MARIANA DE SOUSA RABELO

Alteração da homeostase imunológica mediada pelas células dendríticas em indivíduos com hiperglicemia portadores de periodontite crônica generalizada

São Paulo

2017

MARIANA DE SOUSA RABELO

Alteração da homeostase imunológica mediada pelas células dendríticas em indivíduos com hiperglicemia portadores de periodontite crônica generalizada

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obter o título de Doutor em ciências, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito

São Paulo

2017

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

Rabelo, Mariana de Sousa.

Alteração da homeostase imunológica mediada pelas células dendríticas em indivíduos com hiperglicemia portadores de periodontite crônica generalizada / Mariana de Sousa Rabelo ; orientador Giuseppe Alexandre Romito. -- São Paulo, 2017.

72 p. : fig., tab.; 30 cm.

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

Versão corrigida

1. Periodontite crônica. 2. Diabetes Mellitus. 3. Porphyromonas gingivalis. 4. Periodontia. I. Romito, Giuseppe Alexandre. II. Título.

Rabelo MS. Alteração da homeostase imunológica mediada pelas células dendríticas em indivíduos com hiperglicemia portadores de periodontite crônica generalizada. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 25/09/2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovada

Prof.^a Dra. Marina Helena Cury Gallotini Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Francisco Nociti Instituição: FOP/UNICAMP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Cristiano Susin Instituição: AUGUSTA UNIVERSITY

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Marinella H. Caldeira Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, pela esmerada educação e pela criação livre, repleta de possibilidades amplas. À minha mãe **Olga**, que sempre nos incentivou tanto na busca por um futuro profissional sólido. Mãe apaixonada pelo ofício, meu melhor colo e grande amiga. Ao meu pai **Francisco**, ser humano grandioso e exemplo de dedicação à vida acadêmica. Pai presente, amoroso, meu conselheiro e fonte de inspiração.

Ao meu noivo **Leonardo**, que sempre me apoiou durante a minha trajetória, e em especial durante o meu doutorado. Obrigada por toda compreensão e dedicação. Você é o meu grande parceiro de vida!

À minha irmã **Yana** e ao meu cunhado **Thiago**, muito obrigada pelo amor, cuidados e amizade. Obrigada pela grata e apaixonante surpresa que vocês me deram na reta final deste trabalho. **Júlia**, você encheu o coração da madrinha de alegria antes mesmo do seu nascimento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito**, obrigada por investir e por confiar em mim. Obrigada também pelas oportunidades e pelas portas que você me abriu e abre. Serei sempre grata por ter me recebido como sua orientanda. Sua trajetória, que muito admiro, tem sido de grande valia para o meu crescimento profissional. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Cristiano Susin**, cuja amizade, *mentorship* e conselhos não só contribuíram para a minha formação como doutora, mas também me transformaram como pessoa. Toda a minha admiração e gratidão ao “*dear mentor/freakin genius*”. Você será sempre uma grande inspiração, não só pela sua capacidade intelectual, mas também pelo ser humano que é.

To Dr. Cristopher W. Cutler who gave me the opportunity to grow as a researcher in his lab. Thank you for everything you taught me, for allowing me to be part of your team and for all the help and support that made this work happen.

To Dr. Ulf Wikesjö for the valuable lessons and mentoring. Thank you also for your friendship and affection. Get to know you, and have the opportunity to work with you, was certainly a milestone in my life.

To Ahmed El-Awady who more than a colleague and a teacher was a great friend. Your contribution to this work since 2013 was very important to this final achievement. Thank you!

Ao **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti** por tudo que me ensinou ao longo desses anos e por toda a preocupação, ajuda e disponibilidade mesmo no período em que estive fora do país.

Aos demais professores da Periodontia, Profs. Drs. **Cesário Antônio Duarte, Cristina Villar, Francisco Emilio Pustiglioni, Giorgio De Micheli, João Batista César Neto, Luciana Saraiva de Campos, Luiz Lima, Marco Georgetti, Marina Conde e Marinella Holzhausen Caldeira**; vocês contribuíram muito para a minha formação nesta casa, desde a graduação. Sou muito grata por todos os ensinamentos. Obrigada!

À **Adriana Moura Foz**, por tudo que vivemos juntas ao longo destes anos e, principalmente, pelo carinho e atenção de amiga/irmã comigo, sempre. Sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho, minha *sister* paulistana. Obrigada, Didinha!

Ao **Giovane Hisse Gomes**, pela amizade, parceria e disposição em contribuir para este projeto. Sua ajuda foi de grande valia para que eu pudesse realizar esta pesquisa. Obrigada por tudo.

*To **Mythilpriya Rajendran** for her help in the lab and contribution to this work. Thank you!*

*To **Scott Lawry** for his contribution to this work. You were the best undergraduate student that I could wish for. Thank you for your help!*

À **Amanda Stadler** pela amizade e parceria de trabalho. Amandoca, obrigada por dividir comigo tantos momentos bons e também as angústias durante o meu período fora do país.

À **Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer**, pela disponibilidade e por abrir as portas do seu laboratório para mim, sempre que foi preciso.

À **Priscila Larcher Longo**, pela amizade e por toda a disposição em me ajudar, sempre.

*To **Augusta University**, all faculty, staff and colleagues that gave me help and support. Special thanks to **Angela Steen**. Angela, without you my life would have been much more difficult.*

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia da Profa. Marcia Mayer (ICB USP), por toda a parceria e ajuda na fase inicial deste trabalho.

À família **Susin** que preencheu meus dias em Augusta de amor e carinho. Obrigada minha querida amiga **Lisiane Susin**, por tudo! Obrigada por todo o suporte e por dividir os seus dois filhotes lindos e fofos com a Tia Mary.

À família **Moreira**, Carlos Heitor, Mirna, Luiza e Camila que me acolheram desde a minha chegada em Augusta como se eu já fosse “de casa”. Vocês fizeram a diferença! Obrigada por me tornarem parte desta grande e amorosa família, cheia de filhos “adotivos”.

Ao **Umberto Demoner Ramos** mais um grande amigo que Augusta me deu de presente! A sua amizade e apoio fizeram a diferença nessa caminhada.

Aos meus queridos amigos e colegas de pós-graduação: **Mariana Rocha, Marcelo Sirolli e Priscila Vivas**. Obrigada pela amizade e companheirismo.

Aos demais colegas da pós-graduação que tive o prazer de conviver nestes últimos sete anos.

À **Isabella Tomazelli** amiga querida e parceira de trabalho, sempre presente! Obrigada pelo apoio, Isoca!

