a coleta de saliva total durante 5 minutos, depositando a saliva em um coletor universal estéril. O fluxo salivar foi calculado dividindo o volume coletado pelo tempo. O método para a coleta da saliva total utilizado foi não-estimulado (cuspidela). As amostras foram armazenadas em gelo picado e posteriormente guardadas em biofreezer -80º C.

4.7 Coleta do Fluido Gengival (FG)

As coletas foram realizadas por um único profissional. Nos indivíduos com periodontite foram coletados FG de cinco sítios doentes (PCS ≥5mm e NCI ≥4mm) e para os grupos controles foram coletadas amostras de 5 sítios sadios (PCS≤ 3mm). Os sítios não poderiam ser adjacentes e nem ser dois sítios diferentes do mesmo dente. Os sítios selecionados foram isolados com roletes de algodão e suavemente secos com jato de ar por cinco segundos. A amostra do fluido gengival foi coletada com 3 tiras de papel absorvente (PerioPaper, ProFlow Inc., Amityville, NY, EUA), colocadas individualmente em cada sítio por 30 segundos cada tira (Rudin et al., 1970). O volume das amostras do FG foi mensurado com o Periotron 8000 (Oraflow,Inc., NY, EUA). Essas amostras foram armazenadas em microtubos plásticos estéreis. Para análise, foi feito um “pool” das amostras para sítios doentes e outro para sítios sadios de cada paciente. As coletas foram realizadas por um único pesquisador e armazenadas em gelo seco e posteriormente armazenadas em biofreezer -80ºC. As amostras visivelmente contaminadas com sangue foram descartadas.

4.8 Coleta de Sangue Periférico (%HbA1c)

As coletas de sangue periférico foram realizadas por uma única enfermeira do Serviço de Coletas Domiciliar do Laboratório Lavoisier e levadas ao laboratório para o seu devido processamento e análise.

As coletas foram realizadas no baseline, após 1 e 3 meses do tratamento periodontal.

As coletas de sangue periférico, saliva total e fluido gengival foram realizadas no mesmo dia em cada paciente, no período das 8h00 às 10h00 e eles deveriam estar em jejum de 02 horas.

4.9 Tratamento Periodontal

Os pacientes dos grupos controles (DM e C) receberam profilaxia oral e orientações de higiene oral.

Os pacientes portadores de periodontite crônica generalizada (DMDP e DP) receberam Tratamento Periodontal Não Cirúrgico, o qual se constituiu de sessões:

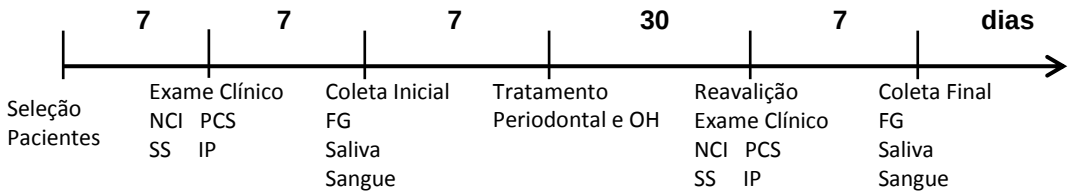
1. Instrução de Higiene Oral para Controle de Placa Bacteriana e Remoção de Cálculo Supragengival com o uso de curetas manuais (HuFriedy, EUA) e Ultrassom.
2. Eliminação de fatores retentores de placa
3. Raspagem, Alisamento e polimento corono-radicular com instrumentação manual e uso de ultrassom por sextante.
4. Integração Clínica
5. Revisão dos Procedimentos Básicos.

A quantidade de sessões necessárias foram definidas de acordo com as características e condições apresentadas por cada paciente.

Após a fase dos Procedimentos Básicos, iniciou-se a fase de controle por um período de 4 semanas. Dentro deste período, os pacientes receberam controle de placa bacteriana profissional semanal (orientação de higiene bucal, raspagem e profilaxia supra gengival) até o momento da Reavaliação.

Na Reavaliação, os pacientes foram reexaminados clinicamente e foram realizadas as coletas finais de saliva, FG e sangue periférico (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Cronograma dos procedimentos realizados:



Legenda
NCI – nível clínico de inserção; SS – sangramento a sondagem; IP- índice de placa
PCS – profundidade clinica de sondagem; FG- fluido gengival; OH- orientação higiene oral

4.10 Preparação das Amostras para a Análise Laboratorial

FG - Periopaper

A diluição das amostras foi realizada através de ¨pool¨ dos sítios coletados. Todos os periopapers coletados de sítios doentes foram transferidos para microtubos plásticos estéreis codificados de acordo com o código de cada paciente e foram então denominados de ¨pool sítios doentes¨. Os periopapers coletados de sítios sadios foram denominados de ¨pool sítios sadios¨ e os periopapers coletados dos sítios doentes após o tratamento periodontal foram denominados ¨pool sítios tratados¨. Em cada ¨pool¨ foi adicionado 400µl de PBS-DEPC e colocados no vórtex 3x por 30 segundos cada repetição. Foram retirados com a pipeta 100µl do sobrenadante para a realização das análises laboratoriais. Para a análise enzimática foi utilizada 50µl de amostra FG já diluída.

Saliva

As amostras de salivas foram centrifugadas a 5000 rpm por cinco minutos a 4º C. Todo o sobrenadante foi removido e transferido para microtubos plásticos estéreis codificados de acordo com o código de cada paciente. Para a análise enzimática foi utilizado 30µl de amostra de saliva

4.11 Análise Enzimática SPO e MPO

A medida de atividade de Mieloperoxidase (MPO) baseia-se na velocidade de oxidação do substrato o-dianisidina na presença de H_2O_2 e evidenciada pela mudança de absorbância medida a 460 nm (Bradley et al., 1982). As amostras de saliva e FG foram diluídas com solução de fosfato de potássio pH 6,0 contendo 0,5% brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, Sigma Chem. Co, EUA). As misturas foram aquecidas durante duas horas a 60°C para fins de inativação da catalase endógena (Ohta et al*.,* 2003) e centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos 4ºC. A 10 µL das soluções foram acrescentados 200 µL de solução de fosfato de potássio (50 mM, pH 6) contendo 16,7 mg/mL de o-dianisidina (Sigma Chem. Co., EUA) e 0,0005% de H_20_2 em microplaca ELISA (Molecular Devices, EUA).

