DANIELA YUMIE TAKAHASHI

Comportamento dos sistemas peroxidase e antioxidante, e produtos de peroxidação lipídica na saliva total de pacientes com diabetes mellitus 2 antes e após tratamento periodontal não cirúrgico

São Paulo

2015

DANIELA YUMIE TAKAHASHI

Comportamento dos sistemas peroxidase e antioxidante, e produtos de peroxidação lipídica na saliva total de pacientes com diabetes mellitus 2 antes e após tratamento periodontal não cirúrgico

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 Antônio Pugliesi Alves de Lima

São Paulo

2015

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Takahashi, Daniela Yumie.

Comportamento dos sistemas peroxidase e antioxidante, e produtos de peroxidação lipídica na saliva total de pacientes com diabetes mellitus 2 antes e após o tratamento periodontal não cirúrgico / Daniela Yumie Takahashi ; orientador Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima . -- São Paulo, 2015.

88 p. : 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. Diabetes mellitus não insulino-dependente.
2. Periodontite crônica.
3. Tratamento periodontal.
4. Superóxido dismutase.
5. Antioxidantes.
6. Peroxidase. I. Lima, Luiz Antônio Pugliesi Alves de. II. Título.

Takahashi DY. Comportamento dos sistemas peroxidase e antioxidante, e produtos de peroxidação lipídica na saliva total de pacientes com diabetes mellitus 2 antes e após tratamento periodontal não cirúrgico. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Dedico este trabalho...

à minha mãe, Yoshie, me deu todo o suporte no dia-a-dia para ter tornado tudo mais fácil para a realização deste sonho. Obrigada principalmente pela paciência e pelas palavras de conforto quando mais precisei...

ao meu pai, Hissao. Obrigada por ter acreditado e me apoiou nessa escolha que eu fiz e permitiu que eu pudesse concretizar esta conquista na minha carreira e na minha vida...

à minha pequena grande família que sempre se preocupa comigo, obrigada por tudo.
Vocês são tudo pra mim...

e por fim, à minha querida batian...pela inspiração de vida e por ter me impulsionado a correr atrás dos meus sonhos...amo você!!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos pacientes, muito obrigada pela participação e por confiarem neste estudo.

Ao meu orientador Prof. Luiz Lima, primeiramente obrigada por ter me aceitado como orientada. Agradeço muito pela oportunidade de ter trabalhado ao seu lado, sempre aprendendo com seu conhecimento de altíssimo nível. Aprendi muito com a sua humildade, bondade e paciência para ensinar.

Obrigada pelo apoio, por acreditar e confiar na minha capacidade.

Ao meu orientador de iniciação científica Prof. Mário Taba Júnior da minha antiga casa FORP, quem me acolheu e me introduziu à periodontia. Saiba que o admiro muito e sou profundamente agradecida pelo que me ensinou.

Ao Dr. Eduardo Sampaio e equipe de periodontia da APCD Vila Mariana. Agradeço por tudo que vocês me ensinaram, por terem feito parte da fase mais importante da minha carreira facilitando na minha decisão de seguir na área de periodontia.

À Ana Paula Sassá Bendete... Sou eternamente grata a oportunidade que foi me dada em trabalhar com você. Aprendi muito com a sua paciência, inteligência e bondade. Obrigada pelo acolhimento que você e o prof. Luiz me proporcionaram nessa linha de pesquisa tão linda que acabei me apaixonando. Quando entrei na pesquisa não sabia que ia encontrar alguém que fosse ser importante na minha vida, uma AMIGA. Foi muito gratificante conhecer você e sua linda família!!!

Ao meu namorado Willian N. Kaneko agradeço do fundo do coração pelas palavras de conforto nas horas de desabafo e tensão, e pelos conselhos durante toda essa jornada.

Obrigada pela compreensão, pelo apoio e principalmente pela paciência nesses últimos anos que significaram tanto na minha vida. Te amo muito!

Ao Rafael Takahashi, Letícia Kimura, Thainah, Rafaela e Caroline Kaneko Ishii, Kimiyo e Sérgio Kaneko. Obrigada por todo apoio e por terem tornado essa jornada mais leve e divertida.

Aos meus amigos Renan Okawara, Dayana M. Kayama, Cristine Ivanovski Sant'Anna, Laís Saito, Milena Elias, Iliana S. Ferraz, Maria Beatriz Carrazzone, Tony Yamashita, Eunice Fukuju, Maria Clara Ogushi e Eduardo Galduróz.

Obrigada pelos momentos de descontração, pela força e pela motivação.

À minha pequena grande família. Meus tios e tias, primos e primas que sempre me apoiaram, se preocuparam comigo. Agradeço todas as palavras de encorajamento e admiração. Vocês fizeram toda a diferença pra mim nesta jornada.

Obrigada de coração. Amo vocês!!!!

Aos meus colegas de mestrado, Ieda S. Abreu, Stefânia Possamai, Vanessa Almeida, Débora Massarente, Michele de Franco, Priscilla Vivas e Henrique Fukushima.

Vocês fizeram dessa jornada uma experiência inesquecível!

Eu tive muita sorte de participar desta turma muito querida que fez deste mestrado algo que sempre lembrarei com um sorriso no rosto.

Nunca vou esquecer os nossos momentos de cumplicidade.

Contem sempre comigo e MUITO OBRIGADA!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores do departamento de estomatologia, da disciplina de periodontia:

Prof. Dr. Claudio Mendes Pannuti, Profa. Dra. Cristina Villar, Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito, Prof. Dr. Giorgio De Micheli, Prof. Dr. João Batista Cesar Neto, Profa. Dra. Marinella Holzhausen, Profa. Dra. Luciana Saraiva de Campos, Prof. Dr. Marco Antônio Paupério Georgetti e Profa. Dra. Marina Clemente Conde.

Sou eternamente grata pelo conhecimento, inspiração, receptividade e oportunidade que adquiri ao longo do mestrado.

Aos colegas Caio Cremonini, Marcelo Sirolli, Carlos Eduardo Mafra, Rodrigo Santos, Mariana Rabelo, Mariana Rocha, Ecilene Rosa, Henrique Bueno, Hilana Artese, Verônica Carvalho, Adriana Foz, Rodrigo Nahás, Vanessa Tubero, Éder Martins e Lucas Macedo. Agradeço pelos momentos de descontração e aprendizado que acabaram fazendo toda a diferença nessa etapa tão importante da minha vida.

Às secretárias Márcia e Marília, obrigada pela atenção nas clínicas e na secretaria.

À minha banca de qualificação Profa. Dra. Marinella Holzhausen e Aliny Simões.
Obrigada pelas significantes contribuições que vocês

Ao Professor Fausto Mendes, que foi um anjo da guarda nos últimos momentos e realizou as análises estatísticas finais para este trabalho.

Não tenho nem palavras para descrever tamanha gratidão que tenho pelo senhor.

E finalmente, aos colaboradores deste estudo:

Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará, Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves, Profa. Dra. Marinella Holzhausen, Dra. Rogéria Gonçalves, Dra. Hilana Artese, Dra. Flávia Ibuki. Meus sinceros agradecimentos pelas valiosas contribuições que complementaram a minha formação durante esta jornada. Só tenho que agradecer com o aprendizado que obtive, e saibam que a minha admiração por todos só aumentou ao longo deste percurso.

RESUMO

Takahashi DY. Comportamento dos sistemas peroxidase e antioxidante, e produtos de peroxidação lipídica na saliva total de pacientes com diabetes mellitus 2 antes e após tratamento periodontal não cirúrgico [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

O estresse oxidativo (EO), fenômeno decorrente do desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou depleção antioxidante (AO), está envolvido na patogênese de diversas doenças e desordens, incluindo o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e a doença periodontal. Uma das consequências da geração excessiva das ERO é a destruição tecidual promovida pela peroxidação lipídica, e para combater estes efeitos deletérios, o organismo desenvolveu mecanismos de defesa, como os AO e peroxidases. **Objetivos:** Avaliar o comportamento dos marcadores de EO na saliva total (SALT) de pacientes com ou sem DM2, portadores ou não de periodontite crônica generalizada (PCG); e verificar e comparar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico (TPNC) sobre esses marcadores entre os pacientes. **Materiais e Métodos:** 121 pacientes participaram deste estudo e foram alocados em 4 grupos: diabéticos com PCG (DMPC), diabéticos sem PCG (DM), pacientes sistemicamente saudáveis com PCG (PC) e pacientes sistemicamente saudáveis e sem periodontite (C). Os índices de Placa (IP), nível clínico de inserção (NCI), profundidade clínica de sondagem (PCS) e sangramento à sondagem (SS) foram coletados para a avaliação dos parâmetros clínicos periodontais. Foram também coletadas amostras de sangue periférico e SALT para analisar respectivamente a hemoglobina glicada (HbA_{1c}) e os marcadores de EO, superóxido dismutase (SOD), estado total de antioxidante (TAS) e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e peroxidase salivar (SPO). As coletas foram realizadas no baseline e após 30 dias do tratamento, previamente à avaliação e reavaliação clínica. Os pacientes DMPC e PC passaram por TPNC, e os DM e C, receberam apenas orientação de higiene oral e profilaxia. **Resultados:** No baseline, os grupos DMPC e PC apresentaram valores significativamente maiores dos parâmetros clínicos PCS, SS, IP e NCI quando comparados aos grupos DM e C ($p < 0.05$). Após o TPNC, todos esses parâmetros mostraram melhoras significativas ($p < 0,05$). A

HbA1c foi significativamente maior no grupo DMPC quando comparado com DM no baseline ($p<0,05$), no entanto, o TPNC não promoveu melhora significativa após 1 e 3 meses de acompanhamento glicêmico, ainda que, a redução percentual (0,4%) observada possa ser considerada importante. Quanto aos marcadores, no grupo DMPC os valores de TBARS foram significativamente menores comparados aos grupos DM, PC e C ($p<0.05$), e os de SPO foi significativamente maior em relação aos grupos PC e C ($p<0.05$), com correlação negativa entre TBARS e SPO ($r=-0.35$; $p=0.002$), enquanto que os valores de TAS e SOD não mostraram diferenças significativas entre os grupos estudados ($p>0.05$). Após o TPNC, os níveis de TBARS aumentaram significativamente, e os de SPO diminuíram significativamente apenas no grupo DMPC ($p<0.05$ e $p<0.05$), ao passo que os valores de SOD e TAS permaneceram inalterados nos dois grupos. **Conclusão:** No baseline, os valores de TBARS e de SPO estiveram alterados nos pacientes DMPC com resultados que mostram correlação inversa entre TBARS/SPO, e após o TPNC houve nova alteração. O comportamento dos marcadores de EO na saliva mostrou a busca pelo ponto de equilíbrio por diversas vias e que este pode ser alterado pelo uso de medicamentos, como a metformina.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 2. Periodontite crônica. Tratamento. Superóxido dismutase. Antioxidantes. Peroxidase. TBARS. Peroxidação lipídica.

ABSTRACT

Takahashi DY. Peroxidase and antioxidant systems and lipid peroxidation products behavior in type 2 diabetes mellitus patients whole saliva before and after periodontal treatment [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Oxidative stress (OS), resulting phenomenon from reactive oxidative species (ROS) and/or antioxidant (AO) depletion imbalance, is involved in many diseases and disorders pathogenesis, including type 2 diabetes mellitus (T2DM) and periodontal disease. One of the ROS excessive generation consequences is the tissue destruction promoted by lipid peroxidation. To strike ROS deleterious effects, the organism developed several defense mechanisms, such as AO and peroxidase systems. **Objectives:** To evaluate the OS markers behavior in whole saliva (WS) of patients who has or not T2DM, with or without generalized chronic periodontitis (GCP); and to verify and to compare non-surgical periodontal treatment (NSPT) effect on these markers. **Material and Methods:** 121 patients participated of this study and were allocated in 4 groups: diabetics with chronic periodontitis (DMPC), diabetics periodontally healthy (DM), sistemically healthy with chronic periodontitis (PC) and sistemically and periodontally healthy patients (C). Plaque index (PI), clinical attachment level (CAL), probing depth (PD) and bleeding on probing (BOP) were collected for periodontal clinical paramethers. Peripheral blood and WS samples were collected respectively for glycated hemoglobin (HbA1c) and OS markers, such as superoxide dismutase (SOD), total antioxidant status (TAS), thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) and salivary peroxidase (SPO), assessment. Collections were performed at baseline and 30 days after treatment, previously to clinical evaluation and reevaluation. GCP patients (DMPC and PC) were submitted to NSPT, and those with periodontal health (DM and C) received oral hygiene instructions and prophylaxys only. **Results:** At baseline, DMPC and PC patients showed PD, BOP, PI and CAL higher levels when compared to DM and C groups ($p<0.05$). After NSPT, all these clinical parameters had significant improvement ($p<0.05$) in both groups. HbA1c medians were significantly higher in DMPC when compared to DM, at baseline, however, the NSPT did not improved

after 1 and 3 months of glycemetic control, though percentual reduction (0.4%) observed at clinical point of view might be considered important. As to laboratorial analysis, in DMPC group, TBARS levels were significantly decreased compared to DM, PC and C ($p<0.05$), and SPO activity were significantly higher than PC and C ($p<0.05$), with negative correlation between TBARS and SPO ($r=-0.35$; $p=0.002$), while TAS levels and SOD activity did not show any significant differences among studied groups ($p>0.05$). After NSPT, TBARS levels increased significantly, and SPO decreased significantly only in DMPC group ($p<0.05$ and $p<0.05$), whereas SOD and TAS values remained unchanged in DMPC and PC groups. **Conclusion:** At baseline, TBARS levels and SPO activity have been altered in DMPC patients and with results that showed inverse correlation between TBARS/SPO, and after NSPT, another modification occurred. OS markers levels behavior in WS showed a search for balance and this might be changed by medication use, as metformin.

Keywords: Type 2 diabetes. Chronic periodontitis. Treatment. Superoxide dismutase. Antioxidants. Peroxidase. TBARS. Lipid peroxidation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Periodontologia
ABTS	2,2'- Azino-di-[3-etilbenztiazolina sulfonado]
AGE	produtos finais de glicação avançada
AMPK	AMP kinase
AO	antioxidantes
BHT	butil hidroxitolueno
CAT	catalase
CEP	comitê de ética em pesquisa
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus tipo 1
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	doença periodontal
e.m.p	erro médio percentual
e.p.m	erro padrão de medida
EO	estresse oxidativo
ERO	espécies reativas de oxigênio
FG	fluido gengival
<i>Fn</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GSH	glutathione
GSHPx	glutathione peroxidase
HbA1c	hemoglobina glicada
IDF	Federação Internacional do Diabetes
IHO	instrução de higiene oral
IL	interleucina
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio cloridrato
IP	índice de placa
LDL	colesterol de baixa densidade
LPO	peroxidação lipídica

MDA	malondialdeído
MET	metformina
MPO	mieloperoxidase
NCI	nível clínico de inserção
NF-kB	fator de transcrição nuclear kappa B
Nrf2	fator nuclear relacionado ao NF-2
PC	periodontite crônica
PCS	profundidade clínica de sondagem
PKC	proteína kinase C
PO	peroxidase
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
RAGE	receptores de produtos finais de glicação avançada
SALT	saliva total
SAO	sistema antioxidante
SPO	peroxidase salivar
SPS	sistema peroxidase
SS	sangramento à sondagem
TAC	capacidade total antioxidante
TAS	estado/status total antioxidante
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TPNC	tratamento periodontal não-cirúrgico
UKPDS	estudo prospectivo de diabetes do Reino Unido
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{O}_2^{\bullet-}$	ânion superóxido
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
OH^-	ânion hidroxila
SCN^-	íon tiocianato
%	porcentagem
mm	milímetros
β	beta
k	kappa
α	alfa
Cu	cobre
Zn	zinco
Mn.	manganês
HOCl	ácido hipocloroso
$\pm$	mais ou menos
mg	miligrama
dL	decilitro
$\geq$	maior ou igual
$\leq$	menor ou igual
+	mais
>	maior
min	minuto/minutos
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
rpm	rotação por minuto
μL	micro litro
g	gramas
mL	mililitro
μg	micrograma
L	litro
N	Newton
nm	nanômetro

pH	potencial hidrogeniônico
mM/mmol	milimol
s	segundos
U	unidade
nM/nmol	nanomol
μ M/ μ mol	micromol
M	mol
cm	centímetro
Δ	delta
t	tempo
<	menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 PERIODONTITE CRÔNICA.....	19
2.2 O DIABETES MELLITUS TIPO 2	20
2.3 O DIABETES MELLUTUS E A DOENÇA PERIODONTAL	21
2.3.1 Diabetes mellitus influenciando a doença periodontal.....	22
2.3.2 Doença periodontal influenciando o diabetes mellitus.....	22
2.4 O ESTRESSE OXIDATIVO, A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E O SISTEMA ANTIOXIDANTE	24
2.5 SALIVA E O SISTEMA PEROXIDASE.....	26
3 PROPOSIÇÃO.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.2 TRIAGEM.....	30
4.3 TAMANHO DA AMOSTRA.....	30
4.4 GRUPOS.....	30
4.5 PAREMENTO.....	31
4.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	31
4.7 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	32
4.8 AVALIAÇÃO PERIODONTAL.....	33
4.9 CALIBRAÇÃO DO EXAMINADOR.....	33
4.10 TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICO.....	34
4.11 REAVALIAÇÃO PERIODONTAL.....	35
4.12 COLETA DAS AMOSTRAS.....	35
4.13 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	36
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39

5 RESULTADOS.....	41
5.1 RESULTADOS DEMOGRÁFICOS.....	41
5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE TRANSVERSAL.....	42
5.3 RESULTADOS DA ANÁLISE LONGITUDINAL.....	46
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE.....	83
ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

A periodontite crônica (PC) é uma doença periodontal (DP) que representa o estado de inflamação crônica não-reversível das estruturas de suporte dental que, quando não tratada, progride para a destruição do osso alveolar, causando mobilidade e subsequente perda dental (Offenbacher, 1996). Evidências clínicas relatam que a susceptibilidade da periodontite é aproximadamente três vezes maior em indivíduos com diabetes (Mealey; Oates, 2006). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença crônica inflamatória decorrente da resistência à insulina e é o fator de risco mais importante para a periodontite, sendo o controle glicêmico fator chave para determinar o aumento deste risco (Preshaw et al., 2012). A patogenia de ambas as doenças tem sido associada ao estresse oxidativo (EO).

A geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais de oxigênio tais como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion hidroxila (OH^-), resulta no fenômeno EO, que está envolvido na patogênese de mais de 100 doenças, como sua causa ou consequência (Gutteridge, 1993). Entre elas estão a artrite reumatóide, AIDS, câncer, diabetes mellitus (DM) e mais recentemente, a periodontite (Chapple, 1997). O EO leva à peroxidação lipídica (LPO) e consequente danos à integridade celular (Wei et al., 2010), e, para neutralizar seus efeitos deletérios, o organismo desenvolveu a habilidade de eliminar as EROs e radicais livres através da ação de antioxidantes (AO) enzimáticos e não-enzimáticos (Kim et al., 2010), tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), entre outros, que podem ser encontrados em tecidos e fluidos corporais, como a gengiva, fluido gengival (FG) e saliva (Jacoby; Davies, 1991; Brock et al., 2004).

Outro mecanismo de defesa existente, além do sistema AO (SAO), é o sistema de peroxidase salivar (SPS), que consiste em enzimas peroxidases, como peroxidase salivar (SPO) e mieloperoxidase (MPO), de H_2O_2 e íon tiocianato (SCN^-) (Tenovuo; Pruitt, 1984). Além de proteger contra o acúmulo tóxico de H_2O_2 , o SPS gera produtos que regulam o crescimento e metabolismo de bactérias, fungos e vírus, e inativam compostos mutagênicos e carcinogênicos (Tenovuo; Pruitt, 1984).

Recentemente especial atenção tem sido focada no papel das EROs, SPS e SAO, e produtos da LPO na patologia de doenças crônicas como na periodontite e na DM. Baynes e Thorpe (1999), Giugliano et al. (1996) e Reznick et al. (2006)

verificaram uma forte influência do EO na DM, enquanto que Panjamurthy et al. (2005), Tsai et al. (2005), Akalin et al. (2007) e Guentsch et al. (2008) mostraram que os produtos de LPO e a capacidade ou estado total AO (TAC ou TAS) desempenham um papel importante na progressão da periodontite. A possível associação entre o estado comprometido dos AOs na saliva (Sculley; Langley-Evans, 2003), o aumento dos danos oxidativos em pacientes com periodontite (Canakci et al., 2007; Brock et al., 2004; Chapple et al., 2007), a maior liberação de $O_2^{\bullet-}$ pelos neutrófilos em indivíduos diabéticos pobremente controlados (Karima et al., 2005), entre outros achados (Akalin et al., 2005), são alguns indícios que confirmam o reconhecimento do papel do EO e seus produtos sobre os mecanismos patológicos do DM e da periodontite.

A melhora das condições clínicas periodontais é resultante do tratamento periodontal não-cirúrgico (TPNC), que, além de exercer efeitos benéficos influenciando positivamente o controle metabólico de pacientes diabéticos com PC (Faria-Almeida et al., 2006; Navarro-Sanchez et al., 2007), tem mostrado diminuir os níveis de LPO e atividade do SPS em pacientes diabéticos e sistemicamente saudáveis com PC (Sonoki et al., 2006; Gonçalves et al., 2008; Wei et al., 2010), além de aumentar a capacidade de defesa AO nesses pacientes (Wei et al., 2010; Akpinar et al., 2013; Novakovic et al., 2014).

Um dos veículos biológicos mais estudados para auxiliar no diagnóstico de doenças sistêmicas é a saliva. A saliva total (SALT) é constituída de FG, células imunes e metabólitos teciduais (Navazesh, 1993; Kaufman; Lamster, 2000), e sua análise pode ser relevante, pois pode refletir e representar as condições intra-orais mais rigorosamente. Pode ser especialmente benéfica na determinação tanto do estado quanto da progressão da doença, por meio da busca por biomarcadores que possam melhor caracterizar esta doença (Taba et al., 2005). Além disso, evidências têm buscado mostrar que a SALT também pode ser um meio de auxílio no diagnóstico, na determinação de um perfil, e no diagnóstico de doenças como o DM2 e a DP através desses biomarcadores. Assim, seria interessante avaliar o comportamento dos biomarcadores de EO relacionados com a DP na SALT de pacientes com DM2 antes e após o TPNC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O EO, fenômeno causado pelo distúrbio do equilíbrio entre a geração ERO e AO em favor dos oxidantes, danifica o organismo após exposição a altas concentrações de ERO e/ou abatimento do SAO (Sies, 1991), e tem sido relacionado a diversas patologias como a periodontite crônica (Akalin et al., 2005; Chapple et al., 1997; Trivedi et al., 2014) e ao DM e suas complicações (Seghrouchini et al., 2002; Giacco; Brownlee, 2010).

2.1 PERIODONTITE CRÔNICA

As DPs, doenças crônicas mais comuns da cavidade oral dos seres humanos (Mealey; Oates, 2006), compreendem um grupo de condições inflamatórias que afetam as estruturas de suporte da dentição, como a gengiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, e seu principal agente etiológico é o biofilme periodontopatogênico (Armitage, 1999). A PC consiste na inflamação crônica dos tecidos de sustentação do dente, resultando na perda de fibras colágenas e inserção da superfície da raiz, formação de bolsas periodontais profundas e reabsorção do osso alveolar, que, se não tratada, leva à mobilidade e subsequente perda do dente (Offenbacher, 1996; Preshaw et al., 2012).

A prevalência das DPs varia significativamente em diferentes regiões do mundo e há indícios de que pode ser mais prevalente em nações em desenvolvimento do que nas mais desenvolvidas (Albandar, 2002; Albandar; Rams, 2002), nas quais aproximadamente 50% dos adultos e mais de 60% de indivíduos com mais de 65 anos apresentam periodontite severa, impactando 10% a 15% da população total (Chapple et al., 2013). Um estudo que avaliou a perda de inserção numa população brasileira mostrou que de três a cada quatro indivíduos com mais de 30 anos, possuem pelo menos um dente com perda de inserção maior ou igual a 5 mm (Susin et al., 2004). Já nos Estados Unidos no período de 2009-2010, sua

prevalência foi de 47,2% (cerca de 64.7 milhões de adultos acima de 30 anos) (Eke et al., 2012).

Tanto a manifestação quanto a progressão da PC são influenciadas por diversos fatores como resposta imune comprometida, fatores sociais e comportamentais (fumo e deficiências nutricionais), sistêmicos (DM, osteoporose), genéticos (síndromes e polimorfismos), anatômicos, composição da placa bacteriana e medicações que causem o crescimento gengival (bloqueadores de cálcio, fenitoína, ciclosporina) (Pihlstrom, 2001; Nunn, 2003). A maior parte da destruição tecidual é causada indiretamente pela resposta do hospedeiro (Van Dyke et al., 1993) à produção local de mediadores pró-inflamatórias estimuladas por bactérias anaeróbicas Gram-negativas do biofilme subgengival, como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn), e seus produtos (Lilgenberg et al., 1994; Van Dyke; Serhan, 2003). A resposta inflamatória a essas bactérias envolve a geração de radicais de oxigênio, como o $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^- , liberados por leucócitos polimorfonucleares (PMN) durante a fagocitose (Gustafsson; Asman, 1996; Katsuragi et al., 2003).

2.2 O DIABETES MELLITUS TIPO 2

O DM compreende um grupo de desordens heterogêneas caracterizadas pela alteração da tolerância à glicose e do metabolismo de lipídios e carboidratos, o qual está associado com um grande número de complicações vasculares resultantes da hiperglicemia (Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993), comprometendo vários órgãos como o coração, olhos, rins, nervos e sistema macro e microvascular no longo prazo (Mokdad et al., 2001; Mealey; Oates, 2006). A hiperglicemia aparece gradualmente com ausência de sinais ou sintomas, e por isso os diabéticos podem permanecer não-diagnosticados por muitos anos (DeFronzo; Ferrannini, 1991). O diagnóstico precoce melhora as chances de prevenir danos e custos decorrentes das complicações do DM (Federação Internacional do Diabetes, IDF, 2013), sendo o teste de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) o mais empregado para monitorar o controle glicêmico geral (ADA, 2003; Virtue et al., 2004).

Segundo a Federação Internacional do Diabetes (IDF) de 2015, há cerca de 387 milhões de pessoas no mundo que vivem com DM, sendo que na América Central e América do Sul a prevalência foi de 8.1%. Um dado alarmante sobre este estudo do IDF (2015) é que a cada 7 segundos, uma pessoa morre em decorrência dessa doença e/ou suas complicações, e, apenas em 2014, houve 4.9 milhões mortes.

Este aumento está diretamente associado com crescimento da taxa de obesidade na população, considerando que a população mundial está se tornando mais velha, e ao mesmo tempo mais obesa devido ao estilo de vida sedentário (Mealey; Oates, 2006; IDF, 2013).

As duas principais formas do diabetes, tipo 1 (DM1) e tipo 2, dividem diversas co-morbidades, mas são caracterizadas por possuírem etiologias distintas. O DM1, o tipo mais prevalente em crianças e adolescentes, ocorre quando as células- β do pâncreas são destruídas e uma quantidade insuficiente de insulina é produzida, sendo na maioria dos casos resultado de uma inflamação autoimune com destruição e apoptose das células- β (Donath; Halban, 2004). O DM2 se desenvolve através da resistência à insulina produzida endogenamente nas células-alvo (ADA, 2005), ou através de anormalidades na via de sinalização da insulina (DeFronzo, 1992). A alta prevalência do DM2 não só é dependente da idade do indivíduo, mas também tem sido diretamente relacionada com o aumento da quantidade de tecido adiposo visceral, que é visto como regulador de hormônios de onde moléculas metabolicamente ativas são liberadas inibindo a habilidade de resposta à insulina (Graves et al., 2007).

2.3 O DIABETES MELLITUS E A DOENÇA PERIODONTAL

O DM tem sido inequivocadamente confirmado como o principal fator de risco para periodontite e está entre os fatores e indicadores de risco associados com a ocorrência das formas mais destrutivas das DPs, a periodontite (Preshaw et al., 2012).

2.3.1 Diabetes mellitus influenciando a doença periodontal

A literatura atual mostra que a atividade das células imunes ou PMN, como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, apresentam-se alteradas pela hiperglicemia em pacientes diabéticos (AAP, 1999a) nos quais há um comprometimento da aderência neutrofílica, da quimiotaxia e fagocitose (Alba-Loureiro et al., 2007), e também aumento da apoptose em resposta a infecção por *Pg* (He et al., 2004; Liu et al., 2004; Liu et al., 2006).

A hiperglicemia crônica também ativa o mecanismo da proteína kinase c (PKC) fazendo com que os leucócitos fagocíticos liberem maior quantidade de $O_2^{\bullet-}$ quando comparados com célula normais (Karima et al., 2005). Quando a glicose reage com proteínas, resulta na formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE), afetando diretamente a função de proteínas, ou, indiretamente através da sua ligação com seu receptor de membrana de AGE (RAGE). A interação AGE-RAGE nos tecidos periodontais aumenta o EO celular através da geração de ERO resultando na ativação do fator de transcrição nuclear k-B (NF-kB) (Lander et al., 1997), que vai alterar o fenótipo dos monócitos/macrófagos, ocasionando no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fatores de necrose tumoral- α (TNF- α) (Paques et al., 1997; Lalla et al., 2001). Desta maneira, a quimiotaxia prejudicada de PMN no diabético pode influenciar na severidade da destruição periodontal (Manouchehr-Pour et al., 1981). Apesar da diminuição da função neutrofílica, os monócitos/macrófagos podem apresentar uma super-regulação na resposta aos antígenos bacterianos, resultando no aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α (Salvi et al., 1997; Naguib et al., 2004) e ERO como o $O_2^{\bullet-}$ (Katsuragi et al., 2003; Matthews et al., 2007).

2.3.2 Doença periodontal influenciando o diabetes mellitus

As DP's podem ter um grande impacto no estado metabólico no diabético, podendo aumentar o risco de piora no controle glicêmico no longo do tempo (Taylor

et al., 1996), contribuir para o aparecimento de outras doenças altamente prevalentes em diabéticos como a aterosclerose e doenças cardiovasculares (Saremi et al., 2005), além de poder também induzir ou perpetuar um estado crônico-inflamatório sistêmico elevado (Loos, 2005). A obesidade, um dos maiores fatores de risco do DM, altera as funções metabólicas e endócrinas do tecido adiposo (Fernandez-Real et al., 2003). O tecido adiposo produz hormônios como leptinas, resistinas e adiponectina que participam de várias funções metabólicas, como na sensibilidade à insulina (Ronti et al., 2006) e na liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-6, exacerbando a resistência à insulina (Mohamed-Ali et al., 1997).

A resistência à insulina pode se elevar na presença de infecções bacterianas ou virais em pessoas sem DM, podendo persistir por semanas ou meses até a saúde ser restabelecida. A bolsa periodontal é um sítio de ferida bacteriana persistente, e como a hiperglicemia também reflete no FG, pode impedir diretamente a capacidade de cicatrização da ferida dos fibroblastos no periodonto (Mealey; Oates, 2006). Consequentemente ocorre a inibição da inserção e alastramento das células responsáveis pela cicatrização e turnover tecidual normal (Ficara et al., 1975; Nishimura et al., 1998). As infecções por bactérias periodontais Gram-negativas também podem aumentar a resistência à insulina, e quando estas condições acontecem em um indivíduo com DM já estabelecido, o controle glicêmico pode se agravar (Sammalkorpi, 1989; Genco et al., 2005). Entretanto, estudos clínicos mostraram que o tratamento periodontal pode reduzir a inflamação e restaurar a sensibilidade à insulina, melhorando o controle metabólico (Miller et al., 1992; Grossi et al., 1997; Rodrigues et al., 2003).

A interação desses mecanismos no diabético com uma DP pré-existente fornece uma compreensão da destruição periodontal exacerbada neste paciente, e também pode explicar o motivo de terem maior risco para periodontite.