Às minhas queridas amigas do período da graduação FOUSP: **Talita Holanda, Valéria Ribeiro, Cláudia Piedade, Andréa Queiroz, Heloisa Viana e Graziella de Paula**. A amizade de vocês foi um presente aqui em São Paulo.

Aos meus amigos e amigas de Goiânia que acompanharam a minha caminhada desde muito cedo e que, mesmo de longe, sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos e objetivos. Um agradecimento especial para: **Ana Bárbara Canedo, Andréia Crisóstomo, Amanda Santos, Angel Rassi, Daniela Araújo, Lara Rassi, Larissa Vasconcelos, Lívia Junqueira, Marcella Santos, Marina Faria e Murillo Bonfim Santos**.

Aos meus primeiros “alunos” de clínica que me fizeram ter ainda mais vontade de continuar trilhando um caminho na vida acadêmica.

À secretária e à técnica da Disciplina de Periodontia por toda a ajuda e amizade.

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

À **FAPESP**, pelo Auxílio à Pesquisa (protocolo no 2011/06982-4)

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

Ao Programa Ciência sem Fronteiras pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

RESUMO

Rabelo MS. Alteração da homeostase imunológica mediada pelas células dendríticas em indivíduos com hiperglicemia portadores de periodontite crônica generalizada [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito da hiperglicemia na alteração da homeostase imunológica mediada pelas células dendríticas (DCs) em resposta a uma bacteremia induzida por raspagem e alisamento radicular (RAR) em indivíduos com periodontite crônica generalizada (GCP). Foram selecionados 60 indivíduos igualmente divididos em quatro grupos: controles normoglicêmicos saudáveis, normoglicêmicos com GCP (NG+GCP), pré-diabéticos com GCP (PD+GCP) e diabéticos tipo 2 com GCP (T2DM+GCP). Os indivíduos com GCP receberam RAR, o que induziu uma bacteremia aguda e os controles saudáveis receberam apenas raspagem supragengival. Todos os participantes foram avaliados no início do estudo, 24hs, 1 mês e 3 meses após a raspagem. A frequência de células dendríticas mielóides (mDCs) CD1c⁺, mDCs CD141⁺, células dendríticas plasmocitoides (pDCs) CD303⁺ e a expressão dos receptores CCR6 (presente em altos níveis em células dendríticas imaturas) e CCR7 (presente em altos níveis em células dendríticas maduras) foram avaliados por citometria de fluxo. Foi utilizada técnica de PCR em tempo real para investigar a presença de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) no biofilme e abrigada pelas DCs. No início do estudo, os indivíduos hiperglicêmicos com GCP tinham níveis de DCs significativamente mais baixos do que os indivíduos normoglicêmicos com ou sem GCP. Após a bacteremia induzida por RAR, observou-se um aumento significativo nos níveis de CD1c⁺ e CD1c⁺CCR6⁺ em todos os grupos com GCP, independentemente do status de glicemia, e esses níveis voltaram aos níveis basais após 1 mês. Em comparação com o grupo NG+GCP, o grupo T2DM+GCP apresentou níveis significativamente mais baixos de DCs ao longo de todos os períodos experimentais. Não foram observadas alterações significativas para CD303⁺, CD1c⁺ CCR7⁺ e CD141⁺ em resposta à bacteremia; CD303⁺ e CD141⁺ foram significativamente mais baixos para T2DM+GCP comparado ao grupo NG+GCP ao longo do estudo. A quantidade de *P.*

gingivalis nas DCs estava aumentada no grupo NG+GCP no início do estudo e após 24h da RAR comparado ao controle, mas não nos grupos hiperglicêmicos. Os resultados permitiram concluir que a hiperglicemia parece afetar negativamente a presença de mDCs e pDCs no sangue periférico e a habilidade dessas células em capturar *P. gingivalis*. Considerando que a magnitude da expansão de mDCs em resposta a um desafio bacteriano foi semelhante, os indivíduos hiperglicêmicos permaneceram imunocomprometidos em comparação com indivíduos normoglicêmicos.

Palavras-chave: Célula dendrítica. Periodontite crônica. Diabetes Mellitus tipo 2. *Porphyromonas gingivalis*.

ABSTRACT

Rabelo MS. Disruption of Dendritic cell mediated immune homeostasis in hyperglycemic subjects with generalized chronic periodontitis [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

The objective of this study was to investigate the effect of hyperglycemia in the disruption of dendritic cells (DCs) mediated immune homeostasis in response to an acute short-term bacteremia in subjects with generalized chronic periodontitis (GCP). Sixty subjects equally divided into four groups were selected: normoglycemic healthy controls, normoglycemics with GCP (NG+GCP), pre-diabetics with GCP (PD+GCP), and type-2 diabetes mellitus with GCP (T2DM+GCP). Subjects with GCP received full-mouth scaling and root planning (SRP), which induced an acute bacteremia, while healthy controls received only a prophylaxis. All participants were examined at baseline, 24hs after SRP, 1 month, and 3 months. The frequency of CD1c⁺ myeloid DCs (mDCs), CD141⁺ mDCs, CD303⁺ plasmacytoid DCs (pDCs) and their expression of immature DC tissue homing receptor CCR6⁺ and secondary lymphoid organ (SLO)-homing receptor CCR7⁺ were analyzed by flow cytometry. The presence of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) mRNA within blood DCs was analyzed by real time PCR. At baseline, hyperglycemic subjects with GCP showed lower DC levels than normoglycemic subjects with or without GCP. After SRP induced bacteremia, a significant increase in CD1c⁺ and CD1c⁺CCR6⁺ levels was observed in all GCP groups, which returned to baseline levels after 1 month. Compared to NG+GCP, T2DM+GCP had significantly lower levels of DCs throughout the experimental periods. No significant changes were observed for CD303⁺, CD1c⁺CCR7⁺ and CD141⁺ in response to the bacteremia; CD303⁺ and CD141⁺ were significantly lower for T2DM+GCP than NG+GCP throughout the study. *P. gingivalis* carriage state of DCs was increased in the NG+GCP group, but not in the hyperglycemic groups. Hyperglycemia appears to negatively affect the pool of mDCs and pDCs and the ability of blood DCs to capture bacteremic *P. gingivalis*. Whereas the magnitude of mDCs expansion in response to a bacterial challenge was similar, hyperglycemic subjects remained immunocompromised in comparison to

normoglycemic subjects.