A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi realizada registrando o aumento da absorbância da mistura a 460 nm (leituras coletadas em intervalos de 10 segundos durante 5 minutos). A atividade de MPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação e o resultado foi expresso em UMPO/µl de fluido e a atividade da peroxidase salivar por UPO/mg proteína. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade em µmol de H_2O_2 degradada por minuto.

Quantificação das proteínas totais da saliva

Para analisar a concentração das proteínas totais na saliva foi utilizado o método de Peterson, baseado nas reações do reagente biureto. O cobre em meio alcalino reage com a proteína gerando um complexo, este complexo formado pelo cobre e pela própria proteína apresenta aminoácidos fenólicos que reduzem o reativo de Folin resultando em coloração azulada.

Calculam-se as taxas correspondentes em uma curva de referência estabelecida com a solução padrão de albumina (10µl/mL a 100µg/mL).

As amostras foram diluídas (1:100) em água destilada, e a seguir adicionou-se o composto formado por: Sulfato cúprico pentahidratado (0,2g/L) tartarato de sódio e potássio (0,4 g/L), carbonato de sódio (20g/L), SDS 10% (5g/50ml) e hidróxido de sódio 0,8N (3,2g/100ml), as amostras foram agitadas e incubadas durante 10 minutos. Adicionou-se, em seguida, o reagente Folin Ciocalteau 2N, realizando-se nova agitação e incubação por 40 minutos a temperatura ambiente. Procedeu-se, então, a leitura das absorbâncias a 700nm contra a água destilada em leitor de placas ELISA (Molecular Devices, EUA). A concentração de proteínas foi expressa em µg/mL.

4.12 Análise Estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o programa SPSS para Windows versão 15.0. Foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e a distribuição dos dados não foi normal. Os dados clínicos e enzimáticos foram analisados por métodos estatísticos não-paramétricos.

Na comparação das medianas dos resultados dos parâmetros clínicos e das análises laboratoriais entre os 4 grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Caso houvesse diferença estatisticamente significativa, as comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Tukey. Na comparação entre duas medianas (intergrupos) foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Na comparação dentro do grupo (intragrupos) antes e após o tratamento periodontal foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para significância estatística utilizamos p□0,05.

5 RESULTADOS

Todos os pacientes selecionados inicialmente (n=124) terminaram o estudo. Não houve nenhuma intercorrência durante as etapas do estudo.

Os grupos DMDP e DM eram compostos de 31 pacientes cada, sendo 15 homens e 16 mulheres com idade média de 54 anos (DMDP: 38 a 70 anos e DP: 36 a 70 anos). A média de idade dos grupos DP e C foi de 47 anos (DP: 35 a 64 e C: 35 a 61) e também eram compostos por 31 pacientes cada, sendo 15 homens e 16 mulheres (tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Dados demográficos dos grupos

GRUPO	N	Sexo (frequência)	Idade Anos (média)
DMDP	31	H-15 (48,4%) M-16 (51,6%)	54
DM	31	H-15 (48,4%) M-16 (51,6%)	54
DP	31	H-15 (48,4%) M-16 (51,6%)	47
C	31	H-15 (48,4%) M-16 (51,6%)	47

DMDP: Grupo de pacientes com DM2 e DP; DP: Grupo de pacientes com DP e sistemicamente saudáveis; DM: Grupo de pacientes com DM2 e saudáveis periodontalmente; C: Grupo de pacientes saudáveis periodontalmente e sistemicamente. Teste estatístico chi-square.

5.1 Resultados Clínicos

No baseline, os grupos com doença periodontal (DMDP e DP) apresentaram valores significativamente mais elevados para PCS, NCI, SS e IP (p□0,001) comparados aos grupos controles DM e C. O grupo DM apresentou maiores valores para PCS (p=0,027) e para NCI (p=0,004) comparados ao grupo C. Para o exame de HbA1c o grupo DMDP mostrou valores superiores em relação ao grupo DM (p□0,05) tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Medianas e quartis (25-75%) dos parâmetros clínicos dos grupos no BASELINE

	DM DP (1) (n=31)	**DP (2) (n=31)**	**DM (3) (n=31)**	**Controle (4) (n=31)**	**Valor de P**
PCS (mm)	3,14 (2,88-3,47)	3,03 (2,75-3,44)	1,98 (1,86-2,25)	1,75 (1,61-2,01)	1≠3 p□0,001 1≠4 2≠3 2≠4 3≠4 p=0,027*
NCI (mm)	4,11 (3,44-4,68)	3,81 (3,58-4,48)	2,33 (2,00-2,83)	1,87 (1,68-2,13)	1≠4 p□0,001* 1≠3 2≠3 2≠4 3≠4 p=0,004*
SS %	43,52 (24,50-59,67)	72,93 (52,66-83,95)	9,67 (4,16-14,70)	6,86 (2,97-11,72)	1≠2 p□0,001* 1≠3 1≠4 2≠3 2≠4
IP %	70 (62-88)	89,92 (79,16-96,93)	14 (11,00-20,00)	17,50 (8,00-31,25)	1≠2 p□0,001* 1≠3 1≠4 2≠3 2≠4
HbA1c %	7,90 (7,10-8,40)		7,10 (6,30-8,10)		1≠3 p□0,05**

DMDP: Grupo de pacientes com DM2 e DP; DP: Grupo de pacientes com DP e sistemicamente saudáveis; DM: Grupo de pacientes com DM2 e saudáveis periodontalmente; C: Grupo de pacientes saudáveis periodontalmente e sistemicamente. PCS: Profundidade clínica de sondagem, NCI: Nível clínico de inserção, SS%: porcentagem de sítios com sangramento à sondagem, IP%: porcentagem de índice de placa, HbA1c%: Exame de hemoglobina glicada; Diferença estatisticamente significante quando p<0,05. * Teste Tukey para PCI, NCI, SS e IP. **Teste utilizado Mann-Whitney para HbA1c.