2.4 O ESTRESSE OXIDATIVO, A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E O SISTEMA ANTIOXIDANTE

O metabolismo aeróbico normoreativo é caracterizado pela formação estável das EROs (Sies, 1991), um termo coletivo usado para elementos não apenas radicais de oxigênio como o $O_2^{\bullet-}$ e ânion OH^- , mas também alguns derivados de oxigênio que não contém elétrons não pareados, tais como H_2O_2 e ácido hipocloroso (HOCl) (Halliwell; Cross, 1994). Mecanismos como vazamento de elétrons da cadeia de transporte da mitocôndria, doação de elétrons por enzimas, reações de auto-oxidação (Gutteridge; Halliwell, 1989; Fridovich, 1989; Imlay; Fridovich, 1991) e produtos da fagocitose como parte da resposta inflamatória, podem gerar as EROs (Babior; Woodman, 1990). A geração equilibrada entre ERO e AO é indispensável nos processos biológicos e bioquímicos do organismo, tais como na sinalização intracelular, diferenciação celular, controle de crescimento, apoptoses, e sistema imune (Roberts; Sindhu, 2009). Quando este equilíbrio é rompido, ocorre o EO, que foi definido por Sies (1991) como 'distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante a favor do primeiro, levando a prejuízos potenciais'.

Os danos oxidativos aparecem após a exposição relativa às altas concentrações de EROs e/ou diminuição da geração de AO (Sies, 1991). As células desenvolveram diversos mecanismos de defesa para neutralizar as EROs, remover os oxidantes prejudiciais e combater seus danos (Halliwell; Gutteridge, 1990; Chapple, 1997), como o SAO. O termo AO foi definido por Halliwell e Gutteridge (1990) como 'qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com aquele de um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato' (Gutteridge; Halliwell, 1989). e está presente em todos os fluidos e tecidos do corpo (Chapple, 1996).

O SAO e ERO agem em conjunto e, analisando-se apenas um AO isoladamente dos outros, além de dispendioso, fornece uma visão incompleta do quadro geral do indivíduo ou população. O método de análise da TAC ou TAS tem sido utilizada como uma referência do estado de defesa e EO no organismo (Griffiths et al., 2002). Estudos anteriores que investigaram indivíduos sistemicamente saudáveis com PC observaram resultados contraditórios, como a diminuição (Chapple et al; 1997), o aumento (Su et al., 2009) ou inalteração (Moore et al., 1994;

Brock et al., 2004) dos níveis de TAS/TAC nesses pacientes. Dentre os estudos com indivíduos portadores de DM2, concordando com Pendyala et al. (2013) que verificaram níveis aumentados de EO salivar nos diabéticos que levou a depleção da TAC, Allen et al. (2011) também verificaram níveis reduzidos de AO em indivíduos portadores de DM2 e PC, enquanto que Zloczower et al. (2007) verificaram um aumento geral de AO em indivíduos com DM2.

O $O_2^{\bullet-}$ é uma ERO que atua como um agente oxidante primário, presente em todos os organismos vivos, e é removido espontaneamente dos tecidos pela dismutação, catalisada pela enzima SOD, formando H_2O_2 e O_2 (McCord; Fridovich, 1969). A SOD é uma enzima AO intra e extracelular que responde prontamente ao EO agindo como sistema de defesa celular endógeno juntamente com outros AO (Halliwell; Gutteridge, 1990; McCord, 1993; Waddington et al., 2000). A SOD pode ser caracterizada de acordo com seu local de origem, representada pela SOD-Cu e SOD-Zn no citosol, SOD-Mn na mitocôndria e SOD-Cu e SOD-Zn extracelular (Halliwell, 1996; Fridovich, 1997). A SOD também foi localizada dentro do ligamento periodontal humano e pode representar um mecanismo de defesa importante dentro das células gengivais contra a liberação de $O_2^{\bullet-}$ (Jacoby; Davis, 1991).

O H_2O_2 é um oxidante fraco com muitas funções fisiológicas e é gerado após a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD, possuindo um grande potencial destruidor devido à sua habilidade de atravessar membranas celulares (Gutteridge; Halliwell, 1989). Depois de formado, o H_2O_2 pode ser convertido posteriormente em água pela via da catalase, ou pode sofrer a reação de Fenton, que resulta na formação do ânion OH^- a partir da presença de metais de transição (Chapple, 1997). O ânion OH^- é o oxidante mais reativo conhecido e possui diversos mecanismos de destruição, como a quebra da fita de DNA, que leva a mutações gênicas, e morte celular (Cochrane, 1991). Pode também estimular a reação de LPO, que ocorre quando a geração de ânions OH^- próxima a membrana fosfolipídica celular ataca a cadeia lipídica, formando radicais intermediários, como radical peroxil, H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos (Chapple, 1997). O acúmulo desses hidroperóxidos pode romper a membrana ou formar aldeídos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), levando a abertura dos poros intracelulares e por fim, a morte celular (Halliwell, 1991; Chapple, 1997). A LPO celular desempenha um papel importante no envelhecimento, aterosclerose, e complicações do DM (Lodovici et al., 2009). Seus produtos podem ser mensurados através da determinação do MDA, cujo teste mais comum para sua

avaliação é a detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Rumley; Paterson, 1998).

A mensuração de TBARS é comumente utilizada como marcador de EO; são formadas de produtos durante a oxidação de ácidos graxos insaturados, pelo ataque de EROs. Foram encontrados níveis elevados de TBARS em indivíduos diabéticos (Greismacher et al., 1995), assim como foram também associados com a DP quando mensurados diretamente nos tecidos gengivais (Tuter et al., 2001). Esse mesmo marcador também foi detectado na saliva onde níveis maiores de TBARS foram encontrados em indivíduos com periodontite (Trivedi et al., 2014).

Maior atividade de SOD, CAT e glutathione peroxidase (GSHPx) foi verificada no plasma, na gengiva e em eritrócitos nos indivíduos com PC devido a geração excessiva de TBARS nos sítios inflamados (Panjamurthy et al., 2005). A LPO aumentada também foi encontrada na região periodontal/bolsa, ou seja, no fluido gengival (FG), no plasma e na saliva de indivíduos com PC (Tsai et al., 2005; Akalin et al., 2007; Trivedi et al., 2014), e no plasma de indivíduos com DM2 (Seghrouchini et al., 2002). Bastos et al. (2012) também encontraram níveis aumentados de LPO no plasma de pacientes portadores de DM2 e PC, assim como no estudo de Trivedi et al. (2014).

2.5 SALIVA E O SISTEMA PEROXIDASE

A saliva possui um papel fundamental na manutenção da saúde oral, contendo diversos fatores antimicrobianos, como por exemplo, a enzima peroxidase (PO), que faz parte do SPS. O SPS é o sistema de defesa não-imunológico mais importante da saliva, consistindo de SPO e SCN^- , originados das glândulas salivares, e de MPO, derivada dos PMN do FG, dentre outros componentes (Tenovuo; Pruitt, 1984). A enzima SPO catalisa a oxidação do SCN^- através do H_2O_2 , que é excretado pelas células e bactérias orais para produzir ácido hipotiocianoso e íon hipotiocianito, que vão inibir o metabolismo e crescimento de espécies patogênicas (Pruitt, 1987), protegendo a mucosa oral e os dentes, regulando as espécies e seus números (Mandel, 1989).

A PO e a MPO foram amplamente estudados na saliva no DM (Guven et al., 1996; Wiersna et al., 2008; Gorudko et al., 2012) e na DP (Miyasaki; Nemirovskiy, 1997; Gonçalves et al., 2008; Meschiari et al., 2013). Foi relatado um aumento da atividade SPO em gengivite experimental, uma vez que ocorre uma exsudação de leucócitos através do sulco gengival para a saliva, diminuindo sua atividade após higiene oral normal (Smith et al., 1984). A MPO é uma enzima armazenada, mais precisamente, nos grânulos azurófilos nos neutrófilos, dentro dos quais possui um mecanismo de defesa mediando a morte substâncias bacterianas (Klebanoff, 2005), podendo ser detectada tanto na saliva quanto no FG (Gonçalves et al., 2008). A MPO catalisa a conversão do H_2O_2 e cloreto em HOCl, que é um potente oxidante produzido pelos neutrófilos com uma potente ação antimicrobiana (O'Brien, 2000). No FG, o aumento da atividade da MPO tem sido associado com a inflamação proveniente da DP (Smith et al., 1984; Cao; Smith, 1989; Gonçalves et al., 2008). Os oxidantes derivados da MPO contribuem para danos teciduais, iniciação e propagação de doenças inflamatórias crônicas e agudas (Nagler et al., 2002).

O uso da saliva para o monitoramento e estado de doença é altamente desejável para a promoção e cuidados da saúde, uma vez que representa a primeira linha de defesa da cavidade oral, pois se trata de um líquido complexo, que consiste de secreções das glândulas salivares maiores e menores que reflete o estado sistêmico do indivíduo. Já a SALT consiste de uma mistura de fluidos orais, o que inclui secreções das glândulas salivares maiores e menores, além de constituintes de origem não-salivares derivadas do FG, secreções brônquicas expectoradas, soro e células sanguíneas das lesões orais, assim como bactérias e seus produtos, vírus e fungos, células epiteliais descamadas e restos alimentares (Mandel; Wotman, 1976; Sreebny, 1992). A maior parte da água e moléculas da saliva é derivada da vasculatura local (Miller et al., 2010), e por isso muitos componentes encontrados no plasma podem ser detectados na saliva (Loo et al., 2010). Sendo assim, a saliva pode refletir vários estados de saúde e doença do paciente (Mandel, 1993), e um número crescente de doenças e condições sistêmicas tem sido mostrado refletir na saliva (Wong, 2006). Sua análise pode ser especialmente benéfica na determinação da condição da saúde oral atual, por meio da busca de biomarcadores que possam melhor caracterizar a doença (Taba et al., 2005).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram descritos abaixo:

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento dos biomarcadores de estresse oxidativo relacionados com a doença periodontal na saliva total de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 antes e após o tratamento periodontal não-cirúrgico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da periodontite no comportamento dos marcadores de EO TBARS, SOD, TAS e SPO na saliva total de pacientes sistemicamente saudáveis com ou sem periodontite crônica e compará-los com os níveis presentes em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 com e sem periodontite.
- Avaliar a influência do diabetes mellitus tipo 2 no comportamento dos marcadores de EO TBARS, SOD, TAS e SPO na saliva total de pacientes portadores de diabetes do tipo 2 com e sem periodontite crônica e compará-los com pacientes sistemicamente saudáveis com e sem periodontite.
- Avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre os marcadores de EO TBARS, SOD, TAS e SPO na saliva total de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e sistemicamente saudáveis com periodontite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pela Faculdade de Odontologia de São Paulo (FOUSP), protocolo 152/2009 (Anexo A) e pelo CEP pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), protocolo 0643/2011 (Anexo B). Antes do início do estudo, todos os participantes foram informados, em detalhes, dos procedimentos e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido, autorizando a participação nesta pesquisa (Apêndice A).

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo consiste em um ensaio clínico de delineamento paralelo com intervenção (TPNC) e avaliação pós-tratamento de curto prazo (um mês) em pacientes portadores de DM2 (ADA, 2005) e PC generalizada de leve a moderada (Armitage, 1999).

A figura abaixo (figura 4.1) mostra a linha do tempo descrevendo todos os passos clínicos e os respectivos tempos do delineamento do estudo.

4.2 TRIAGEM

- **Pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2**

Os pacientes com DM2 foram recrutados no Centro de Diabetes da UNIFESP e estavam sob tratamento e supervisão do endocrinologista responsável Prof. Dr. Sérgio A. Dib, ao qual os submetia a um tratamento médico adequado para o controle glicêmico.

Figura 4.1 Linha do tempo do estudo mostrando o intervalo de tempo entre as abordagens clínicas. A seleção do paciente foi realizada de acordo com a história médica e avaliação dos prontuários. Após a inclusão, os pacientes passaram pela avaliação periodontal, uma semana depois pelas coletas de sangue periférico e saliva total, e novamente após uma semana, passaram pelo tratamento periodontal. Antes da reavaliação, cada paciente aguardou cerca de 4 semanas para coletas de saliva e sangue. Para o controle metabólico, os pacientes tiveram o sangue periférico coletado novamente aos 12 semanas

- **Pacientes com Periodontite Crônica**

A inclusão dos pacientes sistemicamente saudáveis e com periodontite foi baseada na avaliação das fichas de anamnese e exame clínico periodontal durante a triagem na Clínica de Pós-Graduação da disciplina de Periodontia da FOU SP.

4.3 TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi baseado no estudo de Gonçalves et al. (2008) o qual possui um delineamento semelhante ao presente estudo onde também avaliou-se marcadores de EO em diabéticos com periodontite, antes e após o TPNC.

4.4 GRUPOS

Foram incluídos 121 pacientes distribuídos nos seguintes grupos:

- **Grupo DMDP** - 31 pacientes portadores de DM2 e com PC generalizada
- **Grupo DM** - 31 pacientes portadores de DM2 e com periodonto saudável
- **Grupo DP** - 31 pacientes sistemicamente saudáveis com PC generalizada
- **Grupo C** - 28 pacientes sistemicamente e periodontalmente saudáveis (controle saudável)

4.5 PAREAMENTO

Para tornar a análise dos dados obtidos mais homogênea, os pacientes incluídos foram pareados seguindo os seguintes critérios:

- Gênero (masculino e feminino) para os grupos DMPC/PC e DM/C
- Idade (± 5 anos).

4.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todos os pacientes incluídos deveriam apresentar idade entre 35 e 65 anos e no mínimo 15 dentes naturais (excluindo os 3º molares). Nos pacientes sistemicamente saudáveis adotamos o teste de glicemia rápida para comprovarmos a ausência do DM2, que não poderia ser superior a 100 mg/dL.

- **Periodontite Crônica Generalizada, de Leve a Moderada**

Os indivíduos com PC generalizada de leve à moderada foram diagnosticados a partir dos critérios clínicos e radiográficos adaptados propostos pela Academia Americana de Periodontia (AAP) (AAP, 1999b), onde os pacientes deveriam apresentar:

- Pelo menos 30% dos sítios com profundidade clínica de sondagem (PCS) ≥ 5 mm, e no máximo 60% dos sítios com PCS ≤ 7 mm;
- Nível clínico de inserção (NCI) ≥ 4 mm;
- Placa visível;
- Sangramento à sondagem (SS).

- **Diabetes Mellitus tipo 2**

Os pacientes com DM2 incluídos no estudo deveriam apresentar:

- Diagnóstico do diabetes por no mínimo 5 anos de duração;
- Percentuais sanguíneos de HbA1c entre 6,5% e 8,5% (UKPDS 1998) no início do estudo.
- Uso de medicamentos para o controle do DM (agentes hipoglicemiantes, o uso de insulina ou a combinação de agentes hipoglicemiantes + insulina) reportados no histórico médico.

4.7 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os pacientes que apresentassem qualquer um dos seguintes critérios foram excluídos do estudo:

- Indivíduos com bolsas periodontais > 7 mm;
- Condição sistêmica (exceto DM) que possa interferir na progressão da doença periodontal (ex: desordens imunológicas);
- Uso de medicamentos tais como agentes anticoagulantes, antibióticos, anti-neoplásicos, contraceptivos ou antidepressivos nos últimos 6 meses;
- Uso de antiinflamatórios nos últimos 3 meses antes do início do estudo;
- História de reações anafiláticas;
- Aparelhos ortodônticos, fumantes e/ou gestantes;
- Tratamento periodontal nos últimos 6 meses antes do início deste estudo;
- Múltiplas complicações decorrentes do DM (retinopatias, hipertensão, nefropatias ou neuropatias).

4.8 AVALIAÇÃO PERIODONTAL

O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador previamente treinado e calibrado (A.P.S.B.) no início do estudo, com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo, e após 4 semanas do tratamento periodontal, para a reavaliação. Todos os dentes, exceto os terceiros molares, foram avaliados em 6 sítios (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), com a utilização de sondas periodontais milimetradas tipo Carolina do Norte 15 mm (HuFriedy do Brasil, RJ, Brasil), para os seguintes parâmetros:

- Índice de placa (IP) (O'Leary et al.,1972);
- Distância da linha esmalte-cimento à margem gengival;
- PCS;
- NCI;
- SS (Lenox; Kopczyk, 1973);
- Supuração;
- Mobilidade;
- Envolvimento de Bi ou Tri-furcação (Hamp et al.,1975)

4.9 CALIBRAÇÃO DO EXAMINADOR

A calibração do examinador foi realizada utilizando as sondas periodontais milimetradas tipo Carolina do Norte 15 mm (HuFriedy do Brasil, RJ, Brasil), segundo a metodologia descrita por Araújo et al. (2003), aonde o erro padrão de medida (e.p.m.) e erro médio percentual (e.m.p.) obedeceram um valor de k de 0.81 para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (PSC e NCI).