Keywords: Diabetes mellitus type 2. Chronic periodontitis. Dendritic cell.
Porphyromonas gingivalis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrando células dendríticas derivadas de monócitos em co-cultura com diferentes cepas de <i>P. gingivalis</i>	24
Figura 4.1 - <i>Foward e Side Scatter plots</i> representativos dos sucessivos <i>gates</i> para a determinação da população alvo	32
Figura 4.2 - Curva padrão da <i>Porphyromonas gingivalis</i>	33
Figura 5.1 - Fluxograma do estudo.	37
Figura 5.2 - Gráficos de linha representativos das mudanças nos parâmetros clínicos periodontais ao longo do tempo.....	41
Figura 5.3 - Plots representativos da análise por citometria de fluxo	42
Figura 5.4 - Análise de citometria de fluxo para as subpopulações de DCs circulantes do sangue no baseline.....	45
Figura 5.5 - Análise de citometria de fluxo para as subpopulações de DCs circulantes no sangue ao longo do tempo	47
Figura 5.6- Contagem de <i>P. gingivalis</i> no biofilme e nas <i>Pan</i> -DCs circulantes no <i>baseline</i>	50
Figura 5.7- Contagem de <i>P. gingivalis</i> nas <i>Pan</i> -DCs circulantes 24h após a bacteremia induzida por RAR	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Referências dos anticorpos utilizados para as análises de citometria de fluxo	31
Tabela 5.1- Dados demográficos dos grupos no <i>baseline</i>	38
Tabela 5.2- Comparação das médias e desvios padrões dos parâmetros clínicos periodontais no <i>baseline</i>	39
Tabela 5.3- Diferença nos parâmetros clínicos periodontais 3 meses após RAR, apresentados através de média e desvio padrão..	40
Tabela 5.4- Comparação das medianas e quartis (25-75%) das subpopulações de DCs circulantes em cada um dos <i>time points</i>	48
Tabela 5.5- Mudanças nas subpopulações de DCs avaliadas (valores de Δ), à partir do <i>baseline</i> para 24h, 1 mês e 3 meses após RAR.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP	Academia americana de periodontia/ <i>American Academy of Periodontology</i>
ADA	Academia Americana de Diabetes / <i>American diabetes association</i>
AGE	Produto final de glicação avançada / <i>Advanced glycation end products</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CFU	Unidade formadora de Colônia / <i>Colony Forming Units</i>
CP	Periodontite crônica/ <i>Chronic Periodontitis</i>
CT	Cycle Threshold
DP	Doença Periodontal
EUA	Estados Unidos da América
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GCP	Generalized Chronic Periodontitis
HbA1c	Hemoglobina glicada
IG/GI	Índice gengival / <i>gingival index</i>
IMC	Índice de massa corpórea
IP/PI	Índice de placa / <i>plaque index</i>
m	Meses
mm	Milímetros
n	Número de pacientes
NCI/CAL	Nível clínico de inserção / <i>clinical attachment level</i>
NG	Normoglicêmico/ <i>normoglycemic</i>
OHB	Orientação de higiene bucal
p	nível de significância
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCS/PD	Profundidade clínica de sondagem / <i>probing depth</i>
PD	Pré-diabetes/ <i>pre-diabetes</i>
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
qrt-PCR	PCR em tempo real/ <i>Real time PCR</i>

RAR	Raspagem e alisamento radicular
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
SRP	Scaling and Root Planning
SS/BOP	Sangramento à sondagem / <i>bleeding on probing</i>
T2DM	Diabetes Mellitus tipo 2/ <i>Type 2 Diabetes Mellitus</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TE	Tampão biológico
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão / <i>Transmission electron microscopy</i>
TP	Tratamento periodontal
UNC	University of North Carolina
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Registered trademark
+	Mais
<	Menor
>	Maior
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
3	PROPOSIÇÃO	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Delineamento do estudo	27
4.2	Seleção da Amostra	27
4.3	Anamnese e exame clínico periodontal	28
4.4	Tratamento Periodontal	29
4.5	Coleta de Sangue Periférico	30
4.6	Coleta de biofilme subgengival	30
4.7	Imunofenotipagem das DCs por Citometria de Fluxo	31
4.8	Análise microbiológica	32
4.8.1	Extração de RNA das amostras	32
4.8.2	PCR em tempo Real	32
4.9	Cálculo Amostral	34
4.10	Análise Estatística	34
5	RESULTADOS	36
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

A periodontite crônica (CP) é uma doença inflamatória induzida por um biofilme bacteriano, que leva a destruição dos tecidos periodontais e do osso alveolar e, eventualmente, a perda dentária (Armitage et al., 2003). As células inflamatórias, que modulam a resposta do hospedeiro, incluem neutrófilos, células B, células T CD4+, macrófagos e células dendríticas (DCs) (Hajishengallis, 2015). As DCs são consideradas "guardiões do sistema imunitário" (Nobelförsamlingen, 2011), devido ao seu papel de discriminar patógenos microbianos e rapidamente induzir uma resposta apropriada das células T (Chung et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que indivíduos com CP apresentam episódios frequentes de bacteremia ao realizarem atividades cotidianas e que a manipulação dos tecidos periodontais induz uma bacteremia aguda de curto prazo e, conseqüentemente, uma resposta inflamatória sistêmica (Horliana et al., 2014; Barbosa et al., 2015; Kinane et al., 2015). Estudos recentes têm investigado o papel da CP em causar uma expansão do *pool* de DCs circulantes em resposta à bacteremia em indivíduos saudáveis do ponto de vista sistêmico (Carrion et al., 2012; Miles et al., 2013). Provavelmente, a expansão ocorre como resultado do transporte bacteriano das DCs. A este respeito, demonstrou-se que o periodontópatógeno *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) invade as DCs através da sua fímbria curta (*mfa1*) e pode perturbar a destruição autofágica que ocorre nestas células, interferindo na maquinaria antibacteriana intracelular. Os mecanismos pelos quais a *mfa1* interfere com a destruição autofágica ainda não estão esclarecidos, mas, aparentemente, esta interferência acaba possibilitando a persistência e sobrevivência dos periodontópatógenos nas DCs (El-Alwady et al., 2015a). Além disso, análises do fenótipo e do estado de maturação das mDCs em pacientes com periodontite crônica demonstraram que estas células são funcionalmente imaturas, sugerindo que o desenvolvimento de uma resposta imune protetora pode estar comprometida (Carrion et al., 2012; Miles et al., 2014a). Coletivamente, esses achados indicam uma alteração na resposta imune mediada por DCs na CP.