Os grupos com periodontite crônica (DMDP e DP), no baseline, mostraram valores significativamente mais elevados de volume de FG (p□0,001) comparados aos grupos saudáveis periodontalmente (DM e C). Em relação ao volume de saliva total, não houve diferenças entre os quatro grupos estudados (tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Medianas e quartis (25-75%) para volume de FG e de Saliva no BASELINE

	DM DP (1) (n=31)	**DP (2) (n=31)**	**DM (3) (n=31)**	**Controle (4) (n=31)**	**Valor de P**
VOL FG (µl)	6,47 (5,54-9,03)	7,42 (4,75-9,88)	3,11 (2,20-4,20)	4,02 (3,07-4,87)	1≠3 p□0,001 1≠4 2≠3 2≠4
VOL SALIVA (ml)	3 (2,50-4,00)	3 (2,00-5,00)	4 (2,75-4,00)	3 (2,62-3,37)	p□0,05

DMDP: Grupo de pacientes com DM2 e DP; DP: Grupo de pacientes com DP e sistemicamente saudáveis; DM: Grupo de pacientes com DM2 e saudáveis periodontalmente; C: Grupo de pacientes saudáveis periodontalmente e sistemicamente. VOL FG: Volume final de fluido gengival, VOL SALIVA: Volume final de saliva total. Teste estatístico de Tukey.

Em ambos os grupos portadores de periodontite crônica generalizada (DMDP e DP), o tratamento periodontal promoveu significativas reduções nos parâmetros clínicos avaliados. No grupo DMDP houve reduções para PCS, NCI, SS e IP (p□0,001). No grupo DP, o tratamento periodontal promoveu reduções para PCS e SS (p□0,001), NCI (p□0,004) e IP (p□0,003). Na comparação intergrupos (DMDP e DP), o parâmetro clínico de SS se mostrou mais elevado no grupo DP (p□0,001) e o IP se mostrou maior no grupo DMDP (p□0,015). O tratamento periodontal não resultou em diminuição significativa nos valores de HbA1c após 1 e 3 meses comparados aos valores do baseline (tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Comparação das medianas e quartis (25-75%) dos parâmetros clínicos dos grupos DMDP e DP ANTES e APÓS tratamento periodontal

		DMDP (n=31)	DP (n=31)	p**
PCS (mm)	**Antes**	3,14(2,88-3,47)	3,03(2,75-3,44)	p>0,7
	Após	2,34(2,20-2,63)	2,33(2,07-2,83)	p>0,8
	p*	p□0,001	p□0,001	
NCI (mm)	**Antes**	4,11(3,44-4,68)	3,81(3,58-4,48)	p>0,3
	Após	3,29 (2,98-3,98)	3,54(2,75-4,16)	p>0,2
	p*	p□0,001	p□0,004	
SS %	**Antes**	43,53(24,50-59,67)	72,93(52,66-83,95)	p□0,001
	Após	7,14 (3,93-18,00)	17,40(12,39-26,86)	p□0,001
	p*	p□0,001	p□0,001	
IP %	**Antes**	70,00(62,00-88,00)	89,92(79,16-96,93)	p□0,001
	Após	18 (11,50-26,00)	14,78(10,62-23,76)	p□0,015
	p*	p□0,001	p□0,003	
HbA1c %	**Antes**	7,90(7,10-8,40)		
	Após 1 mês	7,50 (6,80-8,60)		
	p*	p=0,4		
	Após 3 meses	7,70 (6,90-8,27)		
	p*	p=0,4		

DMDP: Grupo de pacientes com DM2 e DP; DP: Grupo de pacientes com DP e sistemicamente saudáveis. PCS: Profundidade clínica de sondagem, NCI: Nível clínico de inserção, SS%: porcentagem de sítios com sangramento à sondagem, IP%: porcentagem de índice de placa, HbA1c%: Exame de hemoglobina glicada. *Teste Wilcoxon para HbA1c. **Teste de Mann-Whitney.

Após a terapia periodontal, os valores de volume do FG nos pacientes dos grupos (DMDP e DP) diminuíram significativamente (p□0,001). Os valores de saliva total se mantiveram inalterados (tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Comparação das medianas e quartis (25-75%) para volume de FG e de Saliva para os grupos DMDP e DP ANTES e APÓS tratamento periodontal

		DMDP (n=31)	DP (n=31)	p**
VOL FG (µl)	Antes	6,47(5,54-9,03)	7,42(4,75-9,88)	p>0,9
	Após	4,34(3,11-6,34)	4,56(2,96-5,55)	p>0,9
	p*	p□0,001	p□0,001	
VOL SALIVA (ml)	Antes	3,00(2,50-4,00)	3,00(2,00-5,00)	p>0,3
	Após	3,00(2,00-4,00)	3,00(2,50-4,00)	p>0,3
	p*	p>0,5	p=0,4	

DMDP: Grupo de pacientes com DM2 e DP; DP: Grupo de pacientes com DP e sistemicamente saudáveis. VOL FG: Volume de fluido gengival, VOL SALIVA: Volume de saliva total. *Teste estatístico Wilcoxon. **Teste de Mann-Whitney

5.2 Resultados Enzimáticos

No baseline, os níveis de SPO no grupo DMDP estava mais elevado significativamente em comparação aos dos pacientes sistemicamente saudáveis, DMDP= 138859,10 comparado a C= 26927,45 (p=0,001) e DMDP= 138859,10 comparado a DP= 59115,99 (p=0,024) (tabela 5.6). O tratamento periodontal foi efetivo significativamente na redução dos níveis de SPO apenas no grupo DP (p□0,005), o grupo DMDP também apresentou reduções dos níveis dessa enzima, porem não significativas (p>0,5). Na comparação intergrupos após a terapia periodontal, não houve diferenças estatísticas entre os grupos com periodontite crônica (p>0,7) (tabela 5.7).