4.10 TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICO

- **Pacientes com periodonto saudável**

Os pacientes com periodonto saudável, grupos DM e C, receberam profilaxia oral e instrução de higiene oral (IHO).

- **Pacientes com Periodontite crônica Generalizada, de Leve a Moderada**

Os pacientes portadores de PC, grupos DMPC e PC, receberam TPNC, realizadas em até quatro sessões por um único clínico (D. Y. T.), de acordo com as características e condições apresentadas por cada paciente, que constituiu de:

- IHO para controle de biofilme bacteriano;
- Remoção de cálculo supragengival com o uso de ultrassom (Cavitron, Dentsply);
- Eliminação de fatores iatrogênicos (restaurações, próteses, se necessário) e retentores de placa;
- Raspagem, alisamento e polimento corono-radicular com instrumentação manual utilizando curetas de Gracey (Hufriedy do Brasil, RJ, Brasil) com complementação de ultrassom (Cavitron, Dentsply) por sextante;
- Integração Clínica (restauração provisória de cáries, extração de dentes condenados, se necessário);
- Revisão dos Procedimentos Básicos.

4.11 REAVALIAÇÃO PERIODONTAL

Finalizada a primeira fase, iniciou-se a fase do pós-tratamento, por um período de 4 semanas. Dentro deste período, os pacientes receberam controle de placa bacteriana profissional semanal (OHI, raspagem e profilaxia supragengival) até o momento da reavaliação.

Na reavaliação, os pacientes foram re-examinados para os mesmos parâmetros clínicos inicialmente realizados conforme a avaliação clínica já descrita. Neste momento foi verificado se os pacientes apresentariam um controle de placa satisfatório e ausência de inflamação dos tecidos periodontais, sendo que aqueles que não se encaixaram neste perfil, foram excluídos do estudo.

4.12 COLETA DAS AMOSTRAS

- **Sangue Periférico**

A coleta de sangue foi realizada pelas manhãs, no mesmo dia das coletas de SALT, através de serviço contratado domiciliar, por uma enfermeira. As amostras de sangue foram utilizadas para a análise dos níveis de HbA1c dos pacientes diabéticos.

- **Saliva Total**

As coletas foram realizadas no período das 8:00 às 10:30 aonde o paciente deveria apresentar-se em jejum de no mínimo 2 horas antes da coleta. Previamente às coletas, os pacientes fizeram um bochecho com água destilada durante 1 minuto e depois eram submetidos à coleta de SALT. O método de coleta utilizado foi o não-estimulado (cuspidela) (Nicolau, 2008), onde os pacientes depositavam as amostras de saliva total em tubos estéreis (tipo Falcon) durante 5 minutos. As amostras que apresentassem indícios de sangue foram descartadas.

Imediatamente após as coletas, as amostras de saliva total foram centrifugadas a 5000 rpm por cinco minutos a 4°C, aliquotadas em microtubos plásticos estéreis (eppendorfs) codificados de acordo com o código de cada paciente. Para o transporte das amostras até o freezer (-80°C), as amostras foram armazenadas em gelo seco dentro de um isopor.

4.13 ANÁLISES LABORATORIAIS

As amostras de saliva total foram previamente descongeladas e centrifugadas a 1540 x g por 5 min e o sobrenadante foi separado e armazenado a -80 °C.

As análises laboratoriais dos marcadores TAS e SOD foram realizadas no laboratório de Biologia Oral do departamento de Materiais Dentários da FOUSP, com a supervisão da Prof. Dra. Alyne Simões Gonçalves e colaboração da Dra. Flávia Ibuki. As análises dos marcadores TBARS e SPO foram realizadas no laboratório de Farmacologia Bioquímica dos Radicais Livres, Inflamação e Dor do departamento de farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas, sob supervisão do Prof. Marcelo Nicolas Muscará e suporte laboratorial da especialista laboratorial Simone Aparecida Teixeira.

- **Quantificação das Proteínas Totais da Saliva**

Para analisar a concentração das proteínas totais na saliva foi utilizado o método de Peterson (1983), baseado nas reações do reagente biureto. O cobre em meio alcalino reage com a proteína gerando um complexo formado pelo cobre e pela própria proteína que apresenta aminoácidos fenólicos, que reduzem o reativo de Folin resultando em coloração azulada. Foram calculadas as taxas correspondentes em uma curva de referência estabelecida com a solução padrão de albumina (10 µL/mL a 100 µg/mL). As amostras foram diluídas (1:100) em água destilada, e a seguir adicionou-se o composto formado por: Sulfato cúprico pentahidratado (0,2 g/L), tartarato duplo de sódio e potássio (0,4 g/L), carbonato de sódio (20 g/L), SDS 10% (5 g/50 mL) e hidróxido de sódio (3,2 g/100 mL). As amostras foram agitadas e incubadas durante 10 min. Em seguida, adicionou-se o reagente Folin Ciocalteu 2N, realizando-se uma nova agitação e incubação por 40 min a temperatura ambiente. A leitura das absorbâncias a 700 nm foi realizada com água destilada em leitor de placas de ELISA (Molecular Devices, EUA). A concentração de proteínas foi expressa em µg/mL e posteriormente convertida em mg/mL.

- **Análise enzimática da Peroxidase Salivar**

A atividade de peroxidase salivar foi avaliada através da medida de atividade de MPO que se baseia 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 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 min a 4 °C. 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_2O_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 s durante 5 min). A atividade de SPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação e o resultado foi expresso em U MPO/mL de saliva. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade em μM de H_2O_2 degradada por minuto.

- **Quantificação do TBARS**

Aldeídos (principal malondialdeído - MDA) resultantes da LPO foram quantificados nas amostras salivares após a reação com ácido tiobarbitúrico em meio ácido, de acordo com método descrito por Bird e Drapers (1984). As amostras de saliva foram diluídas com solução de fosfato de potássio (50 mM, pH 7.4) contendo 12,6 mM de butil hidroxitolueno (BHT). A seguir, alíquotas de 200 μL da mistura (em duplicata) foram incubadas a 90°C durante 45 min com 400 μL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (0,37 %) em meio fortemente ácido (ácido tricloroacético a 15% e ácido clorídrico 0,25 N). No final da incubação, e após centrifugação durante 5 min a 10000 g, 300 μL dos sobrenadantes foram submetidos à extração do produto de reação com 300 μL de n-butanol com a adição de 30 μL de

solução aquosa saturada de cloreto de sódio através de agitação em vórtex por 30 s. Após centrifugação durante 2 min a 10000 g, 200 µL dos sobrenadantes (fase orgânica) foram pipetados em micro-placas para leitura dos valores de absorbância a 535 nm (corrigidos pelos valores de absorbância a 572 nm). Os resultados foram obtidos como nmol de aldeído por mL de saliva (nmol/mL) utilizando-se para o cálculo um coeficiente de extinção molar de $1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a atividade da LPO foi expressa em nmol de aldeído/mL de saliva.

- **Determinação da enzima Superóxido Dismutase**

A atividade de SOD foi determinada através da utilização do kit SOD - (RANSOD, Randox, UK). Neste método (Suttle; McMurray, 1983; Wooliams et al., 1983) foi utilizada a xantina e xantina oxidase para gerar radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ os quais reagem com o reagente INT [2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio cloridrato], produzindo uma coloração rósea avermelhada que pode ser lida a 505 nm. A atividade da enzima SOD, presente no homogenado glandular, foi medida através do grau de inibição desta reação. Uma unidade da enzima SOD (U SOD) é aquela capaz de causar 50% de inibição da taxa de redução do INT. Para este método foram utilizadas cubetas de plástico e a reação foi lida espectrofotometricamente. Uma curva padrão foi realizada e utilizada para os cálculos. O resultado foi expresso em U SOD/ mg de proteína.

- **Determinação do Status Total Antioxidante na Saliva**

O TAS foi determinado através do Kit TAS (Randox, UK). Neste método (Miller et al., 1993) o reagente 2,2'- Azino-di-[3-etilbenztiazolina sulfonado] (ABTS) foi incubado com a PO (metamioglobina) e os antioxidantes reagem com o H_2O_2 para produzir o radical catiônico ABTS^+ . Este radical tem uma coloração estável verde-azulada a qual pode ser medida a 600 nm. Os AOs presentes no homogenado glandular causam supressão à formação desta coloração, sendo a queda na

coloração proporcional à concentração de AO na amostra. Para este método foram utilizadas cubetas de plástico e a reação foi acompanhada espectrofotometricamente. O resultado dos níveis de TAS foram expressos em nmol de AO/mg de proteína.

Os cálculos foram realizados utilizando as seguintes fórmulas:

$$\Delta = \frac{\text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}}{\text{Tempo}}$$

$$\text{FATOR} = \frac{\text{concentração de padrão}}{(\Delta_{\text{branco}} - \Delta_{\text{padrão}})}$$

$$\text{mmol por L de homogenado} = \text{FATOR} \times (\Delta_{\text{branco}} - \Delta_{\text{amostra}})$$

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do estudo foram analisados utilizando o programa Stata/IC12.0 (StataCorp LP.College Station.US).

Foi realizada a estatística descritiva para as variáveis qualitativas e quantitativas para toda amostra.

Para as comparações entre as variáveis qualitativas, foi utilizado o teste Qui-Quadrado.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para todas as variáveis quantitativas para avaliar a normalidade dos dados. As variáveis que não aderiram à curva de normalidade foram transformadas em log (SOD) ou foram utilizados testes não-paramétricos Mann-Whitney e Wilcoxon, representados por medianas e quartiles.

As análises de variância, ANOVA e teste post-hoc Student-Newman-Keuls, foram utilizados para idade, volume de saliva, medicamentos, parâmetros clínicos (PCS, NCI, SS e IP) e enzimáticos (SOD, TAS, SPO e TBARS) no baseline para fazer a comparação entre os grupos DMPC, PC, DM e C. Foram realizadas análises

de regressão linear entre parâmetros enzimáticos (logSOD, TAS e TBARS) e clínicos (PCS, NCI, IP e SS) e volume salivar, e também análise de correlação (SPO e TBARS).

Foi realizada a estratificação dos dados do TBARS de acordo com o tipo de tratamento com medicamentos, e os testes estatísticos ANOVA e teste t.

Para as comparações entre o baseline e o pós-tratamento, foram utilizados o teste t de Student pareado para os paramétricos e Wilcoxon para não-paramétrico.

Para significância estatística adotamos $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Todos os pacientes inicialmente selecionados terminaram o estudo, não havendo nenhuma intercorrência no decorrer das etapas.

5.1 RESULTADOS DEMOGRÁFICOS

Os grupos dos pacientes diabéticos, DMPC e DM, foram compostos por 31 pacientes cada, totalizando 62 pacientes, sendo o grupo DMPC composto por 15 homens e 16 mulheres com a média de idade de 55 anos, variando entre 38 e 70 anos, ao passo que no grupo DM, composto por 14 homens e 17 mulheres, foi observado uma média de idade de 55, variando entre 36 e 70 anos. Nos grupos dos pacientes sistemicamente saudáveis, o grupo PC foi representado por 14 homens e 17 mulheres com a média de idade de 45, variando entre 35 e 64 anos, enquanto que o grupo C, apresentando 14 homens e 14 mulheres, teve a média de 48 anos, variando entre 37 e 60 anos.

Os grupos dos pacientes diabéticos DMPC e DM tiveram idade significativamente maior quando comparados com os grupos DP e C ($p < 0,001$ e $p = 0,022$ respectivamente) e apresentaram uma média de duração da doença de 10,87 ($\pm 4,91$) anos, grupo DMPC, e 11,64 ($\pm 5,54$) anos grupo DM.

O controle metabólico foi supervisionado por um endocrinologista responsável e controlado através do tratamento com os medicamentos hipoglicemiantes. No grupo DMPC, 48% dos pacientes tomavam apenas MET, 26% tomavam apenas insulina e 26% associavam os dois, enquanto que no grupo DM, cerca de 70% utilizavam MET, 13% insulina e 17% os dois em associação (tabela 5.1).

Além da insulina, outros medicamentos para o tratamento do diabetes foram utilizados associados com a MET como a gliclazida, glibenclamida e glimepirida.

Tabela 5.1 - Dados demográficos da população estudada

Grupos	DMPC		DM		PC	C
N	31		31		31	28
Sexo (H/M) ^a	15/16		14/17		14/17	14/14
Idade ^b (mín-máx)	55 ± 8,35* (38-70)		55 ± 8,75* (36-71)		45 ± 10,12 (35-64)	47 ± 8,75 (37-61)
Duração do diabetes	10,87 ± 4,91		11,64 ± 5,54			
Medicamentos (%)	MET	48%	MET	70%		
	INSU	26%	INSU	13%		
	MET+INSU	26%	MET+INSU	17%		

H: homens; M: mulheres; MET: metformina, INSU: insulina.

Idade e duração do diabetes representados em média ± desvio padrão.

Testes estatísticos: ^aChi-Quadrado; ^bANOVA e teste post hoc Student-Newman-Keuls.

Significância estatística quando $p < 0,05$

*Diferente significativamente de PC e C ($p < 0,001$)

5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE TRANSVERSAL

• Resultados clínicos

Os pacientes dos grupos com periodontite, DMPC e PC, mostraram resultados significativamente mais elevados quando comparados aos pacientes dos grupos DM e C, em relação aos parâmetros PCS, NCI, SS e IP ($p < 0,001$), no baseline. O grupo DM apresentou valores significativamente maiores em relação à PCS ($p=0,007$), NCI ($p=0,003$) e SS ($p<0,05$) quando comparados ao grupo C, enquanto que o SS e IP se mostraram mais elevados no grupo PC do que no DMPC ($p<0,001$), como mostra a tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Comparação dos parâmetros clínicos entre os grupos DMPC, PC, DM e C, no baseline (média ± desvio padrão)

	DMPC	DM	PC	C
PCS (mm)	3,22 ± 0,52 ^{b,d}	2,06 ± 0,31 ^{a,c,d}	3,05 ± 0,45 ^{b,d}	1,77 ± 0,22 ^{a,c,d}
NCI (mm)	4,21 ± 0,94 ^{b,d}	2,47 ± 0,63 ^{a,c,d}	3,85 ± 0,70 ^{b,c}	1,87 ± 0,35 ^{a,c,d}
SS (%)	44.73 ± 20.11 ^{b,c,d}	11,43 ± 9,65 ^{a,c}	67,77 ± 19,26 ^{a,b,d}	7,55 ± 6,00 ^{a,c}
IP (%)	72.41 ± 14.00 ^{b,c,d}	1,19 ± 0,35 ^{a,c,d}	88,25 ± 9,01 ^{a,b,d}	19,33 ± 12,76 ^{a,b,c}

PCS: Profundidade clínica de sondagem; NCI: Nível clínico de inserção; SS Sangramento à sondagem; IP: Índice de placa.

Teste estatístico ANOVA e post hoc Student-Newman-Keuls;

^a Diferente significativamente de DMPC;

^b Diferente significativamente de DM

^c Diferente significativamente de PC

^d Diferente significativamente de C;

Significância estatística quando $p < 0,05$

- Volume de saliva total**

Em relação ao volume de SALT, não houve diferenças significativas entre os quatro grupos estudados no baseline ($p > 0,05$) (tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Comparação volume de saliva total coletado entre os grupos DMPC, DM, PC e C no baseline (média ± desvio padrão)

	DMPC	DM	PC	C	Valor de p
Volume (mL)	3,25 ± 1,27	3,53 ± 1,33	3,46 ± 1,50	3,04 ± 0,58	$p > 0,05$

Teste estatístico ANOVA. Significância estatística quando $p < 0,05$

- Hemoglobina glicada**

Os níveis de HbA1c foram significativamente superiores no grupo DMPC quando comparados ao grupo DM ($p < 0,05$) no baseline (tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Comparação dos níveis de hemoglobina glicada entre os grupos DMPC e DM, no baseline (mediana e quartiles)

	DMPC	DM	Valor de p
HbA1c (%)	7,90 (7,10-8,40)	7,10 (6,30-8,10)	p<0,05*

HbA1c: Hemoglobina glicada.

Teste estatístico de Mann-Whitney. Significância estatística quando $p<0,05$.