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizado por resistência à insulina e que afeta mais de 400 milhões de indivíduos no mundo todo (American Diabetes Association, 2016). Os Diabéticos demonstraram ter uma resposta imune e inflamatória alterada, incluindo diminuição da adesão, quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos, e uma função estimulada de monócitos e macrófagos (Naguib et al., 2004). Existe pouca evidência com relação ao efeito da diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) no *pool* de DCs circulantes. Seifarth et al. (2008) e Blank et al. (2012) observaram uma porcentagem reduzida DCs circulantes em indivíduos com DMT2. Em contraste, Musilli et al. (2011) observaram um aumento de mDCs em indivíduos obesos com DMT2. Até o momento atual, nenhum estudo investigou o efeito da hiperglicemia no *pool* de células dendríticas circulantes em indivíduos portadores de periodontite crônica generalizada (GCP) e a influência da hiperglicemia na resposta destas células a uma bacteremia aguda.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A destruição periodontal é resultado de uma resposta inflamatória induzida por biofilme, modulada através da ação combinada da imunidade inata e adaptativa (Pihlstrom et al., 2005; Costalonga; Herzberg, 2014). A imunidade inata dos tecidos periodontais é mediada por células do epitélio, ligamento periodontal, fibroblastos, osteoblastos e células dendríticas (Hans; Hans, 2011). Neste contexto, as células dendríticas (DCs) desempenham um papel importante na apresentação de antígenos, atuando como reguladoras de tolerância e proteção (El-Awady et al., 2015a). Essas células foram descobertas por Steinman e Cohn, em 1973, como uma nova linhagem de células nos órgãos linfoides de camundongos. Distinta dos macrófagos e por possuir projeções, foram denominadas células dendríticas (do grego “dendron”, que significa árvore). Embora estas células representem apenas 1% do total de leucócitos mononucleares do sangue periférico, desempenhando um papel fundamental no patrulhamento de antígenos. Elas se originam na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes (Steinman; Cohn, 1973; Joffre et al., 2009).

As DCs capturam e processam antígenos e expressam as moléculas co-estimuladoras e as citocinas necessárias para a apresentação desse antígeno aos linfócitos B e T. Este tipo de célula também desempenha um papel essencial na tolerância das células T aos auto-antígenos, minimizando as reações autoimunes. Sendo assim, elas exercem um papel fundamental na decisão de desencadear uma resposta imune contra bactérias patogênicas e tolerar microorganismos comensais, podendo contribuir para a patogênese de diversas condições inflamatórias, quando a homeostase imunológica mediada por elas é interrompida ou alterada (Banchereau; Steinman, 1998).

As células dendríticas são comumente distinguidas pela sua localização nos tecidos periféricos, nos órgãos linfoides secundários ou no sistema circulatório. As células dendríticas residentes no tecido, chamadas de células de Langerhans ou de células dendríticas intersticiais, têm períodos de vida

relativamente longos e cumprem um papel ativo na vigilância imunológica. As células dendríticas circulantes sanguíneas são divididas com base no fenótipo e na função em três tipos gerais: células dendríticas plasmocitoides e dois tipos de células dendríticas convencionais ou mielóides (CD1c⁺ ou CD141⁺) (Dzionek et al., 2000). As células dendríticas plasmocitoides derivam de progenitores linfóides e assemelham-se as células plasmáticas. São comumente identificadas pela expressão de CD123, CD303 e CD304, e também dos receptores do tipo toll (TLR) 7 e 9. Estas células são importantes na resposta imune inata aos vírus. Para tanto, lançam mão de receptores de reconhecimento padrão (RRPs) localizados nas membranas dos endossomos (TLR 7 e 9) e no citosol (Cervantes-Barragan et al., 2012).

As células dendríticas mielóides (mDCs) são células altamente fagocíticas, que reconhecem antígenos bacterianos e virais (MacDonald et al., 2002). Estas células podem ser caracterizadas pela expressão de CD1c⁺ (BDCA-1⁺) ou CD141⁺. As células dendríticas mielóides CD1c⁺ expressam todos os receptores tipo toll (exceto TLR 9), enquanto que as células dendríticas mielóides CD141⁺ expressam um padrão mais restrito de receptores do tipo toll, sugerindo um papel mais específico na imunidade antiviral (Ziegler-Heitbrock et al., 2010; Hemont et al., 2013). Estas células estão amplamente distribuídas no corpo e podem regular as funções de ativação ou tolerância imunológica, dependendo do seu estado de maturação e perfil de citocinas. As mDCs estão normalmente presentes em uma quantidade muito baixa no sangue (menos de 1% de todos os leucócitos em circulação). O aumento ou a queda no número de mDCs no sangue é muitas vezes uma marca característica de doenças crônicas inflamatórias ou infecciosas (Miles et al., 2014b).

Um estudo clínico recente mostrou que o *pool* de CD1c⁺ mDCs está expandido em indivíduos com CP, quando comparados a controles saudáveis. Essa expansão mostrou-se ainda mais aumentada após a ocorrência de uma bacteremia induzida por RAR (Carrion et al., 2012). Esse resultado conjuntamente com os resultados de outros dois estudos (Miles et al., 2013; Miles et al., 2014a) indicam que a expansão parece ser resultado do transporte microbiano de alguns periodontopatogênicos, como por exemplo *P. gingivalis*. A este respeito, foi demonstrado *in vitro* que a *P. gingivalis* tem a capacidade de invadir as DCs através da sua fímbria curta (*mfa1*), sendo então capazes de

interferir na maquinaria intracelular, possibilitando a sobrevivência e a persistência desses patógenos nas DCs (El-Awady et al., 2015b) (Figura 2.1).

Figure 2.1- Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrando células dendríticas derivadas de monócitos em co-cultura com diferentes cepas de *P. gingivalis* após 2, 12 e 24h. A cepa Pg 381 é caracterizada pela presença de ambas as fímbrias, principal ou longa (*fimA*) e curta (*mfa1*). Para o controle foi utilizada a cepa MFB caracterizada pela ausência de ambas as fímbrias. Observamos um maior número de Mfa1+Pg nas DCs, principalmente após 24h, quando comparada a todas as demais cepas

Fonte: El-Awady et al. (2015b, p. 28)

As DCs podem manifestar vários fenótipos, o que desempenha um grande controle sobre a migração destas células. A migração de DCs imaturas para os tecidos periféricos é um processo controlado pelos pares de quimiocinas e seus receptores/ligantes, por exemplo CCR6-CCL20 (Randolph et al., 2008). À medida que as DCs migram e adquirem o antígeno, o CCR6 é *downregulated* e

o CCR7 é *upregulated*, o que facilita o SLO *homing* (migração para os órgãos linfoides secundários) e o envolvimento das células T (Zlotnic; Yoshie, 2000). Estudos *in vitro* demonstraram que as mDCs induzidas no sangue periférico de indivíduos com CP têm um perfil migratório único, caracterizado por baixa expressão de CCR7 (Miles et al., 2014a) e alta expressão de CCR6. Este resultado sugere que as mDCs induzidas pela presença da CP são funcionalmente imaturas, o que poderia impedir o desenvolvimento de uma resposta imune protetora através das DCs imuno regulatórias (Tyagi et al., 2017).