Os níveis de MPO, no baseline, estavam mais elevados nos grupos com periodontite crônica (DMDP e DP). O grupo DMDP apresentou níveis de MPO superiores comparados aos grupos C (p□0,001) e ao grupo DM (p=0,015). Os níveis dessa enzima estavam mais elevados no grupo DP comparado ao grupo C (p=0,007) (tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Medianas e quartis (25-75%) dos parâmetros enzimáticos de SPO e MPO dos grupos no BASELINE

	DMDP (1) (n=31)	DP (2) (n=31)	DM (3) (n=31)	Controle (4) (n=31)	Valor de P
SPO (UPO/mg prot)	138859,10 (67326,56-248318,30)	59115,99 (21365,59-147202)	92496,78 (30580,18-145615,84)	26927,45 (12357,03-106458,13)	1≠4 p=0,001 1≠2 p=0,024
MPO (UMPO/µl fluido)	1893,27 (1256,52-4685,55)	2196,10 (1126,31-3725,74)	1202,73 (704,48-1957,81)	6,46 (2,01-751,11)	1≠4 p□0,001 1≠3 p=0,015 2≠4 p=0,007

DMDP: Grupo de pacientes com DM2 e DP; DP: Grupo de pacientes com DP e sistemicamente saudáveis; DM: Grupo de pacientes com DM2 e saudáveis periodontalmente; C: Grupo de pacientes saudáveis periodontalmente e sistemicamente. SPO: peroxidase salivar. MPO: Mieloperoxidade. Teste estatístico Tukey.

O tratamento periodontal foi significativamente eficaz na redução nos níveis de MPO em ambos os grupos com DP. No grupo DMDP a redução foi de 1893,27 para 1278,87 (p□0,004). No grupo DP a redução foi de 2196,10 para 1170,33 (p□0,02). Na comparação intergrupos, também foi encontrada diferenças significativas entre DMDP e DP (p□0,02) (tabela 5.7).

Tabela 5.7 - Medianas e quartis (25-75%) dos parâmetros enzimáticos de SPO e MPO dos grupos Antes e Após Tratamento Periodontal

		DMDP (n=31)	DP (n=31)	p**
SPO (UPO/mg prot)	**Antes**	138859,09 (67326,55-248318,26)	59115,98 (21365,59-147201,96)	p=0,024
	Após	102647,02 (77460,16-141444,40)	57368,89 (20229,16-130197,88)	p>0,7
	p*	p>0,5	p□0,005	
MPO (UMPO/µl fluido)	**Antes**	1893,27 (1256,52-4685,55)	2196,10 (1126,31-3725,74)	p>0,8
	Após	1278,87 (473,42-2765,91)	1170,33 (345,91-3070,01)	p□0,02
	p*	p□0,004	p□0,02	

DMDP: Grupo de pacientes com DM2 e DP; DP: Grupo de pacientes com DP e sistemicamente saudáveis. SPO: peroxidase salivar. MPO: Mieloperoxidade, *Teste estatístico Wilcoxon. ** Teste estatístico Mann-Whitney.

A diferença observada entre os parâmetros enzimáticos antes e após tratamento periodontal não se mostrou significativa na comparação intergrupos (tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Diferenças das reduções de SPO e MPO Antes e Após Tratamento Periodontal

		DMDP (n=31)	DP (n=31)	P
SPO (UPO/mg prot)	Mediana Quartis 25% e 75%	-14102,68 (-154469,84/31360,38)	-14356,46 (-75233,32/657313,37)	p>0,2
	Diferença % Quartis 25% e 75%	-10,60 (-58,12/81,82)	-56,91 (-72,92/496,90)	p>0,7
MPO (UMPO/µl fluido)	Mediana Quartis 25% e 75%	-831,95 (-1320,87/92,24)	-869,38 (-1583,79/-89,03)	p>0,7
	Diferença % Quartis 25% e 75%	-0,40 (-1,48/0,01)	-1,60 (-7,99/-0,30)	p>0,2

DMDP: Grupo de pacientes com DM2 e DP; DP: Grupo de pacientes com DP e sistemicamente saudáveis. SPO: peroxidase salivar. MPO: Mieloperoxidade. *Teste estatístico Mann-Whitney.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os níveis de MPO no FG e de SPO em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com periodontite crônica generalizada e comparou-os aos de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 com periodonto saudável, aos de pacientes saudáveis sistemicamente com periodontite crônica generalizada e a pacientes com periodonto saudável. E também se propôs a avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico nos níveis de MPO do fluido gengival e de SPO nos pacientes com periodontite crônica generalizada (DMDP e DP).

Os níveis de SPO nos pacientes diabéticos com periodontite crônica (DMDP) se mostraram mais elevados quando comparados aos pacientes sistemicamente saudáveis (DP e C). O fato de alguns pacientes portadores de DM2 apresentarem uma leve infecção nas glândulas parótidas e também pela tendência desses pacientes estarem mais dispostos a apresentarem infecções orais comparados a pacientes sistemicamente saudáveis podem justificar essa elevação dos níveis de SPO nesses pacientes, como observado por Dodds et al. (2000) que mostraram níveis de SPO estavam mais elevados em pacientes diabéticos tipo 2 e saudáveis periodontalmente com pobre controle metabólico.

Por outro lado, nossos resultados discordam daqueles observados por Gonçalves et al. (2008), na comparação entre os indivíduos diabéticos tipo 2 e indivíduos saudáveis sistemicamente ambos com DP (DMDP e DP), que não encontraram diferenças nos níveis de SPO no baseline e após 3 meses de tratamento.

Observadas as limitações de se comparar os resultados de trabalhos em diabéticos tipo 2 com aqueles realizados em pacientes com diabetes tipo 1, mas cientes da pouca disponibilidade de trabalhos para comparação de resultados acrescentamos as comparações que seguem.

Outros estudos também avaliaram os níveis de SPO em pacientes portadores de DM1. Guven et al. (1996) avaliaram a saliva de pacientes com DM1 comparados a indivíduos sistemicamente saudáveis e mostraram que os níveis de SPO nos DM1 estavam mais elevados. Entretanto, Tenovuo et al. (1986) não mostraram diferenças nos níveis de SPO nesses grupos de pacientes.

O tratamento periodontal foi efetivo e reduziu significativamente os níveis de SPO apenas no grupo DP (p□0,005), enquanto o grupo DMDP não apresentou reduções significativas (p>0,5). A redução dos níveis de SPO observada no grupo DP justifica-se pela redução da inflamação após tratamento periodontal e estão de acordo com os trabalhos realizados por Smith et al. (1984), o qual mostraram, em modelo de gengivite experimental, que os níveis de SPO diminuíram após a retomada da higiene oral e pelo estudo de Gonçalves et al. (2008) que também mostraram reduções significativas dos níveis de SPO nos pacientes com DP tratados periodontalmente. Já para o grupo DMDP a redução não significativa pode se justificar por características inerentes aos pacientes diabéticos como por exemplo inflamação crônica das glândulas salivares, predisposição a infecções orais oportunistas (*Candida albicans*) e defeitos nas funções neutrofílicas (fagocitose) (Ueta et al., 1993).