*Diferença significativa entre DMPC e DM;

• Resultados dos biomarcadores de EO

No baseline, não observamos diferenças significativas entre os grupos para os níveis de atividade de TAS e SOD na SALT. No entanto, os níveis de TBARS no grupo DMPC foram significativamente menores do que nos grupos DM, PC e C ($p<0,001$) e os de SPO, o grupo DMPC foi significativamente maior do que os grupos PC e C (tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Parâmetros enzimáticos salivares nos grupos DMPC, DM, PC e C, no baseline (média $\pm$ desvio padrão)

	DMPC	DM	PC	C
TBARS (nmol/mL)	0.21 $\pm$ 0.17 ^{‡ § ¥}	0.45 $\pm$ 0.35 [†]	0.54 $\pm$ 0.32 [†]	0.60 $\pm$ 0.42 [†]
SOD (U/mg prot)	0.46 $\pm$ 0.42	0.41 $\pm$ 0.36	0.55 $\pm$ 0.48	0.51 $\pm$ 0.45
TAS (nmol/mg prot)	0.80 $\pm$ 0.40	0.95 $\pm$ 0.42	0.73 $\pm$ 0.54	0.82 $\pm$ 0.48
SPO (UMPO/MG prot)	163.94 $\pm$ 120.67 ^{§ ¥}	114.17 $\pm$ 129.53	84.36 $\pm$ 79.29 [†]	68.98 $\pm$ 70.63 [†]

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; SOD: enzima superóxido dismutase; TAS: Status total de Antioxidante. SPO: peroxidase salivar

Teste estatístico ANOVA e post-hoc Student-Newman-Kulser. Significância estatística quando $p<0,05$

† Diferente significativamente de DMPC;

‡ Diferente significativamente de DM

§ Diferente significativamente de PC

¥ Diferente significativamente de C;

- **Estratificação dos dados (TBARS) por medicamento**

Quando os dados foram estratificados em relação aos medicamentos, houve uma diferença significativa na enzima TBARS para o grupo DMPC que tomava metormina em relação aos que tomavam apenas insulina, associavam os dois, ou não tomavam (grupos PC e C) ($p=0.025$). Em relação aos pacientes que tomavam apenas insulina ou associavam a MET com a insulina, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados ($p=0.10$ e $p=0.07$) (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Resultados da comparação dos níveis de TBARS entre os pacientes agrupados de acordo com os medicamentos

	TBARS (nmol/mL saliva)			
	DMPC	DM	PC [†]	C [†]
MET	0.22 ± 0.19*	0.52 ± 0.28		
Insulina	0.23 ± 0.13	0.28 ± 0.30	0.54 ± 0.32	0.60 ± 0.43
MET + Insulina	0.10 ± 0.10	0.61 ± 0.65		

[†]Não tomavam metformina

TBARS: ácido tiobarbitúrico;

Teste estatístico ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls. Significância estatística quando $p<0,05$

*Significativamente diferente de DM, PC e C ($p=0.02$)

- **Regressão linear e coeficiente de correlação**

A análise de regressão linear foi realizada para os parâmetros clínicos PCS, NCI, SS, IP, volume salivar e parâmetros enzimáticos TBARS, SOD e TAS. Para os níveis de TBARS, o modelo foi estatisticamente significativo como parâmetro clínico PCS ($\beta = -0.09$; $p=0.03$), IP ($\beta = -0.001$; $p=0.02$), volume salivar ($\beta = -0.05$; $p=0.04$), SOD ($\beta = 0.30$; $p=0.002$) e TAS ($\beta = 0.31$; $p=0.015$). Quanto à atividade da SOD, houve uma associação positiva com os níveis de TAS ($\beta = 0.301$, $p=0.008$). (tabela 5.7). Na análise de correlação, houve uma correlação significativa negativa entre a

atividade de SPO e níveis de TBARS ($r=-0,356$; $p=0.0002$), enquanto que não houve correlação significativa com os outros marcadores (tabela 5.8).

Tabela 5.7 - Resultados da regressão linear simples relacionando parâmetros clínicos e estresse oxidativo

	TBARS			SOD			TAS		
	β	Erro Padrão	p	β	Erro Padrão	p	β	Erro Padrão	p
PCS	-0.09	0.05	0.03**	0.03	0.06	0.06	-0.11	0.07	0.09
NCI	-0.05	0.03	0.06	0.01	0.04	0.70	-0.06	0.04	0.11
SS	-0.00	0.001	0.57	0.02	0.001	0.21	-0.002	0.001	0.23
IP	-0.00	0.001	0.02**	-0.0006	0.001	0.61	-0.001	0.001	0.14
VOL SALT	-0.05	0.03	0.04**	-0.02	0.04	0.57	0.03	0.04	0.5
SOD	0.30	0.10	0.002**	-	-		-	-	-
TAS	0.31	0.12	0.01**	0.30	0.11	0.008**	-	-	-

Parâmetros Clínicos: PCS, profundidade clínica de sondagem, NCI, nível clínico de inserção, SS, sangramento a sondagem, IP, índice de placa; Parâmetros enzimáticos: SOD, superóxido dismutase, TAS, status total de antioxidantes. Coeficiente β de regressão. **Diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$)

Tabela 5.8 - Correlação entre PO e TBARS, SOD e TAS

	SPO (UMPO/mg prot)	
	R	p
TBARS (nmol/mL saliva)	-0.356	0.0002**
SOD (U/mg prot)	0.026	0.81
TAS (nmol/mg prot)	0.100	0.33

R, coeficiente de correlação de Spearman. **Diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$)

5.3 RESULTADOS DA ANÁLISE LONGITUDINAL

- Resultados clínicos**

O tratamento periodontal promoveu melhoras significativas nos pacientes portadores de periodontite em todos os parâmetros clínicos avaliados. Foi observado reduções significativas para PCS, NCI, SS e IP ($p < 0,001$) no grupo DMPC; e para PCS, SS, IP ($p < 0,001$) e NCI ($p < 0,003$) no grupo PC. Entre os resultados finais dos grupos DMPC e PC, o parâmetro SS mostrou-se mais elevado no grupo PC ($p < 0,001$), porém o IP se mostrou maior no grupo DMPC ($p < 0,015$) após o tratamento periodontal (tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Comparação dos resultados dos parâmetros clínicos dos grupos DMPC e PC, entre o baseline e após tratamento periodontal (média $\pm$ desvio padrão)

	Grupo DMPC			Grupo PC		
	Baseline	Após tratamento	Valor de p	Baseline	Após tratamento	Valor de p
PCS (mm)	3,22 $\pm$ 0,52	2,45 $\pm$ 0,42	p<0,001*	3,05 $\pm$ 0,45	2,39 $\pm$ 0,50	p<0,001*
NCI (mm)	4,21 $\pm$ 0,94	3,56 $\pm$ 0,85	p<0,001*	3,85 $\pm$ 0,70	3,46 $\pm$ 0,95	p<0,003*
SS (%)	44,73 $\pm$ 20,11	12,09 $\pm$ 11,56	p<0,001*	67,77 $\pm$ 19,26	20,35 $\pm$ 18,39	p<0,001*
IP (%)	72,41 $\pm$ 14,00	18,62 $\pm$ 11,23	p<0,001*	88,25 $\pm$ 9,01	17,06 $\pm$ 13,28	p<0,001*

PCS: Profundidade clínica de sondagem; NCI: Nível clínico de inserção; SS sítios com sangramento à sondagem; IP: índice de placa.

Teste estatístico T de Student Pareado; Significância estatística quando $p < 0,05$

*Diferença significativa entre o baseline e após o tratamento.

- Volume de saliva total**

Quando o volume da SALT do baseline foi comparado com o volume após o tratamento periodontal, não houve diferenças significativas tanto no grupo DMPC

($p>0,5$) quanto no PC ($p=0,4$). Na comparação entre os resultados finais dos grupos DMPC e PC, também não foram observadas diferenças significativas ($p>0,3$) (tabela 5.10).

Tabela 5.10 - Comparação dos volumes de saliva total dos grupos DMPC e PC entre o baseline e após tratamento periodontal (média $\pm$ desvio padrão)

	DMPC			PC		
	Baseline	Após tratamento	Valor de p	Baseline	Após tratamento	Valor de p
Volume (mL)	3,25 $\pm$ 1,27	3,17 $\pm$ 1,24	$p>0.05$	3,46 $\pm$ 1,51	3,27 $\pm$ 1,27	$p>0.05$

Teste estatístico Kruskal-Wallis. Significância estatística quando $p<0,05$

- **Hemoglobina glicada**

O tratamento periodontal não influenciou significativamente os níveis de HbA1c no grupo DMPC após 1 ($p=0,4$) e 3 ($p=0,4$) meses do tratamento, quando comparados ao baseline (tabela 5.11).

Tabela 5.11 - Comparação dos níveis de hemoglobina glicada entre o baseline, 1, e 3 meses após o tratamento dos grupos DMPC e DM (mediana e quartiles).

DMPC	Baseline	Após 1 mês	Valor de p
HbA1c (%)	7,90 (7,10-8,40)	7,50 (6,80-8,60)	$p=0,4$
		Após 3 meses 7,70 (6,90-8,27)	$p=0,4$

HbA1c: Níveis de hemoglobina glicada.

Teste estatístico de Wilcoxon. Significância estatística quando $p<0,05$.

- **Resultados dos biomarcadores de EO**

Após o TPNC, não observamos diferenças significativas quando comparamos os resultados do baseline e finais para os níveis de TAS e SOD nos grupos DMPC

($p>0,9$ e $p>0,3$) e DP ($p>0,8$ e $p>0,5$). Para o marcador TBARS, observamos um aumento significativo no grupo DMPC após o tratamento quando comparados ao baseline ($p=0.011$), enquanto que para os valores de SPO, observamos uma diminuição significativa apenas no grupo DMPC após o TPNC ($p=0.37$) (tabela 5.12).

Tabela 5.12 - Resultados enzimáticos dos grupos DMPC e PC, após o tratamento periodontal (média $\pm$ desvio padrão)

	Grupo DMPC			Grupo PC		
	Baseline	Após tratamento	Valor de p	Baseline	Após tratamento	Valor de p
TBARS (nmol/mL)	0.21 $\pm$ 0.16	0.37 $\pm$ 0.27	p=0,011**	0.49 $\pm$ 0.29	0.44 $\pm$ 0.31	p=0,53
SOD (U/mg prot)	0.42 $\pm$ 0.32	0.50 $\pm$ 0.43	p=0,32	0.65 $\pm$ 0.39	0.52 $\pm$ 0.50	p=0,5
TAS (nmol/mg prot)	0.79 $\pm$ 0.40	0.77 $\pm$ 0.32	p=0,93	0.67 $\pm$ 0.52	0.69 $\pm$ 0.41	p=0,85
SPO (UMPO/MG prot)	163.94 $\pm$ 120.67	116.21 $\pm$ 63.39	p=0.037**	84.36 $\pm$ 79.29	71.54 $\pm$ 86.15	p=0.44

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; SOD: enzima superóxido dismutase; TAS: Status total de Antioxidante. SPO: peroxidase salivar

Teste estatístico T de Student Pareado. Significância estatística quando $p<0,05$

**Diferença significativa entre o baseline e após o tratamento

6 DISCUSSÃO

O EO, fenômeno causado pelo distúrbio do equilíbrio entre a geração ERO e AO em favor dos oxidantes, danifica o organismo após exposição a altas concentrações de ERO e/ou abatimento do SAO (Sies, 1991), e tem sido relacionado a diversas patologias como a periodontite (Akalin et al., 2005; Chapple et al., 1997; Trivedi et al., 2014) e ao DM e suas complicações (Seghrouchini et al., 2002; Giacco; Brownlee, 2010).

O equilíbrio entre EROs e AO nos tecidos como uma pré-condição necessária para a saúde periodontal é encontrada abalada na periodontite. Isto ocorre como resultado de quantidades excessivas de EROs localmente produzidas durante inflamação periodontal intensa e contínua (Chapple et al, 2007) que excede e exaure as capacidades AO levando a danos teciduais. EROs na periodontite originam-se das células inflamatórias como ferramenta principal na eliminação de patógenos, mas, como a fagocitose na periodontite pode estar alterada dependendo dos padrões de resistência dos periodontopatógenos, resulta no acúmulo de ERO e radicais livres nos tecidos periodontais (Novakovic et al., 2014). Desse modo, a LPO contribui, através de diversos mecanismos, para a destruição tecidual, incluindo danos no DNA, oxidação de enzimas, estimulação de citocinas pro-inflamatórias, presença do $O_2^{\bullet-}$ nas áreas adjacentes aos osteoclastos, levando a reabsorção óssea (Halliwell, 2000; Sobaniec; Sobaniec-Lotowska, 2000).

No DM, os diferentes mecanismos patogênicos que induzem a hiperglicemia, como a cadeia respiratória da mitocôndria, formação das AGEs, síntese de diáglicerol e ativação da NADPH oxidase (Karima et al., 2005; Mahrouf et al., 2006), levam à superprodução de $O_2^{\bullet-}$ pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, esse último parece ser o principal mecanismo por trás das vias mediadas pela glicose no DM (Brownlee, 2001).

Muitas evidências na literatura confirmam a relação bidirecional entre DM e DP (Mealey; Oates, 2006; Preshaw et al., 2012), e a coexistência das duas condições poderia aumentar patologicamente o efeito do EO (Sardi, 2013; Pendyala et al., 2013).

No presente estudo, foram investigados marcadores de EO na SALT de pacientes com DM2 e sistemicamente saudáveis com e sem PC que foram

submetidos ao TPNC. Ao nosso conhecimento, não existem estudos intervencionais na literatura que tenham avaliado o efeito do tratamento periodontal sobre os produtos de LPO, atividade de PO e níveis de AO na SALT de pacientes com DM2 e PC. O baseline do nosso estudo mostrou valores de TBARS significativamente diminuídos e SPO significativamente aumentados nos pacientes DMPC comparados aos demais grupos. Além disso, também foram encontrados níveis de TAS e atividade da SOD sem diferenças entre os grupos estudados. Após o TPNC, os valores de TBARS aumentaram e os de SPO diminuíram significativamente no grupo DMPC, enquanto que os valores de TAS e SOD continuaram inalterados nos grupos tratados.

O tempo de meia-vida de algumas EROs é extremamente curto (10^{-6} a 10^{-9} s) e uma das maneiras de detectar a presença delas é através da mensuração de marcadores da destruição tecidual resultante do EO associadas aos produtos finais da LPO (Tsai et al., 2005), como o TBARS ou MDA. Estudos anteriores relataram que elevados níveis de TBARS/MDA na saliva estavam correlacionados positivamente com parâmetros clínicos periodontais em pacientes com DP (Tsai et al., 2005; Akalin et al., 2007) e em indivíduos portadores de DM2 com PC (Trivedi et al., 2014). Apesar de terem utilizado uma classificação diferente da DP, Khalili e Biloklytska (2008) também verificaram níveis aumentados de MDA na saliva significativamente relacionados com o estado clínico dos pacientes com DP.

Al Rawi (2011) relatou níveis significativamente elevados de MDA na saliva e no plasma de diabéticos e concluíram que esses indivíduos possuíam o metabolismo lipídico sistêmico alterado, o que poderia estar sendo refletido na composição salivar, repercutindo um estado de EO aumentado. Bastos et al. (2012) encontraram níveis aumentados de LPO no plasma de pacientes com DM2 com HbA1c, colesterol, LDL e triglicérides elevados, além de correlação positiva entre marcadores locais e sistêmicos de LPO, e parâmetros clínicos periodontais, indicando maior severidade da inflamação periodontal nos pacientes com maior LPO. No entanto, o papel das EROs no DM é independente do conteúdo lipídico sérico, já que foram encontrados altos níveis de LPO em pacientes com DM2 normolipídicos (Freitas et al., 1997).

Utilizando um delineamento experimental semelhante ao do presente estudo, Trivedi et al. (2014) avaliaram EO na SALT e no plasma de indivíduos DM2 e sistemicamente saudáveis com e sem DP, e encontraram níveis de MDA na SALT e

no sangue nos indivíduos DMDP superiores aos dos DM e controles, propondo um possível mecanismo de produção de $O_2^{\bullet-}$ durante a interação entre periodontopatógenos e neutrófilos agindo dentro dos tecidos ou bolsas periodontais (Sheikhi et al., 2001).

O EO foi amplamente relacionado com a ocorrência de complicações diabéticas, como a aterosclerose e doenças cardiovasculares. O estudo de Lodovici et al. (2009) mostrou maiores níveis de LPO em indivíduos DM2 com complicações diabéticas do que nos diabéticos sem complicações. Ainda, este mesmo estudo encontrou TAC não-enzimática similar no plasma de indivíduos com DM2 pobremente controlados com ou sem complicações, e uma correlação positiva entre níveis de MDA e vitamina E, indicando uma resposta compensatória ao EO induzido pela hiperglicemia.