A Diabetes mellitus (DM) e a periodontite crônica (CP) afetam milhões de pessoas em todo o mundo. DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante de problemas na secreção de insulina, ação da insulina ou ambos (American Diabetes Association, 2013b). O número de adultos diabéticos quase quadruplicou desde 1980. Este aumento dramático é em grande parte devido ao aumento da diabetes tipo 2 (DMT2) e dos fatores que a desencadeiam, como sobrepeso e obesidade. A prevalência global da DM entre adultos com mais de 18 anos é de aproximadamente 8,5%, correspondendo a 422 milhões de indivíduos (World Health Organization, 2016). Além disso, a presença de diabetes parece predispor a doenças infecciosas e afetar negativamente os resultados do tratamento (Joshi et al., 1999; Stegenga et al., 2008a).

A relação entre DMT2 e a CP tem sido estabelecida há muito tempo com diabéticos possuindo maior prevalência, incidência e severidade da CP (Taylor, 2001). Os diabéticos também demonstraram possuir uma resposta imune e inflamatória alterada, quando comparados a indivíduos sistemicamente saudáveis, incluindo uma função alterada de neutrófilos, macrófagos e monócitos. Há uma crescente necessidade de estudar-se o impacto que as infecções de baixo grau e sua resposta imunológica tem sobre a saúde periodontal e sistêmica. Poucos estudos investigaram o efeito da T2DM nas DCs, no entanto existem alguns trabalhos que relatam uma diminuição no *pool* de DCs circulantes em pacientes diabéticos de condição periodontal desconhecida, quando comparados a não diabéticos. Este achado poderia ser mais um fator para ajudar a explicar a resposta imune comprometida associada com T2DM (Seifarth et al., 2008; Blank et al., 2012).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal desse estudo é avaliar o efeito da T2DM na alteração da homeostase imunológica mediada por células dendríticas (DCs) em resposta a uma bacteremia aguda de curto prazo induzida por RAR em indivíduos portadores de periodontite crônica generalizada (GCP).

Os objetivos secundários foram:

- 1- avaliar a presença do periodontopatógeno *P. gingivalis* no biofilme e abrigado pelas DCs;
- 2- avaliar a resposta clínica destes pacientes ao tratamento periodontal executado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado entre janeiro de 2014 e maio de 2015, em plena conformidade com a Declaração de Helsinque de 1975, revisada em 2013. O protocolo do estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram examinados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP 658.998/CEP (Anexo A). Este estudo está registrado no ClinicalTrials.gov sob o identificador NCT02172716. Os participantes foram recrutados na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Cada participante assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

4.1 Delineamento do estudo

Ensaio clínico controlado.

4.2 Seleção da Amostra

A história médica e odontológica detalhada foi obtida para todos os indivíduos. Indivíduos entre 35 e 65 anos periodontalmente saudáveis ou que tenham sido diagnosticados com GCP foram elegíveis para participar. GCP foi definida como PCS ≥ 5 mm em ≥ 10 dentes e SS em $\geq 30\%$ dos sítios. Os controles periodontalmente saudáveis tinham PCS ≤ 4 mm e SS em $< 30\%$ dos sítios. Os critérios de exclusão foram gravidez, tabagismo, índice de massa corpórea > 40 Kg/m², ter recebido terapia periodontal ou antibióticos sistêmicos nos últimos 6 meses, uso medicamentos anti-inflamatórios esteroides ou não esteroides. Os participantes foram categorizados de acordo com os níveis de HbA1C, seguindo a American Diabetes Association (2013a) em: T2DM (HbA1C

$\geq 6,5$), pré-diabéticos (PD, HbA1C $\geq 5,7$ e $\leq 6,4$) e normoglicêmicos (NG; HbA1C $\leq 5,6$). Todos os participantes diabéticos estavam sob a supervisão de um endocrinologista, sendo tratados por intervenção dietética e/ou agentes hipoglicemiantes orais. Todos os indivíduos foram autorizados pelo seu endocrinologista a participar do estudo. Os sessenta participantes foram distribuídos em quatro grupos: controles saudáveis (n=15), NG+GCP (n=15), PD+GCP (n=15) e T2DM+GCP (n=15).

4.3 Anamnese e exame clínico periodontal

Foram coletados dados da história médica, dados demográficos e hábitos de higiene bucal. Qualquer alteração em relação à medicação para o DMT2 foi descrita no decorrer do estudo (fichas utilizadas para coleta dos dados - Anexos C e D).

O exame clínico periodontal foi realizado por dois operadores calibrados (M.S.R. e A.M.F.). Para a calibração, foi selecionado um total de 6 pacientes diagnosticados com periodontite crônica moderada e que não eram elegíveis para o estudo, sendo eles avaliados por dois examinadores. Os examinadores realizaram, no mesmo dia, o exame periodontal completo (PCS, NCI, SS) de cada paciente, em seis sítios por dente. Cada examinador realizou dois exames periodontais por paciente com um intervalo de 30 minutos entre cada exame, para as avaliações inter e intra examinador. A calibração foi feita através do software SPSS, versão 17, através da análise do ICC (coeficiente de correlação intraclass). A reprodutibilidade inter e intra examinadores se apresentou satisfatória, com ICC variando entre 0,91 e 0,94. Os exames clínicos foram feitos utilizando-se a sonda periodontal da Universidade da Carolina do Norte UNC-15 (Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA) e incluiu a medição dos parâmetros clínicos, descritos a seguir, no início, 1 mês e três meses após o término da terapia periodontal. Todos os dentes foram avaliados, exceto os terceiros molares, em seis sítios (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual, disto-lingual), para os seguintes parâmetros na seguinte ordem:

Índice de placa (IP) visível (Ainamo; Bay, 1975)- Presença (1) ou ausência (0) de placa supragengival visível.

Índice gengival (IG) (Ainamo; Bay, 1975) – presença (1) ou ausência (0) de sangramento à sondagem da margem gengival.