O fato de encontramos níveis elevados de SPO no grupo DMDP mesmo após o tratamento periodontal quando comparados aos pacientes sistemicamente saudáveis, sugere que sua atividade pode estar comprometida devido a hiperglicemia, a glicose pode estar modulando negativamente a atividade dessa enzima, como sugerido para a MPO, essa hipótese sugere que a presença de altas concentrações de glicose no plasma possa causar alterações na conformação molecular e/ou no sítio catalítico da enzima possivelmente decorrente da ação das AGE (Ahmed et al., 1997; Ashman et al., 2004).

Em relação aos níveis de MPO no FG, nosso estudo mostrou que nos pacientes com periodontite crônica (DMDP e DP) esses níveis se encontravam mais elevados, no baseline. Embora feitos em pacientes sistemicamente saudáveis, alguns estudos demonstraram que os níveis de MPO estavam mais elevados em sítios com periodontite (Wolff et al.,1988, 1997; Cao & Smith, 1989; Smith et al., 1992; Yamalik et al., 2000; Wei et al., 2004; Borges et al., 2007; Marcaccini et al.,

2010; Hernández et al., 2010). Os altos níveis de MPO encontrados nos grupos DMDP e DP chamam a atenção para o alerta feito por Wei et al. (2004) de que níveis elevados de MPO podem contribuir para a eficácia bactericida, mas por outro lado, podem aumentar a formação de ácido hipocloroso podendo ser destrutivo aos tecidos periodontais, pela inibição de algumas anti-proteases (Yamalik et al., 2000).

Wiersma et al. (2008) encontraram níveis de MPO mais altos nos pacientes com DM2, entretanto a análise foi realizada em plasma e não em FG. Ainda não há estudos na literatura que explicam claramente a relação entre MPO e diabetes mellitus, Okouchi et al. (2003) demonstrou que a aderência dos neutrófilos, avaliadas pela atividade de MPO *in vitro,* foi aumentada pelo tratamento com insulina e dessa forma os autores especulam que altos níveis de MPO no diabetes podem estar relacionados com a hiperinsulinemia.

Diferente dos nossos resultados Gonçalves et al. (2008) mostraram níveis menores de MPO nos indivíduos com DM2 e portadores de DP. Esses autores justificam seus resultados sugerindo a hipótese desses pacientes terem algum tipo de deficiência no mecanismo de defesa primária em resposta aos agentes agressivos. Diferenças na metodologia e na amostra poderiam justificar os diferentes resultados.

Embora em pacientes periodontalmente saudáveis, Sato et al. (1992) e Kemona et al. (1985) observaram uma diminuição na atividade da MPO no sangue de pacientes com pobre controle do DM, sugerindo que a melhora no controle metabólico não altera atividade enzimática. Lanza (1998) reportou que pacientes portadores de DM podem apresentar uma deficiência secundária de MPO.

O nosso estudo mostrou que o tratamento periodontal foi significativamente eficaz na redução dos níveis de MPO em ambos os grupos (DMDP e DP). Nossos resultados corroboram com outros estudos (Buchmann et al., 2002; Gonçalves et al., 2008; Marcaccini et al., 2010; Hernández et al., 2010).

Na comparação intergrupos, após o tratamento periodontal, o grupo DMDP mostrou níveis de MPO maiores do que o grupo DP ($p<0,02$). Isto ocorreu apesar do SS ter se mostrado menor para o grupo DMDP do que no DP após terapia

periodontal. Esses resultados podem ser justificados pelo fato dos pacientes diabéticos apresentarem algumas deficiências fisiológicas, incluindo diminuição da função imunológica e da resposta inflamatória (quimiotaxia, fagocitose e atividade microbicida) levando a uma susceptibilidade maior de infecções bacterianas e fúngicas (Hotamisligil, 2006), consequência da disfunção neutrofílica causada pela hiperglicemia (Kempf et al., 2007).

Nos grupos DMDP e DP o tratamento periodontal promoveu melhora significativa em todos os parâmetros clínicos estudados e também reduções no volume de FG corroborando com as reduções encontradas nos níveis de MPO e SPO. Essas reduções refletem a redução da inflamação associada à DP.

No baseline, os níveis de HbA1c no grupo DMDP estavam significativamente mais elevados comparados ao grupo DM. Essa diferença pode se justificar pelo fato dos pacientes do grupo DM serem saudáveis periodontalmente e pela conhecida associação da influência da doença periodontal no controle glicêmico do paciente diabético (Taylor et al., 1996). Houve reduções nos níveis de HbA1c no grupo DMDP após a terapia periodontal, embora não significativa estatisticamente, essa redução (0,4%HbA1c) após 1 mês da terapia, é muito importante para o paciente diabético do ponto de vista clínico, pois o valor de 7,5%HbA1c se aproxima ao nível recomendado pela ADA (7-6% HbA1c). Dos 31 pacientes do grupo DMDP avaliados em nosso estudo, 08 conseguiram reduzir a HbA1c para níveis abaixo de 7% HbA1c, após o tratamento periodontal. Nesses níveis ocorre uma redução importante das chances de complicações microvasculares e cardiovasculares, relacionadas com a alta morbidade e mortalidade nesses pacientes (Stratton et al., 2000).

A diferença observada entre os parâmetros enzimáticos antes e após tratamento periodontal não se mostrou significativa na comparação intergrupos como visto na tabela 5.8. Entretanto, nota-se valores semelhantes nas reduções dos níveis de SPO e MPO entre os grupos. O grupo DMDP apresentou a mesma ordem de grandeza na redução dos níveis de SPO do que o grupo DP, porém percentualmente essa redução se mostrou muito menor (DMDP: 10,6% e DP: 56,91%). O tratamento periodontal conseguiu reduzir os níveis de SPO de modo semelhante em ambos os grupos, mas por motivos inerentes aos pacientes

portadores de DM, como já discutidos anteriormente, os níveis de SPO continuaram mais elevados nesses pacientes.