Diferentemente do que foi encontrado na literatura, o presente estudo encontrou níveis de TBARS significativamente diminuídos na saliva de pacientes com DM2 portadores de PC em comparação aos demais grupos no baseline. Além disso, os resultados da análise de regressão linear do presente estudo mostraram uma correlação negativa significativa entre os parâmetros clínicos PCS e IP e níveis de TBARS, indicando que a maior severidade da DP está relacionada à menor LPO nesta amostra. Após estratificação dos dados enzimáticos (baseline) por medicamento antidiabético, esses mesmos resultados foram confirmados, especificamente naqueles indivíduos que tomavam apenas MET para o controle metabólico.

O delineamento e a execução do presente estudo utilizaram de critérios de inclusão que permitiram a formação de grupos de pacientes homogêneos, pareados com os respectivos grupos controles em gênero e idade. Adicionalmente, a inclusão apenas de pacientes com HbA1c entre 6.5% e 8.5% permitiu a integração de diabéticos tratados por medicamentos, confirmando a inclusão de pacientes criteriosamente controlados. Do mesmo modo, os pacientes portadores de PC foram selecionados seguindo os critérios clínicos e radiográficos da Academia Americana de Periodontologia (AAP, 1999b), os quais 30 dias após o tratamento, na reavaliação, tiveram todos os parâmetros clínicos reduzidos, mostrando efetividade na terapia aplicada resultando em saúde periodontal.

Nossos resultados sugerem que haja um possível mecanismo de inibição na produção do $O_2^{\bullet-}$ através da estimulação da via responsável pela expressão de

enzimas AO pelo uso da MET resultando na diminuição do LPO e consequente redução do EO, refletidas na saliva (Pavlovic et al., 2000; Cosic et al., 2001; Gargiulo et al., 2002; Buldak et al., 2014; Ashabi et al., 2015).

A MET é uma biguanida amplamente utilizada para o tratamento do DM2, e foi o medicamento anti-hiperglicêmico mais utilizado pelos pacientes diabéticos no presente estudo. Seu completo mecanismo de ação ainda está para ser descoberto, mas até o presente conhecimento, esse medicamento age inibindo a produção de glicose no fígado, aumentando a utilização periférica da glicose (Faure et al., 1999) e ativando a AMP-kinase (AMPK), que tem um papel fundamental na sinalização da captação da insulina e na detecção de energia (Hardie, 2008). Buldak et al. (2014) sugeriram uma inibição direta da geração de ERO como resultado da propriedade da inibição da NADPH oxidase. Por sua vez, Gargiulo et al. (2002) relataram a inibição da geração de ERO em plaquetas pelo uso da MET, a qual interferiu no processo que leva a formação de $O_2^{\bullet-}$, indicando uma capacidade de interferir no estado redox, inibindo a LPO e potencializando defesas Aox (Pavlovic et al., 2000; Cosic et al., 2001).

Como já relatado anteriormente, o mecanismo de ação da MET mais conhecido é a ativação da AMPK (Zhou et al., 2011) que também está envolvida no bloqueio da síntese do NF- κ B, fator que controla a cadeia de síntese de diversas moléculas envolvidas na geração da resposta inflamatória (Hattori et al., 2006; Hirsch et al., 2013) que pode levar à inibição de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 (Buldak et al., 2014). Recentemente, estudos têm citado que a via AO do fator nuclear relacionado ao NF-2 (Nrf2) é modulada pela AMPK (Iwasaki et al., 2013; Yaku et al., 2013). A indução da via Nrf2 pela AMPK está associada às alterações de enzimas AO, como SOD, CAT, GSHPx que foram encontradas elevadas em condições de isquemia (Kakkar et al., 2013). A ativação da AMPK pela MET estabiliza os níveis de Nrf2, resultando em proteção, como mostraram Ashabi et al. (2015) que relataram que o pré-tratamento com MET elevou a expressão de Nrf2 em ratos isquêmicos, e subsequentemente levou a ativação de AO e elevação dos níveis de GSH e CAT, resultando na diminuição dos danos celulares durante o estresse. Além disso, estes autores demonstraram uma diminuição de proteínas inflamatórias, como NF κ B e TNF- α , nos ratos pré-tratados com MET.

A mensuração de AO pode representar uma das maneiras de avaliar-se a presença de ERO ou EO nos tecidos e fluidos corporais, considerando que a

diminuição da capacidade AO indica um estado de defesa abaixo dos níveis basais, ou o aumento do EO (Brock et al., 2004).

Dentre os antioxidantes, a enzima SOD foi amplamente estudada em pacientes com doença periodontal, no FG e no tecido gengival (Skaleric et al., 2000; Akalin et al., 2005; Akalin et al., 2008) porém pouco estudada na saliva (Novakovic et al., 2014; Trivedi et al., 2014). É reconhecido que as enzimas SOD são encontradas principalmente em células e tecidos e há apenas uma pequena atividade em fluidos extracelulares (Chapple, 1997; Bauer; Bauer, 1999). Este pode ter sido um dos motivos da ausência de diferenças na atividade da SOD na SALT entre os grupos do presente estudo.

O presente estudo também falhou em encontrar diferenças significativas nos níveis de TAS no baseline. Chapple et al. (1997) estudaram amostras de soro e saliva em grupos com DP e controles utilizando ensaio de quimiluminescência aumentada, relatando que a TAC do soro foi similar entre os dois grupos, e a TAC da saliva e concentração de AO no soro e saliva foram significativamente menores em indivíduos DP comparados com controles, resultados que sofreram possível interferência da inclusão de fumantes e da estimulação da saliva.

Posteriormente, Brock et al. (2004) avaliaram TAC local (na saliva e no FG) e sistêmica (no soro e no plasma) de indivíduos com DP e controles, verificando-se níveis de TAC maiores no FG e no plasma na DP, mas não na saliva e no soro comparados aos controles. Na saúde, esses mesmos autores demonstraram concentração de AO maior no FG do que no soro e plasma, indicando a síntese ou armazenamento local de AO dentro do periodonto. Eles também verificaram uma maior concentração de AO em homens do que mulheres, independente da DP, embora nenhuma diferença na TAC fosse encontrada quando a diferença dos gêneros foi levada em consideração, reforçando que os níveis AO no soro e na saliva não refletem o estado da DP. Levando em consideração o conjunto desses resultados, os autores sugeriram que o sulco gengival é banhado por um fluido que contém características AOs distintas dos compartimentos periféricos e salivares.

Recentemente, um mecanismo compensatório de super-regulação das defesas AO frente a crescentes danos oxidativos foi demonstrado no estudo de Su et al. (2009), onde foi relatado altos níveis de TAC associados com a DP. Entretanto, os autores consideraram a presença de sangramento das bolsas resultante da

inflamação periodontal durante a expectoração, e por isso não excluíram defesas AOs derivadas do sangue como fonte do aumento do TAC salivar.

Reforçam de modo interessante nossos resultados e nossa hipótese da via de compensação ERO/AO os achados de Pendyala et al (2013), em indivíduos DM2 recém diagnosticados sem controle glicêmico (anti-hiperglicêmicos). Estes autores verificaram níveis aumentados de EO salivar nos diabéticos que levou a depleção da TAC, sugerindo uma geração de ERO através da oxidação de lipídios. Além disso, verificaram a maior depleção da TAC em indivíduos DM2 com DP em relação aos DM2 com periodonto saudável, e sugeriram que a DP tenha um efeito negativo em pacientes com EO já comprometidos, onde a associação de neutrófilos hiperativos/reativos e o aumento da liberação de EROs estariam correlacionados com a severidade da periodontite e o controle glicêmico.

De modo diferente, o estudo de Seghrouchini et al. (2002) verificou a influência do controle glicêmico nos níveis de EO no plasma, no qual foi sugerido que a duração do tratamento com insulina possa ter influenciado de maneira positiva os parâmetros de EO sistêmicos em indivíduos DM2, verificando-se níveis de TBARS diminuídos nos DM2 tratados há mais de 10 anos com insulina em relação aos tratados em menos tempo. Além disso, foram demonstrados valores de TAS próximos para pacientes DM1 e DM2 tratados com insulina, acentuando a importância da influência dos medicamentos para o controle glicêmico no sistema de EO.

No estudo de Trivedi et al. (2014), foram encontrados valores salivares da SOD e CAT diminuídos e da GSH aumentados nos DMDP quando comparados aos indivíduos DP, e atribuíram estes resultados à produção excessiva de ERO originário da auto-oxidação da glicose, proteínas glicadas e glicação de enzimas antioxidativas, limitando a capacidade de detoxificação de radicais de oxigênio (Giugliano et al., 1995). Estes autores observaram ainda que a atividade AO (SOD, CAT e glutathione reduzida) plasmática estava aumentada nos indivíduos DMDP comparados com DM, e estaria justificada pelo mecanismo compensatório do organismo, no qual a existência ou aumento da produção de ERO na periodontite poderia ter aumentado as defesas AOs sistêmicas, o que contrabalancearia o ambiente pró-oxidativo.

Outro aspecto importante que possa ter influenciado nossos resultados é a conhecida modificação fisiológica das glândulas salivares de pacientes diabéticos,

como demonstrado na literatura. Em indivíduos sistemicamente saudáveis, foi detectada elevada atividade de AO na saliva da glândula parótida quando comparados com saliva das glândulas submandibulares e sublinguais. Em ratos diabéticos foi verificada uma influência do DM no metabolismo do glicogênio das glândulas submandibulares e parótida (Nicolau et al., 2005). Além de combaterem os radicais livres originados da alimentação, a saliva da parótida é destinada também ao combate de íons metais ativos, íons conhecidos por aumentar os ânions hidroxilas via reação de Fenton (Nagler et al., 1997; Nagler et al., 2002).

As várias alterações na composição salivar em diabéticos (Dodds et al., 2000; Aren et al., 2003; Su et al., 2012) indicam que as glândulas salivares sofrem modificações que resultam em uma resposta vascular reduzida e neuropatia, demonstradas em estudos em animais e em humanos (Moore et al., 2001; Anderson; Garret, 2004). Zloczower et al. (2007) verificaram um aumento geral de AOs, como ácido úrico, POs e SOD salivares em indivíduos DM2 com e sem complicações, possivelmente resultado do estado EO sistêmico e aumento geral de AO séricos, mas também, entre outras razões, pode ter sido reflexo de uma resposta específica das glândulas salivares dos diabéticos (super-regulação da produção de enzimas AO).

Entre os diversos componentes do SAO da saliva, aquele citado como o mais importante tem sido o das peroxidases, isto, porém, não significa que seja o único, pois o sistema é composto de diversos outros componentes como a lactoferrina e lisoenzimas (Jentsch et al., 2004), que poderiam ter maior significado na proteção dos tecidos orais das espécies tóxicas geradas nas condições inflamatórias do que AO solúveis em água na saliva (Moore et al., 1994).

Elevada atividade da SPO foi encontrada no grupo DMPC quando comparado com os grupos PC e C no baseline do presente estudo. Componentes dos SPS, a PO e a MPO salivares foram amplamente estudados no DM (Güven et al., 1996; Wiersna et al., 2008; Gorudko et al., 2012) e na DP (Miyasaki; Nemirovskly; 1997; Gonçalves et al., 2008; Meschiari et al., 2013). Os resultados do presente estudo estão consistentes com os estudos de Smith et al. (1984), Güven et al. (1996), Sakamoto et al. (2008) e Meschiari et al. (2013), nos quais verificaram atividades aumentadas de SPO e/ou MPO na saliva de pacientes com DP e DM quando comparados com controles saudáveis, enquanto que Gonçalves et al. (2008) não detectaram diferenças significativas na SPO entre pacientes DMPC e PC. Uma

proporção significativa da SPO pode ser derivada da MPO, dos PMN no FG, via exsudação (Gonçalves et al., 2008). A alta atividade de SPO nos pacientes DMPC possivelmente relacionada à severidade da inflamação gengival (Güven et al. 1996) poderia estar afetando diretamente a atividade salivar de enzimas como a PO, cuja fonte encontra-se nas glândulas salivares.

A hipótese de que a MET esteja interferindo no estado redox, ou seja, na geração de ERO, mais precisamente de $O_2^{\bullet-}$ (Gargiulo et al., 2002), pode ser reforçada através da correlação negativa significativa encontrada entre a atividade da SPO e níveis de TBARS no baseline do atual estudo. Frente a um desafio bacteriano, neste caso bactérias periodontopatogênicas e infecções orais oportunistas (*Candida albicans*) (Ueta et al., 1993), e ao estado hiperglicêmico, ocorre a geração de ERO por diversos mecanismos. No caso do presente estudo, é pressuposto que a MET sistêmica nos pacientes diabéticos ative a via Nrf2 que modula a expressão de enzimas AO (Hirsch et al., 2013), levando à inibição da geração de ERO que, conseqüentemente, diminui a reação de LPO. A redução do EO, representado pelos níveis de TBARS, leva a diminuição do consumo de agentes AOs endógenos, demonstrado pela correlação encontrada entre os níveis TBARS, SOD e TAS. Um mecanismo de compensação, mostrado pela super-regulação da atividade de SPO, fornecerá proteção contra EO na busca pela homeostase e pelo estado redox. Sugere-se assim, que através destes mecanismos, o estado redox dos pacientes DMPC do presente estudo esteja alterado pela MET, onde a atividade de SPO aumentada está compensando o EO na saliva.

Adicionalmente e de modo interessante, o estudo prospectivo de diabetes do Reino Unido (UKPDS) sugeriu que a MET possua outros benefícios que estariam envolvidos na prevenção de complicações diabéticas, diminuindo desta forma a mortalidade e morbidade macrovascular independente do controle glicêmico (UKPDS, 1998). Foi demonstrado também que a MET possui efeitos benéficos no metabolismo ósseo nos pacientes diabéticos (Vestergaard et al., 2005; Renjmark, 2008). Bak et al. (2010) avaliaram os efeitos da MET sistêmica no osso alveolar em ratos com periodontite induzida, e os resultados sugeriram que o medicamento pode reduzir o infiltrado inflamatório e a perda óssea alveolar nos tecidos periodontais. Esse conjunto de informações sugere que este medicamento poderia ter ainda um papel protetor na evolução da periodontite, que foi considerada como a sexta complicação do diabetes (Löe, 1993).

Foi elucidado que o DM2 é um fator de risco para a periodontite, aonde indivíduos diabéticos possuem duas vezes mais chances de desenvolverem a periodontite (Grossi et al., 1994; Preshaw et al., 2012). O presente estudo mostrou PCS e perda de inserção clínica significativamente maiores nos grupos DMPC e PC em relação aos grupos DM e C, resultado que corrobora diversos estudos e meta-análises que relatam maior risco da doença periodontal em indivíduos diabéticos (Cianciola et al., 1982; Janket et al., 2005; Lalla et al., 2007; Gonçalves et al., 2008; Bastos et al., 2012). Encontramos evidências clínicas e epidemiológicas de que a doença periodontal piora o controle metabólico nos diabéticos (Soskolne, 1998; Preshaw et al., 2012). Sustentando estes achados, o presente estudo encontrou níveis de HbA1c significativamente mais elevados nos pacientes do grupo DMPC quando comparado ao grupo DM, reforçando a influência da severidade da doença periodontal no controle glicêmico (Taylor et al., 1996; Lalla et al., 2007).

Ainda que não tenha sido possível observar uma diminuição significativa dos níveis de HbA1c após o TPNC, a diminuição encontrada de 0,4% dos níveis de HbA1c no grupo DMDP, possivelmente decorrente do tratamento, não deixa de ser clinicamente importante, pois reforça resultados de diversas meta-análises que relatam uma possível antecipação do controle metabólico após um tratamento periodontal efetivo, além de possivelmente diminuir condições inflamatórias sistêmicas e periodontais que estariam associadas à redução do risco de complicações diabéticas (Janket et al., 2005; Darré et al., 2008; Preshaw et al., 2012). Ainda mais importante do ponto de vista clínico, tal redução poderia ser equiparada àquela decorrente do tratamento com medicamentos hipoglicêmicos, sugerindo que possa ser clinicamente eficaz para colaborar no controle dos níveis glicêmicos de pacientes diabéticos mal-controlados.