Profundidade clínica de sondagem (PCS) – sondagem em seis sítios por dente. O que corresponde, em milímetros, à distância entre margem gengival e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

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

Sangramento à sondagem (SS) (Ainamo; Bay, 1975) – presença (positivo) ou ausência (negativo) de sangramento após 20 segundos da sondagem com sonda periodontal milimetrada em cada sítio.

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

4.4 Tratamento Periodontal

Dois periodontistas experientes (G.H.G, M.S.R) realizaram o tratamento periodontal. Todos os indivíduos com GCP (n=45) receberam raspagem e alisamento radicular (RAR) em uma sessão de aproximadamente 120 minutos. Foram utilizados instrumentos manuais (Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA) e ultrassônicos (Hu-Friedy EMS Piezon) sob anestesia local (prilocaína 3% com felipressina). Dentes considerados como perdidos foram tratados de forma semelhante e extraídos após o término do estudo. As instruções de higiene oral foram dadas de acordo com a necessidade. Os indivíduos periodontalmente saudáveis (n=15) receberam instruções de higiene oral e raspagem supragengival em uma consulta. Nenhuma outra intervenção terapêutica foi realizada até a conclusão do estudo.

4.5 Coleta de Sangue Periférico e processamento

Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa na Clínica Odontológica da FOUSP por um profissional habilitado. As amostras foram colhidas em tubos apropriados (BD Vacutainer®, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) no início do estudo, 24 horas, 1 mês e 3 meses após a terapia periodontal. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir de 25 ml de sangue total colhido dos pacientes, em tubos apropriados utilizando-se o Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Kings Park, NY, EUA). A separação celular foi baseada na diferença de densidade celular entre granulócitos, eritrócitos e células mononucleares. Quando o sangue é colocado sobre a camada de Ficoll e centrifugado, os eritrócitos e granulócitos são precipitados através do Ficoll, enquanto a maioria das células mononucleares permanecem no Ficoll. As DCs presentes no sangue periférico foram isoladas das PBMCs por seleção negativa (separação de células imunomagnética automatizada [RoboSep™]), obtendo-se Pan-DCs. A separação foi realizada seguindo as instruções do fabricante. A HbA1c foi avaliada apenas no início do estudo para confirmação do diagnóstico desses pacientes por cromatografia líquida de alta resolução realizada no equipamento D-10 (BioRad®, Hercules, CA, EUA) no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de São Paulo.

4.6 Coleta de biofilme subgengival

Após a remoção da placa supragengival, a coleta de amostras de biofilme subgengival no *baseline* foi realizada com cureta Gracey do tipo *mini-five* (HuFriedy, Chicago, IL, EUA), posicionada na porção mais apical dos sítios selecionados (um sítio profundo por quadrante, *pool* dos sítios selecionados). As amostras foram depositadas em tubos de polipropileno de 1,5ml contendo 100µl de solução TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). Todos os criotubos foram identificados e armazenados sob refrigeração a -80°C até sua utilização.

4.7 Imunofenotipagem das DCs por Citometria de Fluxo

A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo utilizando o MacsQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha), através de *gates* sequenciais. A fenotipagem foi realizada através de anticorpos monoclonais específicos: CD1C.FITC, CD303.APC, CD141.VIOBLUE, CD196.PE-Vio 770 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha), bem como CD197 (EBioscience, Santa Clara, Califórnia, USA). Foram utilizados controles isotípicos apropriados para verificar a determinação fenotípica e também o bloqueador FcR para prevenir a ligação do anticorpo a região do fragmento cristalizável (FcR) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Marcadores de superfície celular utilizados para a citometria de fluxo

Reagente	Fornecedor	Lote	Controle Isotípico	Clone
CD1c (BDCA-1)	Miltenyl Biotec	5151125647	Mouse IgG2a	AD5-8E7
CD141 (BDCA-3)	Miltenyl Biotec	5150413645	Mouse IgG1	AD5-14H12
CD303 (BDCA-2)	Miltenyl Biotec	5150302145	Mouse IgG1	AC144
CD196 (CCR6)	Miltenyl Biotec	5150624054	REA Control	REA190
CD197 (CCR7)	eBioscience	471979	Rat IgG2a	3D12
FcR Blocker	Miltenyl Biotec	-	NA	NA

Fonte: o autor.

A expressão dos marcadores foi analisada como a percentagem de células positivas na população alvo. A população alvo (Pan-DCs) foi definida através das características do tamanho, Foward Scatter (FSC), e da granularidade - Side Scatter (SSC). Também foi realizada a exclusão das células necróticas ou danificadas através do iodeto de propídio (Figura 4.1).

Figura 4.1- *Foward e Side Scatter plots* representativos dos sucessivos gates para a determinação da população alvo

Fonte: o autor.

4.8 Análise microbiológica

A avaliação da quantidade de *Porphyromonas Gingivalis* presente no biofilme e abrigada pelas Pan-DCs foi realizada sob orientação do Dr. Christopher W. Cutler e Dr. Ahmed El- Awady.

4.8.1 Extração de RNA das amostras

Para a detecção da *P. Gingivalis* no biofilme no *baseline* e abrigadas pelas Pan-DCs no *baseline* e 24h após RAR, o RNA total foi isolado de cada uma das amostras, utilizando-se o RNeasy Micro Kit (Cat. no. 74104, Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade e a integridade do RNA foi testada e apenas razões de absorbância 260/280 nm de 1.8-2.0, foram incluídas.

4.8.2 PCR em tempo real

A análise quantitativa da *Porphyromonas Gingivalis* no biofilme e abrigadas pelas Pan-DCs foi realizada por meio de PCR em tempo real utilizando termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), os produtos foram detectados por fluorescência, utilizando-se o sistema TaqMan (Applied Biosystems), seguindo o

protocolo recomendado pelo fabricante. O Primer individual e a sonda foram desenhados baseados na região espécie-específica altamente conservadas do gene 16S rRNA da *P. gingivalis* (GenBank: AB035455.1). O primer foi verificado para especificidade e sensibilidade através de uma reação de qrt-PCR utilizando-se o RNA isolado da cepa bacteriana em questão em diferentes diluições. Além disso, a especificidade dos primers foi testada através de reações de qrt-PCR, utilizando-se RNA isolado de células dendríticas humanas derivadas de monócitos, não infectadas (MoDCs) (controles negativos) e MoDCs infectadas (controles positivos).

Uma curva padrão foi gerada para os valores de CT (*cycle threshold*) x CFU (*Colony Forming Units*) e uma análise de regressão linear for conduzida para cada diluição seriada (Figura 4.2).

Figura 4.2 Curva padrão da *Porphyromonas gingivalis*

Fonte: o autor.