Em relação à redução dos níveis de MPO entre os grupos, também foi verificada uma redução numérica similar entre os grupos e o mesmo se verificou percentualmente (DMDP: 0,40% e DP: 1,60%) revelando que o tratamento periodontal foi efetivo na redução de MPO no sulco gengival após o restabelecimento da saúde periodontal.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados é possível concluir que:

- A SPO apresentou níveis mais elevados nos grupos DMDP comparado ao grupo DP e ao grupo C.
- A MPO apresentou níveis mais elevados no grupo DMDP comparados aos grupos DM e C. E o grupo DP mostrou maiores níveis de MPO em comparação ao grupo C.
- O tratamento foi efetivo na melhora dos parâmetros clínicos periodontais, no volume do FG nos grupos DMDP e DP que se refletiu na redução dos níveis de SPO no grupo DP e de MPO nos grupos DMDP e DP.
- Após o tratamento periodontal, os níveis de MPO se mostraram maiores para o grupo DMDP comparados aos níveis observados no grupo DP.

REFERÊNCIAS[1]

AAP – American Academy of Periodontology 1999. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. Ann Periodontol. 1999; 4(1):i, p. 1-112.

ADA Data from the 2011 National Diabetes Fact Sheet (released Jan. 26, 2011). Centers for Disease Control and Prevention: National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States. Atlanta: U.S: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2011.

Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. Biochem J.1997 Jun 1;324 (Pt 2):565-70

Aras H, Cağlayan F, Güncü GN, Berberoğlu A, Kilinç K. Effect of systemically administered naproxen sodium on clinical parameters and myeloperoxidase and elastase-like activity levels in gingival crevicular fluid. J Periodontol. 2007.May;78(5):868-73.

Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. Periodontol 2000. 2004;34:109-19. Review.

Ashman RB, Farah CS, Wanasaengsakul S, Hu Y, Pang G, Clancy RL. Innate versus adaptive immunity in Candida albicans infection. Immunol Cell Biol. 2004.Apr;82(2):196-204.

Borges I Jr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Fröde TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. Mediators Inflamm. 2007:45794. doi: 10.1155/2007/45794.

Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. J Dent Res. 2005 Jan;84(1):9-20. Review.

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol. 1982 Mar;78(3):206-9.

Buchmann R, Hasilik A, Nunn ME, Van Dyke TE, Lange DE. PMN responses in chronic periodontal disease: evaluation by gingival crevicular fluid enzymes and elastase-alpha-1-proteinase inhibitor complex. J Clin Periodontol. 2002.Jun;29(6):563-72.

Cao CF, Smith QT. Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. J Clin Periodontol. 1989 Jan;16(1):17-20.

Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, Mosovich L, Genco RJ. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). J Am Dent Assoc. 1982 May;104(5):653-60.

de Souza Ferreira C, Araújo TH, Ângelo ML, Pennacchi PC, Okada SS, de Araújo Paula FB, Migliorini S, Rodrigues MR. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. Cell Biochem Funct. 2012 Oct;30(7):604-10.

Dodds MW, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. Community Dent Oral Epidemiol. 2000 Oct;28(5):373-81.

Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ; CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill,USA), Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), Roy Page (University of Washin. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. J Dent Res. 2012 Oct;91(10):914-20.

Geerts SO, Nys M, De MP, Charpentier J, Albert A, Legrand V, Rompen EH. Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. J Periodontol. 2002 Jan;73(1):73-8.

Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. J Periodontol. 1992 Apr;63(4 Suppl):338-55. Review.

Gonçalves D, Correa FO, Khalil NM, de Faria Oliveira OM, Orrico SR. The effect of non-surgical periodontal therapy on peroxidase activity in diabetic patients: a case-control pilot study. J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(9):799-806.

Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. Ann Periodontol. 1998 Jul;3(1):51-61. Review.

.
Gurav AN. Periodontitis and insulin resistance: casual or causal relationship? Diabetes Metab J. 2012 Dec;36(6):404-11.

Güven Y, Satman I, Dinççağ N, Alptekin S. Salivary peroxidase activity in whole saliva of patients with insulin-dependent (type-1) diabetes mellitus. J Clin Periodontol. 1996 Sep;23(9):879-81.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans. 2007 Nov;35(Pt 5):1147-50. Review.

Hernández M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mäntylä P, Rivera O, Dezerega A, Dutzan N, Sorsa T. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. J Periodontol. 2010.Nov;81(11):1644-52.

.
Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 2006 Dec 14;444(7121):860-7. Review.

Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T, Ueda S, Horiuchi. S. N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. Biochemistry. 1996; Jun; 35 (24): 8075-83.

Jentsch H, Sievert Y, Göcke R. Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment. J Clin Periodontol. 2004 Jul;31(7):511-4.

.Kemona H, Podkowicz K, Prokopowicz J. Cytochemical indices of leukocytes in patients with diabetes mellitus. Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch. 1985;112(1):197-202.

Kempf K, Rose B, Herder C, Haastert B, Fusbahn-Laufenburg A, Reifferscheid A, Scherbaum WA, Kolb H, Martin S. The metabolic syndrome sensitizes leukocytes for glucose-induced immune gene expression. J Mol Med (Berl). 2007 Apr;85(4):389-96.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol. 2005 May;77(5):598-625.

Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar;1098:216-29. Review.

Lang NP, Lindhe J, van der Velden U; European Workshop in Periodontology group D. Advances in the prevention of periodontitis. Group D consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. J Clin Periodontol. 2005;32 Suppl.6:291-3.

Lanza F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. J Mol Med (Berl). 1998 Sep;76(10):676-81. Review.

Lenox JA, Kopczyk RA. A clinical system for scoring a patient's oral hygiene performance. J Am Dent Assoc. 1973 Apr;86(4):849-52.

Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. Diabetes Care. 1993 Jan;16(1):329-34.

Marcaccini AM, Amato PA, Leão FV, Gerlach RF, Ferreira JT. Myeloperoxidase activity is increased in gingival crevicular fluid and whole saliva after fixed orthodontic appliance activation. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2010 Nov;138(5):613-6.

Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. J Am Dent Assoc. 1989 Aug;119(2):298-304.

Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. Compend Contin Educ Dent. 2000 Nov;21(11):943-6, 948, 950, passim; quiz 956. Review.