No presente estudo o TPNC também foi efetivo sobre os marcadores de EO, nos quais foi verificado uma significativa diminuição das atividades de SPO e um significativo aumento dos níveis de TBARS apenas no grupo DMPC, enquanto que os níveis de TAS e atividade da SOD permaneceram inalterados nos grupos DMPC e PC.

A higiene oral parece exercer um possível efeito nos níveis de EO no plasma de indivíduos com DM2 não-controlados (Koromantzos et al., 2012). Ao comparar os efeitos entre TPNC e a raspagem supragengival, Koromantzos et al. (2012) verificaram uma maior redução (não significativa) naqueles que receberam o TPNC,

que consistiu de raspagens e sessões de IHO, quando comparados aos diabéticos que receberam apenas a raspagem supragengival. Entretanto, no acompanhamento de 6 meses, em relação ao baseline, estes autores não encontraram diferenças nesses marcadores nos dois tipos de abordagem terapêutica, embora uma melhora significativa no controle glicêmico foi observada nos diabéticos que receberam o TPNC.

Sonoki et al. (2006) sugeriram que a terapia periodontal poderia exercer um efeito AO semelhante às terapias de administração de vitamina E em indivíduos DM2, visto que estes autores notaram uma redução dos parâmetros de LPO no plasma após o TPNC em indivíduos DM2 com periodontite, diferentemente dos nossos resultados. Ainda, estes mesmos autores demonstraram uma maior LPO nos indivíduos DMDP quando comparados com os sistemicamente saudáveis com DP, os quais, no entanto, após o TPNC, não sofreram a redução da LPO. A maior capacidade de redução de LPO nos indivíduos com DM foi justificada por Sonoki et al. (2006) pelo fato do estado hiperglicêmico causar diversos impactos nos diabéticos tais como a produção de $O_2^{\bullet-}$ nas células endoteliais vasculares gerando maior EO, contribuindo assim para desenvolvimento de complicações diabéticas; e a irregularização das defesas AO contra o EO, tornando os diabéticos vulneráveis ao EO. Em contrapartida, a amostra populacional do estudo de Sonoki et al. (2006) foi pequena e os diabéticos incluídos possuíam diferentes condutas aplicadas em relação ao controle glicêmico, como por exemplo, tratamento apenas com dieta e exercícios físicos.

No estudo de Guentsch et al. (2008) também foi verificado que tratamento periodontal foi efetivo em relação ao EO, onde houve uma diminuição dos níveis de MDA e da atividade de GSHPx na saliva de pacientes com periodontite e/ou fumantes, mas não nas taxas de fluxo de AO. Por outro lado, Novakovic et al. (2014), que também compararam abordagens diferentes em relação ao tratamento periodontal, verificaram um aumento na atividade de TAOC, AO não-enzimáticos (ácido úrico, albumina) e GPX e uma diminuição nos níveis de SOD na SALT de indivíduos com DP sistemicamente saudáveis que foram submetidos ao TPNC. Seus resultados sugerem que tanto os AOs enzimáticos como os não-enzimáticos, foram afetados pela inflamação durante sua baixa concentração, e seus níveis aumentaram de modo significativo com a redução da inflamação (após TPNC), indicando que os AO não-enzimáticos foram esgotados devido a eliminação de

produtos oxidativos secundários. Ainda, a redução da SOD após o tratamento corresponde a sua característica compensatória aumentada durante inflamação (Skaleric et al., 2000).

Na literatura foi pouco estudado o efeito do tratamento periodontal sobre o sistema peroxidase salivar. No presente estudo, o TPNC diminuiu significativamente a atividade de SPO no grupo DMPC, mas sem diferenças no grupo PC. Jentsch et al. (2004) também não verificaram diferenças significativas após o tratamento periodontal cirúrgico na atividade das POs nas salivas estimuladas e não-estimuladas em pacientes sistemicamente saudáveis com PC, embora tenham verificado uma redução significativa no FG. Gonçalves et al. (2008) avaliaram o efeito do TPNC nas atividades da SPO e MPO no FG de indivíduos DMPC e PC, nos quais foi verificada diminuição significativa de SPO e MPO após o TPNC. Fato interessante foi que Gonçalves et al. (2008) verificaram atividade de MPO estava mais diminuída nos pacientes DMDP após o TPNC quando comparados com indivíduos sistemicamente saudáveis que não receberam o tratamento, indicando efetividade na redução da infecção com conseqüente melhora nos parâmetros clínicos e enzimáticos.

Foi sugerido anteriormente que o tratamento periodontal poderia reduzir a inflamação e restaurar a sensibilidade à insulina, melhorando o controle metabólico de pacientes diabéticos (Miller et al., 1992; Grossi et al., 1997; Rodrigues et al., 2003). Sítios comprometidos nos pacientes portadores de PC do presente estudo alcançaram níveis de saúde após o TPNC, pela redução da inflamação com conseqüente repercussão nos níveis glicêmicos. A diminuição da hiperglicemia, mesmo que não significativa, refletiu juntamente com a MET através da diminuição da necessidade de AO, porém em níveis superiores aos de um normorreativo.

A queda do desafio bacteriano, conseqüência do TPNC, acompanhado pela redução da demanda pelos agentes de defesa locais resultou na diminuição da atividade de SPO, que conseqüentemente, através de um mecanismo compensatório pela busca do equilíbrio deste sistema redox, aumentou os níveis de TBARS. Este aumento do TBARS, embora significativo em relação ao baseline, não foi expressivo em relação aos demais grupos do baseline. Similarmente, os níveis de TAS e a atividade da SOD também podem ter sofrido influências do estado hiperglicêmico, que altera as funções glandulares e composição salivar, assim como do medicamento, que potencializa e/ou inibem a geração de ERO nos diabéticos,

resultando na ausência de diferenças entre os grupos estudados no baseline e após o TPNC.

Nós sugerimos a hipótese de que a própria condição de hiperglicemia do diabético repercute uma geração exacerbada de $O_2^{\bullet-}$ através das diversas vias existentes, que fisiologicamente são ativadas quando uma principal ou secundária é incapacitada ou limitada. Na cavidade oral existem diversos sistemas de defesa que contribuem para a sua homeostase, sendo o SPS o principal não-imunológico (Tenovuo; Pruitt, 1984). Com a diminuição da atividade da SPO, possivelmente outras vias são ativadas através de um mecanismo de compensação para a eliminação das ERO. A quantidade de H_2O_2 elevada decorrente da diminuição da atividade de SPO aumentaria a concentração de ânions OH^- disponíveis, que, levam a reação de LPO e conseqüentemente aumento dos níveis de TBARS. Este aumento, no entanto, não ultrapassa os níveis normoreativos que aparentemente são compatíveis com a busca pelo equilíbrio e saúde.

A maioria dos relatos de estudos sobre marcadores biológicos na periodontite utiliza o FG como fluido de amostra (Taba et al., 2005). O FG reflete apenas a inflamação relacionada a um sítio específico, diferentemente da saliva, que consiste em um fluido abundante que reflete o nível sistêmico, prático de se coletar e mais tolerável pelo paciente. A maior parte da água e pequenas moléculas neutras salivares são derivadas da vasculatura local (Miller et al., 2010), por isso, muitos componentes encontrados no plasma podem também ser detectados na saliva (Loo et al., 2010). A SALT representa a principal condição intra-oral relacionada ao estado e composição salivar, pois contém vestígios de FG, metabólitos teciduais, entre outros, tornando sua análise útil na determinação da degradação tecidual (Kaufman; Lamster, 2000). Sua estimulação pode induzir o aumento do fluxo do FG, causando um aumento artificial nos níveis de elementos que foram estudados e, concordando com isso, no presente estudo foi utilizado o método não-estimulado (Chapple et al., 1997; Sculley; Langley-Evans, 2002).

Uma das limitações do nosso estudo foi à ausência de dados enzimáticos sanguíneos e no FG, embora Reznick et al. (2006) tenham demonstrado que a composição AO no soro ser bem correlacionada com a saliva. A importância de estudos como este, mostra a possibilidade da utilização da saliva como um fluido válido para o diagnóstico e monitoramento mais rápido/instantâneo possibilitando criar um parâmetro para definir o perfil do paciente diabético.

Em nosso estudo optamos pela análise do marcador TBARS para verificar a destruição tecidual resultante da reação de LPO. Na avaliação do TBARS pode haver uma grande variabilidade intraindividual e interindividual da amostra coletada, o que dificulta a interpretação individual dos valores (Behuliak et al., 2009), motivo pelo qual sua mensuração é questionada na literatura (Halliwell; Whiteman, 2004; Chapple; Matthews, 2007). Entretanto foi demonstrado recentemente uma nítida associação entre o TBARS e a periodontite no tecido gengival (Borges et al., 2007), fato que habilita sua utilização como um marcador biológico. Diferentes populações, metodologias, modo de estimulação da saliva, utilização do conceito de capacidade ou concentração, além de diferentes classificações e tipos de tratamento da DP podem ter influenciado os resultados contraditórios encontrados na literatura.

Embora o foco deste estudo tenha sido a avaliação e o efeito do TPNC sobre o EO em diabéticos com periodontite, os achados do presente estudo evidenciam uma forte influência do principal medicamento anti-diabético utilizado sobre os marcadores salivares de EO. Considerando as hipóteses levantadas, é possível afirmar que a condição sistêmica do indivíduo DM2, juntamente com os efeitos dos mecanismos de ação da MET e as possíveis alterações observadas na composição salivar proveniente da alteração das glândulas salivares estejam refletidas na SALT, resultando em alterações no comportamento dos marcadores devido a uma possível adaptação em busca do equilíbrio deste sistema de EO.

Mais estudos precisam ser realizados para aumentar o entendimento do sistema EO e seus mecanismos compensatórios sobre o DM2 e a PC, assim como a influência e o mecanismo de ação da MET na periodontite e no DM2.

6. CONCLUSÃO

No baseline, os níveis de TBARS e atividade de SPO estiveram alterados nos pacientes DMPC com resultados que mostram correlação inversa entre TBARS/SPO, e após o TPNC houve nova alteração.

O diabetes mellitus, a doença periodontal e o tratamento periodontal não-cirúrgico não alteraram os níveis de antioxidantes dos pacientes estudados.

O comportamento dos níveis de marcadores de EO na saliva se mostrou alterada de modo que a busca pelo equilíbrio ocorreu por diversas vias e que este mecanismo pode ser alterado pelo uso de medicamentos, como a metformina.

REFERÊNCIAS¹

ADA. American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations 2005. Diabetes Care. 2005 Jan;28 Suppl 1:S1-79.

Akalin FA, Baltacioğlu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2007 Jul;34(7):558-65.

Akalin FA, İşiksal E, Baltacioğlu E, Renda N, Karabulut E. Superoxide dismutase activity in gingiva in type-2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis. Arch Oral Biol. 2008 Jan;53(1):44-52.

Akalin FA, Toklu E, Renda N. Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. J Clin Periodontol. 2005 Mar;32(3):238-43.

Alba-Loureiro TC, Munhoz CD, Martins JO, Cerchiaro GA, Scavone C, Curi R, Sannomiya P. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. Braz J Med Biol Res. 2007 Aug;40(8):1037-44. Review

Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. Periodontol 2000. 2002;29:177-206. Review.

Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. Periodontol 2000. 2002;29:7-10.

Allen EM, Matthews JB, O' Halloran DJ, Griffiths HR, Chapple IL. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. J Clin Periodontol. 2011 Oct;38(10):894-901.

Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. Diab Vasc Dis Res. 2011 Jan;8(1):22-8.

American Academy of Periodontology. Diabetes and periodontal diseases (position paper). J Periodontol 1999a;70:935-949.

¹De acordo com Estilo Vancouver

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.* 1999b; 4(1):i, 1-112.

Akpınar A, Toker H, Özdemir H, Bostancı V, Aydın H. The effects of non-surgical periodontal therapy on oxidant and anti-oxidant status in smokers with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2013 Jun;58(6):717-23.

American Diabetes Association Clinical Practice Recommendation. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26(suppl. 1):S106-S108.

Anderson LC, Garrett JR. Neural regulation of submandibular gland blood flow in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Arch Oral Biol.* 2004 Mar;49(3):183-91.

Araújo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol.* 2003 Dec;74(12):1736-40.

Aren G, Sepet E, Özdemir D, Dinççağ N, Güvener B, Firatlı E. Periodontal health, salivary status, and metabolic control in children with type 1 diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2003 Dec;74(12):1789-95.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999 Dec;4(1):1-6. Review.

Ashabi G, Khalaj L, Khodagholi F, Goudarzvand M, Sarkaki A. Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia. *Metab Brain Dis.* 2015 Jun;30(3):747-54.

Babior BM, Woodman RC. Chronic granulomatous disease. *Semin Hematol.* 1990 Jul;27(3):247-59. Review.

Bak EJ, Park HG, Kim M, Kim SW, Kim S, Choi SH, Cha JH, Yoo YJ. The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study. *J Periodontol.* 2010 Mar;81(3):412-9.

Bastos AS, Graves DT, Loureiro AP, Rossa Júnior C, Abdalla DS, Faulin Tdo E, Olsen Câmara N, Andriankaja OM, Orrico SR. Lipid peroxidation is associated with the severity of periodontal disease and local inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Aug;97(8):E1353-62.

Bauer V, Bauer F. Reactive oxygen species as mediators of tissue protection and injury. *Gen Physiol Biophys*. 1999 Oct;18 Spec No:7-14. Review.

Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999 Jan;48(1):1-9. Review.

Behuliak M, Pálffy R, Gardlík R, Hodosy J, Halcák L, Celec P. Variability of thiobarbituric acid reacting substances in saliva. *Dis Markers*. 2009;26(2):49-53.

Bird RP, Draper AH. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Meth Enzymol*. 1984;90:105–10

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;2007:45794.

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.

Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol*. 1996 Nov;67(11):1185-92.

Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol*. 2004 Jul;31(7):515-21.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.

Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, Kozłowski M, Machnik G, Liber S, Suchy D, Duława-Bułdak A, Okopień B. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol Rep*. 2014 Jun;66(3):418-29.

Canakci V, Yildirim A, Canakci CF, Eltas A, Cicek Y, Canakci H. Total antioxidant capacity and antioxidant enzymes in serum, saliva, and gingival crevicular fluid of preeclamptic women with and without periodontal disease. *J Periodontol*. 2007 Aug;78(8):1602-11.

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

Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*. 1997 May;24(5):287-96. Review.

Chapple IL. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *Clin Mol Pathol*. 1996 Oct;49(5):M247-55.

Chapple IL, Brock GR, Milward MR, Ling N, Matthews JB. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? *J Clin Periodontol*. 2007 Feb;34(2):103-10.

Chapple IL, Genco R; Working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4 Suppl):S106-12.

Chapple IL, Mason GI, Garner I, Matthews JB, Thorpe GH, Maxwell SR, Whitehead TP. Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Ann Clin Biochem*. 1997 Jul;34 (Pt4):412-21.

Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007;43:160-232. Review.

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.

Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):23S-30S. Review.

Cosić V, Antić S, Pesić M, Jovanović O, Kundalić S, Djordjević VB. Monotherapy with metformin: does it improve hypoxia in type 2 diabetic patients? *Clin Chem Lab Med.* 2001 Sep;39(9):818-21.

Darré L, Vergnes JN, Gourdy P, Sixou M. Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: A meta-analysis of interventional studies. *Diabetes Metab.* 2008 Nov;34(5):497-506.

DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia.* 1992 Apr;35(4):389-97. Review.

DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 1991 Mar;14(3):173-94. Review

Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329:977-986.

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.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes UKPDS *Lancet.* 1998 Sep 12;352(9131):854-65.

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.

Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006 Apr;77(4):591-8.

Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, Richard MJ, Favier A, Halimi S. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes*. 1999 Feb;48(2):353-7.

Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Casamitjana R, Ricart W. Novel interactions of adiponectin with the endocrine system and inflammatory parameters. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jun;88(6):2714-8.

Ficara AJ, Levin MP, Grower MF, Kramer GD. A comparison of the glucose and protein content of gingival fluid from diabetics and nondiabetics. *J Periodontal Res*. 1975 Jul;10(3):171-5.

Formoso G, De Filippis EA, Michetti N, Di Fulvio P, Pandolfi A, Bucciarelli T, Ciabattini G, Nicolucci A, Davì G, Consoli A. Decreased in vivo oxidative stress and decreased platelet activation following metformin treatment in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008 Mar-Apr;24(3):231-7.