O *qrt-PCR one-step* foi realizado utilizando-se o Express qPCR SuperMix (Invitrogen, Cat. No. A10312). Para o qrt-PCR foram utilizados 5µl da amostra de RNA, 25µl do PCR master mix (2x) e 2.5µl do TaqMan® por reação. Todas as reações foram feitas em duplicata. CFU foi quantificado baseado no valor do CT depois de 40 ciclos e normalizado para o número total de Pan-DCs para cada uma das amostras.

4.9 Cálculo Amostral

O cálculo de tamanho amostral foi baseado nos resultados de um estudo clínico anterior (Carrion et al., 2012), comparando-se o número de DCs em indivíduos periodontalmente saudáveis e portadores de CP. Uma amostra de 15 participantes por grupo experimental foi calculada baseada na redução esperada no número de DCs de 2150 (SD:1000) para 1300 (SD: 600), assumindo-se uma alfa de 5% e um poder de 80%. O programa estatístico usado foi o STATA (Stata for Mac, 13.1, StataCorp, College Station, Tx, USA).

4.8 Análise Estatística

Os dados de citometria de fluxo e do qrt-PCR foram analisados através do software SPSS (SPSS para Mac, versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). As variáveis não seguiram uma distribuição normal sendo então analisadas por métodos não paramétricos. O teste de *Kruskall-Wallis* foi utilizado para as comparações globais entre os grupos, seguido pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni para múltiplas comparações. As comparações de um mesmo grupo ao longo do tempo foram feitas através do teste de Friedman. Medianas, 25% e 75% quartis são relatados. O teste de tendência não paramétrico, *Jonckheere-Terpstra*, foi utilizado para analisar a distribuição tendencial dos subtipos de DCs e também da presença *P. gingivalis* no biofilme e abrigadas pelas DCs no *baseline*. O efeito da idade nos subtipos de DCs no *baseline* foi avaliado utilizando-se uma regressão quantílica. Valores de delta (Δ) foram calculados para mostrar diferenças entre o *baseline* e os demais *time points* tanto para os dados de citometria de fluxo quanto para os dados clínicos, uma vez que havia diferença entre os grupos inicialmente.

As análises clínicas foram feitas através do software STATA (Stata for Mac, 13.1, StataCorp, College Station, Tx, USA). Os dados clínicos foram

testados para a normalidade e não houveram grandes desvios de uma distribuição considerada normal. Estes foram então analisados através de testes paramétricos e não-paramétricos. Como não houveram diferenças consideráveis entre as duas análises, para simplificar a apresentação, os valores foram mostrados através de média e desvio padrão e as comparações entre os grupos através do ANOVA e Bonferroni. Os níveis de significância foram estabelecidos em 0,05.

5 RESULTADOS

O fluxograma do estudo está representado na figura 5.1. Foram avaliados 342 pacientes para este estudo. 282 foram excluídos por não preencherem os critérios de inclusão. 60 foram alocados de acordo com os critérios de inclusão para cada um dos grupos. Todos os indivíduos completaram os 3 meses de avaliação (Figura 5.1).

Figura 5.1- Fluxograma do estudo

Fonte: o autor.

Como esperado, os grupos T2DM+GCP e PD+GCP apresentaram níveis mais altos de HbA1c do que os indivíduos normoglicêmicos. Os indivíduos com PD e T2DM eram significativamente mais velhos que os controles saudáveis;

não foram observadas outras diferenças significativas entre os grupos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1- Comparação entre os grupos com relação aos dados demográficos, HbA1c e IMC

N=60	Controle	NG+GCP	PD+GCP	T2DM+GCP	p-value
Idade (anos) (media ± DP)	45.3±7.9 ^A	50.4±8.1 ^{AB}	54.1±7.9 ^B	56.1±8.7 ^B	0.006*
Gênero (% feminino)	33.3 ^A	60 ^A	60 ^A	33.3 ^A	0.23
HbA1c (%) (media ± DP)	5.41±0.25 ^A	5.46±0.2 ^A	6.08±0.26 ^B	8.1±1.46 ^B	<0.001
IMC (media ± DP)	26.3±2.4 ^A	27.2±4.5 ^A	28.5±6.9 ^A	29.2±4.4 ^A	0.386

Fonte: o autor. *DP: desvio padrão; HbA1c, hemoglobina glicada; IMC, índice de massa corpórea; DM2, diabetes mellitus tipo 2. . Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. One- Way ANOVA; p<0,05.

No *baseline*, todos os três grupos com GCP (NG+GCP, PD+GCP, T2DM+GCP) não apresentaram valores significativamente diferentes para PCS, NCI, SS, IG e IP entre eles, tanto na análise de todos os sítios quanto na análise dos sítios com 5 mm ou mais. Todos os grupos com GCP foram significativamente diferentes do controle para todos os parâmetros clínicos periodontais avaliados (Tabela 5.2).

Tabela 5.2- Comparação das médias e desvios padrões dos parâmetros clínicos periodontais no baseline

Baseline	Controle	NG+GCP	PD+GCP	T2DM+GCP	p-value
(n=60)	(média±DP)	(média±DP)	(média±DP)	(média±DP)	
Todos os sítios					
IP (% sítios)	12,7±6,2 ^A	75,7±16,2 ^B	73,7±8,1 ^B	81,8±14,7 ^B	<0.01
IG (% sítios)	4,1±5,0 ^A	75,6±17,5 ^B	78,2±13,5 ^B	82,9±17,2 ^B	<0.01
SS (% sítios)	5,4±5,2 ^A	73,1±14,3 ^B	73,6±10,3 ^B	75,5±14,7 ^B	<0.01
PS (mm)	1,9±0,3 ^A	3,3±0,5 ^B	3,4±0,7 ^B	3,6±0,7 ^B	<0.01
NCI (mm)	1,3±0,5 ^A	3,9±0,9 ^B	4,2±1,3 ^B	4,9±1,3 ^B	<0.01
Sítios com profundidade de sondagem 5+mm no baseline					
IP (% sítios)	-	80,2±14,8 ^A	84,2±12,4 ^A	90,1±10,2 ^A	0,13
IG (% sítios)	-	79,8±16,3 ^A	87,7±12,3 ^A	90,6±13,8 ^A	0,08
SS (% sítios)	-	88,9±12,1 ^A	89,6±13,00 ^A	92,2±7,5 ^A	0,95
PS (mm)	-	5,7±0,4 ^A	5,7±0,6 ^A	5,8±0,5 ^A	0,48
NCI (mm)	-	6,1±0,8 ^A	6,4±1,4 ^A	7,1±1,4 ^A	0,16

Fonte: o autor. *NG, normoglicêmico; PD, pré-diabetes; T2DM, Diabetes Mellitus tipo 2; GCP, Periodontite crônica generalizada DP: desvio padrão. PCS, Profundidade clínica de sondagem; NCI, Nível clínico de inserção; SS, porcentagem de sítios com sangramento à sondagem; IP, porcentagem de índice de placa; IG, índice gengival. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. One-way anova, p<0,05.