Mealey BL, Oates TW; American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. J Periodontol. 2006 Aug;77(8):1289-303. Review.

Ministério da Saúde -http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1457 em 26/03/2013. Brasil.

Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. Diabetes. 1996 Jul;45 Suppl 3:S67-72. Review.

Ohta Y, Kongo M, Kishikawa T. Melatonin exerts a therapeutic effect on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation. J Pineal Res. 2003.Mar;34(2):119-26

Okouchi M, Okayama N, Omi H, Imaeda K, Shimizu M, Fukutomi T, Itoh M. Cerivastatin ameliorates high insulin-enhanced neutrophil-endothelial cell adhesion and endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibiting mitogen-activated protein kinase activation. J Diabetes Complications.2003 Nov-Dec;17(6):380-6.

O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. J Periodontol.1972 Jan;43(1):38

Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. Ann Periodontol. 1996.Nov;1(1):1-36. Review.

Payne WA, Page RC, Ogilvie AL, Hall WB. Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. J Periodontal Res.1975 May;10(2):51-64.

Rüdin HJ, Overdiek HF, Rateitschak KH. Correlation between sulcus fluid rate and clinical and histological inflammation of the marginal gingiva. Helv Odontol Acta. 1970 Apr;14(1):21-6.

Sato N, Shimizu H, Suwa K, Shimomura Y, Kobayashi I, Mori M. MPO activity and generation of active O2 species in leukocytes from poorly controlled diabetic patients. Diabetes Care. 1992 Aug;15(8):1050-2.

Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D. RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. Diabetes. 1996 Jul;45 Suppl 3:S77-80. Review.

Serrano-Ríos M, Corbatón A. [Diabetes mellitus, heart failure and mortality].Med Clin (Barc). 2005 Jul 2;125(5):182-3.

Smith AJ, Smith G, Basu MK, Walsh TF. Changes in salivary peroxidase activity observed during experimentally-induced gingivitis. J Clin Periodontol. 1984.Jul;11(6):373-8.

Smith QT, Hinrichs JE, Melnyk RS. Gingival crevicular fluid myeloperoxidase at periodontitis sites. J Periodontal Res. 1986 Jan;21(1):45-55.

Smith QT, Au GS, Freese PL, Osborn JB, Stoltenberg JL. Five parameters of gingival crevicular fluid from eight surfaces in periodontal health and disease. J Periodontal Res. 1992 Sep;27(5):466-75.

Soskolne WA. Epidemiological and clinical aspects of periodontal diseases in diabetics. Ann Periodontol. 1998 Jul;3(1):3-12. Review.

Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. BMJ. 2000 Aug 12;321(7258):405-12.

Susin C, Haas AN, Valle PM, Oppermann RV, Albandar JM. Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in south.Brazil. J Clin Periodontol. 2011 Apr;38(4):326-33.

Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Periodontol. 1996 Oct;67(10 Suppl):1085-93.

Tenovuo J, Pruitt KM. Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. J Oral Pathol. 1984 Dec;13(6):573-84.

Tenovuo J, Lehtonen OP, Viikari J, Larjava H, Vilja P, Tuohimaa P. Immunoglobulins and innate antimicrobial factors in whole saliva of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. J Dent Res. 1986 Jan;65(1):62-6.

Thomas EL, Bates KP, Jefferson MM. Hypothiocyanite ion: detection of the antimicrobial agent in human saliva. J Dent Res. 1980 Sep;59(9):1466-72.

Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T. Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. J Oral Pathol Med. 1993 Apr;22(4):168-74.

Wei PF, Ho KY, Ho YP, Wu YM, Yang YH, Tsai CC. The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. J Periodontal Res. 2004 Oct;39(5):287-93.

Wiersma JJ, Meuwese MC, van Miert JN, Kastelein A, Tijssen JG, Piek JJ, Trip MD. Diabetes mellitus type 2 is associated with higher levels of myeloperoxidase.Med Sci Monit. 2008 Aug;14(8):CR406-10.

Wolff LF, Koller NJ, Smith QT, Mathur A, Aeppli D. Subgingival temperature:relation to gingival crevicular fluid enzymes, cytokines, and subgingival plaque micro-organisms. J Clin Periodontol. 1997 Dec;24(12):900-6.

Wolff LF, Smith QT, Snyder WK, Bedrick JA, Liljemark WF, Aeppli DA, Bandt CL. Relationship between lactate dehydrogenase and myeloperoxidase levels in human gingival crevicular fluid and clinical and microbial measurements. J Clin Periodontol. 1988 Feb;15(2):110-5.

Yamalik N, Cağlayan F, Kilinç K, Kilinç A, Tümer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. J Periodontol. 2000 Mar;71(3):460-7.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
1933

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Titulo da Pesquisa: Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com periodonto saudável e com periodontite crônica generalizada, antes e após tratamento periodontal.

1. Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal:
Nome:_____
N° do Documento de Identidade: _____
Sexo: M ( ) F ( ) Data de Nascimento: _____/_____ / _____
Endereço:_____
Bairro:_____ Cidade _____ Estado:____
CEP:_____ Telefone( )_____

2. Informações sobre a pesquisa científica:

Este documento contém informações sobre esta pesquisa, da qual o Sr. (a) poderá participar. Por favor, leia atentamente e, em caso de dúvidas, estaremos à sua disposição para esclarecimentos.

2.1. Objetivos da pesquisa

Esta pesquisa pretende verificar se o tratamento da sua gengiva traz melhoras para a sua condição, no que se diz respeito à Diabetes Tipo 2.

2.2. Benefícios ao paciente

A pesquisa dará ao Sr. (a) o diagnóstico de sua condição periodontal, além do tratamento odontológico, que deve resultar na melhora da sua saúde bucal.