Freitas JP, Filipe PM, Rodrigo FG. Lipid peroxidation in type 2 normolipidemic diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 1997 May;36(2):71-5.

Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 1997 Jul 25;272(30):18515-7. Review.

Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*. 1989 May 15;264(14):7761-4. Review.

Gargiulo P, Caccese D, Pignatelli P, Brufani C, De Vito F, Marino R, Lauro R, Violi F, Di Mario U, Sanguigni V. Metformin decreases platelet superoxide anion production in diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002 Mar-Apr;18(2):156-9.

Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2075-84.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1058-70.

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996 Mar;19(3):257-67. Review.

Giugliano D, Marfella R, Verrazzo G, Acampora R, Donzella C, Quatraro A, Coppola L, D'Onofrio F. Abnormal rheologic effects of glyceryl trinitrate in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and reversal by antioxidants. *Ann Intern Med.* 1995 Sep 1;123(5):338-43.

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.

Gorudko IV, Kostevich VA, Sokolov AV, Shamova EV, Buko IV, Konstantinova EE, Vasiliev VB, Cherenkevich SN, Panasenko OM. Functional activity of neutrophils in diabetes mellitus and coronary heart disease: role of myeloperoxidase in the development of oxidative stress. *Bull Exp Biol Med.* 2012 Nov;154(1):23-6.

Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res.* 2006 Jan;85(1):15-21. Review.

Graves DT, Liu R, Oates TW. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontol 2000.* 2007;45:128-37. Review

Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P, Pietschmann P, Prager R, Schnack C, Schernthaner G, et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med.* 1995 May;98(5):469-75.

Griffiths HR, Møller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB. Biomarkers. *Mol Aspects Med.* 2002 Feb-Jun;23(1-3):101-208. Review.

Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, Genco RJ. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol.* 1997 Aug;68(8):713-9.

Grossi SG, Zambon JJ, Hok AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994 Mar;65(3):260-7.

Guentsch A, Preshaw PM, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clin Oral Investig*. 2008 Dec;12(4):345-52.

Gümüş P, Buduneli N, Cetinkalp S, Hawkins SI, Renaud D, Kinane DF, Scott DA. Salivary antioxidants in patients with type 1 or 2 diabetes and inflammatory periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol*. 2009 Sep;80(9):1440-6.

Gustafsson A, Asman B. Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fc delta-receptor stimulation. *J Clin Periodontol*. 1996 Jan;23(1):38-44.

Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*. 1993;19(3):141-58. Review.

Gutteridge JM, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol*. 1989 Apr;2(2):195-256. Review.

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. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans*. 1996 Nov;24(4):1023-7. Review.

Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 1991 Sep 30;91(3C):14S-22S. Review.

Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*. 2000 Dec 1;486(1):10-3. Review.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994 Dec;102 Suppl 10:5-12. Review.

Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990 Jul;280(1):1-8. Review.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(2):231-55. Review

Hamp SE, Nyman S, Lindhe J. Periodontal treatment of multirooted teeth. Results after 5 years. *J Clin Periodontol*. 1975 Aug;2(3):126-35.

Hardie DG. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Sep;32 Suppl 4:S7-12

Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension*. 2006 Jun;47(6):1183-8.

He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*. 2004 Jan;145(1):447-52.

Hirsch HA, Iliopoulos D, Struhl K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 15;110(3):972-7.

IDF. International Diabetes Federation, 2013. 12.11.2014.
<http://www.idf.org/diabetesatlas>.

Imlay JA, Fridovich I. Superoxide production by respiring membranes of *Escherichia coli*. *Free Radic Res Commun*. 1991;12-13 Pt 1:59-66.

Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Kuzuya T, Ogawa H, Onishi A, Kobayashi T. AMP-activated protein kinase as a promoting factor, but complement and thrombin as limiting factors for acquisition of cytoprotection: implications for induction of accommodation. *Transpl Int*. 2013 Nov;26(11):1138-48.

Jacoby BH, Davis WL. The electron microscopic immunolocalization of a copper-zinc superoxide dismutase in association with collagen fibers of periodontal soft tissues. *J Periodontol*. 1991 Jul;62(7):413-20.

Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res*. 2005 Dec;84(12):1154-9.

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.

Kakkar V, Muppu SK, Chopra K, Kaur IP. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles: an efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013 Nov;85(3 Pt A):339-45.

Karima M, Kantarci A, Ohira T, Hasturk H, Jones VL, Nam BH, Malabanan A, Trackman PC, Badwey JA, Van Dyke TE. Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. *J Leukoc Biol*. 2005 Oct;78(4):862-70.

Katsuragi H, Ohtake M, Kurasawa I, Saito K. Intracellular production and extracellular release of oxygen radicals by PMNs and oxidative stress on PMNs during phagocytosis of periodontopathic bacteria. *Odontology*. 2003 Sep;91(1):13-8.

Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. *J Clin Periodontol*. 2000 Jul;27(7):453-65. Review.

Khalili J, Biloklytska HF. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. *Oral Dis*. 2008 Nov;14(8):754-60.

Kim SC, Kim OS, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci*. 2010 Aug;40(4):164-71.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005 May;77(5):598-625. Epub 2005 Feb 2. Review.

Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Offenbacher S, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. Effect of non-surgical periodontal therapy on C-reactive protein, oxidative stress, and matrix metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-2 levels in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *J Periodontol*. 2012 Jan;83(1):3-10.

Lalla E, Cheng B, Lal S, Kaplan S, Softness B, Greenberg E, Goland RS, Lamster IB. Diabetes-related parameters and periodontal conditions in children. *J Periodontol Res*. 2007 Aug;42(4):345-9.

Lalla E, Lamster IB, Stern DM, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products, inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: mechanisms and insights into therapeutic modalities. *Ann Periodontol*. 2001 Dec;6(1):113-8. Review.

Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem*. 1997 Jul 11;272(28):17810-4.

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.

Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, Graves DT. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res*. 2006;85:510-4

Liu R, Desta T, He H, Graves D. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology*. 2004;145:2997-3003.

Liljenberg B, Lindhe J, Berglundh T, Dahlén G, Jonsson R. Some microbiological, histopathological and immunohistochemical characteristics of progressive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1994 Nov;21(10):720-7

Lodovici M, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. Lipoperoxidation and antioxidant capacity in patients with poorly controlled type 2 diabetes. *Toxicol Ind Health*. 2009 May-Jun; 25(4-5):337-41.

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

Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res*. 2010 Oct;89(10):1016-23.

Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2106-15. Review.

Mahrouf M, Ouslimani N, Peynet J, Djelidi R, Couturier M, Therond P, Legrand A, Beaudeau JL. Metformin reduces angiotensin-mediated intracellular production of reactive oxygen species in endothelial cells through the inhibition of protein kinase C. *Biochem Pharmacol*. 2006 Jul 14;72(2):176-83.

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

Mandel ID. Salivary diagnosis: promises, promises. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Sep 20;694:1-10. Review.

Mandel ID, Wotman S. The salivary secretions in health and disease. *Oral Sci Rev*. 1976;(8):25-47. Review.

Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease. *J Periodontol*. 1981 Aug;52(8):410-5.

Matthews JB, Wright HJ, Roberts A, Ling-Mountford N, Cooper PR, Chapple IL. Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. *J Dent Res*. 2007 Aug;86(8):718-22.

McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*. 1993 Oct;26(5):351-7. Review.

McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244(22):6056-63.

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

Meschiari CA, Marcaccini AM, Santos Moura BC, Zuardi LR, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Salivary MMPs, TIMPs, and MPO levels in periodontal disease patients and controls. *Clin Chim Acta*. 2013 Jun 5;421:140-6.

Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, Floriano PN, Simmons G, Bhagwandin B, Jacobson JW, Redding SW, Ebersole JL, McDevitt JT. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med*. 2010 Feb;4(1):171-89. Review.

Miller LS, Manwell MA, Newbold D, Reding ME, Rasheed A, Blodgett J, Kornman KS. The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. *J Periodontol*. 1992 Oct;63(10):843-8.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. 1993 Apr;84(4):407-12.

Miyasaki KT, Nemirovskiy E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 1997 Feb;12(1):27-32.

Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Panahloo A, Goodrick S, Coppack SW, Yudkin JS. Relationships between plasma leptin and insulin concentrations, but not insulin resistance, in non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1997 May;14(5):376-80.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Nelson DE, Engelgau MM, Vinicor F, Marks JS. The continuing increase of diabetes in the US. *Diabetes Care*. 2001 Feb;24(2):412.

Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res*. 1994 Nov-Dec;21(6):417-25.

Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Sep;92(3):281-91.

Nagler R, Marmary Y, Fox PC, Baum BJ, Har-El R, Chevion M. Irradiation-induced damage to the salivary glands: the role of redox-active iron and copper. *Radiat Res*. 1997 Apr;147(4):468-76.

Nagler RM, Reznick AZ, Slavin S, Nagler A. Partial protection of rat parotid glands from irradiation-induced hyposalivation by manganese superoxide dismutase. *Arch Oral Biol*. 2000 Sep;45(9):741-7.

Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med*. 2002 Feb 1;32(3):268-77.

Naguib G, Al-Mashat H, Desta T, Graves DT. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. *J Invest Dermatol*. 2004 Jul;123(1):87-92.

Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Sep 20;694:72-7. Review.

Nicolau J. Fundamentos de Odontologia – fundamentos de bioquímica oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008

Nicolau J, de Matos JA, de Souza DN, Neves LB, Lopes AC. Altered glycogen metabolism in the submandibular and parotid salivary glands of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Oral Sci*. 2005 Jun;47(2):111-6.

Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol*. 1998 Jul; 3(1):20-9

Novakovic N, Todorovic T, Rakic M, Milinkovic I, Dozic I, Jankovic S, Aleksic Z, Cakic S. Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *J Periodontal Res*. 2014 Feb;49(1):129-36.

Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*. 2003;32:11-23. Review.

O'Brien PJ. Peroxidases. *Chem Biol Interact*. 2000 Dec 1;129(1-2):113-39. Review.

Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996 Nov;1(1):821-78. 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

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

Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;10(2):255-64.

Paques M, Massin P, Gaudric A. Growth factors and diabetic retinopathy. *Diabetes Metab.* 1997 Apr;23(2):125-30. Review.

Pavlović D, Kocić R, Kocić G, Jevtović T, Radenković S, Mikić D, Stojanović M, Djordjević PB. Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2000 Aug;2(4):251-6.

Pendyala G, Thomas B, Joshi SR. Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in Type 2 Diabetic Patients with and without Periodontal Disease: A Case-Control Study. *N Am J Med Sci.* 2013 Jan;5(1):51-7.

Peterson GL. Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 1983;91:95-119.

Pihlstrom BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol 2000.* 2001;25:37-58. Review

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 2012 Jan;55(1):21-31 Review.

Pruitt KM. The salivary peroxidase system: thermodynamic, kinetic and antibacterial properties. *J Oral Pathol.* 1987 Sep;16(8):417-20. Review.

Rejnmark L. Bone effects of glitazones and other anti-diabetic drugs. *Curr Drug Saf.* 2008 Sep;3(3):194-8. Review.

Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol.* 2006 Aug;51(8):640-8

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 2009 May 22;84(21-22):705-12.

Rodrigues DC, Taba MJ, Novaes AB, Souza SL, Grisi MF. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2003 Sep;74(9):1361-7. Erratum in: *J Periodontol.* 2004 May;75(5):780.

Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem.* 1998 Mar;35(Pt 2):181-200. Review.

Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006 Apr;64(4):355-65. Review.

Sakamoto W, Fujii Y, Kanehira T, Asano K, Izumi H. A novel assay system for myeloperoxidase activity in whole saliva. *Clin Biochem.* 2008 May;41(7-8):584-90.

Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997 Jun;14:173-201. Review

Sammalkorpi K. Glucose intolerance in acute infections. *J Intern Med.* 1989 Jan;225(1):15-9

Sardi Jde C. Oxidative stress in diabetes and periodontitis. *N Am J Med Sci.* 2013 Jan;5(1):58-9.

Saremi A, Nelson RG, Tulloch-Reid M, Hanson RL, Sievers ML, Taylor GW, Shlossman M, Bennett PH, Genco R, Knowler WC. Periodontal disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005 Jan;28(1):27-32.

Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc.* 2002 Feb;61(1):137-43. Review.

Sculley DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin Sci (Lond).* 2003 Aug;105(2):167-72

Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta.* 2002 Jul;321(1-2):89-96.

Sheikhi M, Bouhafs RK, Hammarström KJ, Jarstrand C. Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from *Fusobacterium*-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis. *Oral Dis.* 2001 Jan;7(1):41-6.

Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):31S-38S. Review.

Skaleric U, Manthey CM, Mergenhagen SE, Gaspiric B, Wahl SM. Superoxide release and superoxide dismutase expression by human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2000 Apr;108(2):130-5.

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.

Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME. Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit.* 2000 Sep-Oct;6(5):875-81.

Sonoki K, Nakashima S, Takata Y, Naito T, Fujisawa K, Ootsubo T, Wakisaka M, Iwase M, Iida M, Yokota M. Decreased lipid peroxidation following periodontal therapy in type 2 diabetic patients. *J Periodontol.* 2006 Nov;77(11):1907-13.

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

Sreebny L. Saliva--salivary gland hypofunction (SGH). FDI Working Group 10. *J Dent Assoc S Afr.* 1992 Nov;47(11):498-501.

Su H, Gornitsky M, Velly AM, Yu H, Benarroch M, Schipper HM. Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. *Free Radic Biol Med.* 2009 Apr 1;46(7):914-21.,

Su H, Velly AM, Salah MH, Benarroch M, Trifiro M, Schipper HM, Gornitsky M. Altered redox homeostasis in human diabetes saliva. *J Oral Pathol Med.* 2012 Mar;41(3):235-41.

Susin C, Haas AN, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Gingival recession: epidemiology and risk indicators in a representative urban Brazilian population. *J Periodontol.* 2004 Oct;75(10):1377-86.

Suttle NF, McMurray CH. Use of erythrocyte copper:zinc superoxide dismutase activity and hair or fleece copper concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. *Res Vet Sci.* 1983 Jul;35(1):47-52.

Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005 Jul;49(3):551-71, vi. Review.

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.

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

Trivedi S, Lal N, Mahdi AA, Mittal M, Singh B, Pandey S. Evaluation of antioxidant enzymes activity and malondialdehyde levels in patients with chronic periodontitis and diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2014 May;85(5):713-20.

Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the U.S. adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002;30:182-92.

Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2005 Oct;40(5):378-84.

Tüter G, Kurtiş B, Serdar M. Interleukin-1beta and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2001 Jul;72(7):883-8.

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.

Van Dyke TE, Lester MA, Shapira L. The role of the host response in periodontal disease progression: implications for future treatment strategies. *J Periodontol*. 1993 Aug;64(8 Suppl):792-806. Review.

Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*. 2003 Feb;82(2):82-90. Review.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia*. 2005 Jul;48(7):1292-9.

Virtue MA, Furne JK, Nuttall FQ, Levitt MD. Relationship between GHb concentration and erythrocyte survival determined from breath carbon monoxide concentration. *Diabetes Care*. 2004;27:931-5.

Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis*. 2000 May;6(3):138-51. Review.

Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J*. 2010 Mar;55(1):70-8.

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.

Wong DT. Salivary diagnostics. *J Calif Dent Assoc*. 2006 Apr;34(4):283-5.

Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci*. 1983 May;34(3):253-6

Yaku K, Matsui-Yuasa I, Konishi Y, Kojima-Yuasa A. AMPK synergizes with the combined treatment of 1'-acetoxychavicol acetate and sodium butyrate to upregulate phase II detoxifying enzyme activities. *Mol Nutr Food Res*. 2013 Jul;57(7):1198-208.

Zhou L, Wang X, Yang Y, Wu L, Li F, Zhang R, Yuan G, Wang N, Chen M, Ning G. Berberine attenuates cAMP-induced lipolysis via reducing the inhibition of phosphodiesterase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr;1812(4):527-35.

Zloczower M, Reznick AZ, Zouby RO, Nagler RM. Relationship of flow rate, uric acid, peroxidase, and superoxide dismutase activity levels with complications in diabetic patients: can saliva be used to diagnose diabetes? *Antioxid Redox Signal*. 2007 Jun;9(6):765-73.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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: _____

Nº 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^o 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 FOUUSP: 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 A - Parecer CEP- 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 B - Parecer CEP - UNIFESP

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

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- FOU SP.

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