2.3. O que será realizado no paciente

Após sua seleção e seu consentimento, devidamente assinado ao final deste termo, o Sr. (a) será encaminhado para a clínica de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da USP, localizada na Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, onde serão realizadas as consultas odontológicas, para o exame e tratamento periodontal, assim como a coleta de sangue. Serão realizados: exame gengival, que visa saber a condição de sua gengiva;

orientação de higiene bucal e o tratamento periodontal, que é a raspagem dos dentes para remover a placa e o tártaro acumulados. A raspagem será feita com anestesia local, se preciso. Iremos também recolher amostras de sangue e saliva antes e após o tratamento periodontal, para podermos analisar sua glicemia e outros valores que podem influenciar sua diabetes, e também iremos aferir sua pressão arterial. Em torno de 1 mês após o primeiro tratamento, iremos fazer um novo exame gengival, e, se preciso, iremos complementar o tratamento. A complementação do tratamento pode ser com apenas uma nova sessão de raspagem. Esses procedimentos são seguros e não provocam dano físico ou moral ao Sr. (a). Em caso de eventuais dúvidas relacionadas aos aspectos éticos da pesquisa, disponibilizamos o endereço do comitê de ética em pesquisa da UNIFESP: Rua Botucatu, 572- 1^0 andar - conj. 14-CEP 04023-062-São Paulo/ Brasil. Telefone: (11) 5571-1062/ (11) 5539-7162. E também do comitê de ética em pesquisa da FOUSP: Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, (11) 3091-7830.

2.4. Se houver necessidade de outro exame para diagnóstico?

Caso haja necessidade, os exames odontológicos e de sangue serão repetidos.

2.5. Compensação

Não há previsão de indenizações ou pagamentos aos pacientes, pois não existirão gastos ou riscos graves relacionados à pesquisa. Os procedimentos realizados farão parte de rotina de tratamento.

2.6. Garantias ao paciente

Como participante dessa pesquisa, o Sr. (a) terá acesso aos resultados obtidos e permitirá o acesso dos mesmos aos pesquisadores envolvidos e aos membros da Comissão de Ética. Os resultados desse trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, sendo a identidade do Sr. (a) sempre preservada. O Sr.(a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa. Além disso, o Sr. (a) terá direito à privacidade e todas as informações obtidas dos prontuários clínicos e ambulatoriais, permanecerão confidenciais, nos âmbitos da lei, assegurando a proteção de sua imagem e identidade. Está assegurada ao Sr.(a) a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, e de deixar de participar da pesquisa, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo. Caso seja necessário, o contato com os pesquisadores responsáveis poderá ser feito pelos telefones: Ana Paula Sassá Benedete (11)7138-3616 e Prof. Luiz Antônio P.A de Lima (11)3091-7833. Em caso de dano decorrente ao estudo, os pesquisadores responsáveis prestarão assistência integral ao paciente que sofreu o dano.

CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

Declaro que, tendo lido e compreendido o termo de informação e consentimento para a pesquisa clínica, concordo em participar deste estudo. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento, sem penalidades. Autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores para a publicação em revistas científicas e apresentação em Congressos. Recebi uma cópia do termo de informação para participar da pesquisa. Todas as páginas do termo de consentimento livre e esclarecido devem ser rubricadas pelo pesquisador principal e pelo paciente/responsável legal.

_____

Assinatura do Paciente

_____

Assinatura do Responsável Legal

_____

Assinatura do Pesquisador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

ANEXO B – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa - FOUSP

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 306536
Protocolo 152/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com periodonto saudável e com periodontite crônica generalizada, antes e após tratamento periodontal",** de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Ana Paula Sassá Benedete, sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a.) Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 08 de dezembro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO C – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 1 de julho de 2011.
CEP 0643/11

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) LUIZ ANTONIO PUGLIESI DE LIMA
Co-Investigadores: Sergio Atala Dib, Luiz A P Alves de Lima (orientador), Ana Paula Sassá Benedete
Disciplina/Departamento: Endocrinologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com periodonto saudável e com periodontite crônica generalizada, antes e após tratamento periodontal".**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção terapêutica.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.
OBJETIVOS: Avaliar a presença de biomarcadores relacionados com a doença periodontal na saliva e no fluido gengival de pacientes diabéticos do tipo 2 antes e após o tratamento periodontal não-cirúrgico..
RESUMO: Serão incluídos 30 pacientes portadores de Diabetes tipo 2 e com periodontite crônica generalizada, 30 pacientes portadores de Diabetes tipo 2 e periodontalmente saudáveis, 30 pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite crônica e 30 pacientes sistemicamente saudáveis sem periodontite. Todos os pacientes deverão apresentar idade entre 35 e 65 anos e no mínimo 15 dentes naturais. Serão incluidos pacientes portadores de diabetes tipo 2 por no mínimo 5 anos, com HbA1c > 7%. Os pacientes serão triados na clínica de Pós graduação da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da USP. Será realizada a coleta de sangue nesses pacientes no mesmo dia e hora das coletas de saliva e fluido gengival pelo serviço de coleta domiciliar do Laboratório Delboni Auriemo. Nos pacientes sistemicamente saudáveis será realizado teste de glicemia rápida para comprovar a glicemia que não poderá ser superior a 100mg/dL. Será realizado exame clínico periodontal. Os pacientes dos grupos controles que não apresentarem doença periodontal receberão profilaxia oral e orientações de higiene oral. Os pacientes portadores de periodontite crônica receberão tratamento periodontal não cirúrgico. Os pacientes receberão tratamento por um período de 4 semanas Será realizada coleta de saliva total, de fluido crevicular (FC) de 5 sítios sadios e 5 sítios doentes. Serão realizadas quantificações da atividade de MPO, peroxidação lipídica e atividade da arginase, na salivar e no FC. Serão determinados: atividade enzimática da peroxidase e status total antioxidante.Os pacientes serão triados no ambulatório de Diabetes da UNIFESP. A coleta das amostras de saliva, fluido e sangue bem como o tratamento periodontal serão obtidos da clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da FOUSP. O processamento e análise das amostras será realizado no Laboratório de Farmacologia do ICB-USP..
FUNDAMENTOS E RACIONAL: Fortes evidências revelam que a diabetes é um fator de risco para o aumento da severidade da gengivite e da periodontite. Nos sítios de periodontite, ocorrem inúmeras alterações tais como o

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

aumento da vascularização do tecido periodontal, metabolismo do colágeno, incluindo o aumento do fluxo do fluido crevicular gengival..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo, apresentando carta de aprovação do estudo no CEP- FOUSP.

TCLE: Apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R$ 8400,00.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **25/6/2012** e **25/6/2013**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0643/11

RECOMENDAÇÃO DO CEP: ENCAMINHAR APROVAÇÃO DA FAPESP ASSIM QUE FOR OBTIDA

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162