A tabela 5.3 e a figura 5.2 apresentam as diferenças após tratamento para todos os grupos avaliados. Todos os grupos com GCP responderam de maneira semelhante ao tratamento realizado. Melhoras estatisticamente significantes foram observadas para todos os parâmetros clínicos periodontais nos grupos com GCP após RAR, independente do status de diabetes.

Tabela 5.3- Diferença nos parâmetros clínicos periodontais 3 meses após RAR, apresentados através de média e desvio padrão.

Diferença 3m pós RAR (n=60)	Controle (média±DP)	NG+GCP (média±DP)	PD+GCP (média±DP)	T2DM+GCP (média±DP)	p-value
Todos os sítios					
IP redução(% sítios)	7,5±5,1 ^A	62,6±14,5 ^B	60,8±8,8 ^B	65,7±10,2 ^B	<0.01*
IG redução(% sítios)	3,2±4,9 ^A	69,9±16,0 ^B	70,1±15,3 ^B	69,9±13,7 ^B	<0.01*
SS redução (% sítios)	4,3±4,8 ^A	61,5±14,3 ^B	58,5±9,1 ^B	59,7±10,3 ^B	<0.01*
PS redução(mm)	0,1±0,1 ^A	0,8±0,3 ^B	0,9±0,4 ^B	1,0±0,4 ^B	<0.01*
NCI –ganho (mm)	0,0±0,1 ^A	0,6±0,3 ^B	0,5±0,3 ^B	0,6±0,4 ^B	<0.01*
Sítios com profundidade de sondagem 5+mm no baseline					
IP redução (% sítios)	-	62,2±18,5 ^A	65,0±16,7 ^A	67,0±13,1 ^A	0,65
IG redução(% sítios)	-	72,2±14,8 ^A	76,7±16,7 ^A	73,2±16,3 ^A	0,62
SS redução (% sítios)	-	70,8±12,9 ^A	67,8±15,8 ^A	67,5±11,0 ^A	0,80
PS redução(mm)	-	2,4±0,4 ^A	2,3±0,3 ^A	2,4±0,5 ^A	0,56
NCI- ganho (mm)	-	1,6±0,4 ^A	1,5±0,5 ^A	1,3±1,6 ^A	0,37

Fonte: o autor. *NG, normoglicêmico; PD, pré-diabetes; T2DM, Diabetes Mellitus tipo 2; GCP, Periodontite crônica generalizada DP: desvio padrão. PCS, Profundidade clínica de sondagem; NCI, Nível clínico de inserção; SS, porcentagem de sítios com sangramento à sondagem; IP, porcentagem de índice de placa; IG, índice gengival. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. One-way anova, p<0,05.

Figura 5.2- Parâmetros clínicos periodontais no baseline, 1 mês e 3 meses após a RAR

Fonte: o autor. *NG, normoglicêmico; PD, pré-diabetes; T2DM, Diabetes Mellitus tipo 2; GCP, Periodontite crônica generalizada

Os *plots* representativos das subpopulações de DCs avaliadas estão apresentados na figura 5.3. Foram definidas as regiões ou *gates* através do *forward* e *side scatter*, a população alvo foi subsequentemente identificada para CD1C⁺, CD303⁺, CD141⁺, CD1C⁺CCR6⁺, e CD1C⁺CCR7⁺ (Figura 5.3).

Figura 5.3- Plots representativos da análise por citometria de fluxo

A- CD1c⁺ e CD303⁺ **B- CD1c⁺CCR6⁺**

Continua

Conclusão

Fonte: o autor. Plots representativos da análise por citometria de fluxo A- CD1c⁺ (BDCA-1⁺) e CD303⁺ (BDCA-2⁺). B- CD1c⁺CCR6⁺. Níveis de DCs no *baseline*, 24 hours, 1 mês e 3 meses após RAR.

A Figura 5.4 ilustra os resultados da análise de citometria de fluxo para as subpopulações de DCs circulantes no *baseline*. Através da análise de *trend*, utilizando-se o teste *Jonckheere-Terpstra*, observou-se uma tendência de diminuição através dos grupos que se mostrou significativa para as subpopulações CD1c⁺ ($p<0,001$), CD303⁺ ($p<0,001$) e CD141⁺ ($p<0,001$), com a porcentagem de DCs em cada uma dessas subpopulações decrescendo no seguinte sentido: controles > NG+GCP > PD+GCP > T2DM+GCP. Na comparação entre os grupos, observou-se uma contagem significativamente menor de mDCs (CD1c⁺) entre os indivíduos com PD+GCP e T2DM+GCP em comparação com controles saudáveis; não foram observadas diferenças significativas entre os controles saudáveis e o grupo NG+GCP (Figura 5.4-A). Os indivíduos com T2DM+GCP apresentaram níveis significativamente mais baixos da subpopulação CD141⁺ mDCs em comparação com todos os demais grupos (Figura 5.4-B). Observou-se uma diminuição significativa nas pDCs (CD303⁺) entre os indivíduos NG+GCP, PD+GCP e T2DM+GCP em comparação com os controles saudáveis (Figura 5.4-C). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para os níveis de mDCs imaturas (CD1c⁺CCR6⁺) e maduras (CD1c⁺CCR7⁺) (Figuras 5.4 D e E). Uma análise adicional mostrou que a idade estaria significativamente associada com CD1c⁺, CD303⁺ e CD141⁺; no entanto ao ajustarmos para idade através de análise de regressão não houve impacto nos resultados aqui apresentados.

Figura 5.4- Análise de citometria de fluxo para as subpopulações de DCs circulantes do sangue no baseline

Fonte: o autor. Análise de citometria de fluxo para as subpopulações de DCs circulantes do sangue no *baseline*: (A) CD1c⁺; (B); CD141⁺; (C) CD303⁺; (D) CD1c⁺CCR6⁺ e (E) CD1c⁺CCR7⁺. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$ *Kruskal Wallis Test*). NG, normoglicêmico; PD, pré-diabetes; T2DM, Diabetes Mellitus tipo 2; GCP, Periodontite crônica generalizada.

A distribuição das DCs ao longo do tempo está apresentada na Figura 5.5 e na tabela 5.4. Uma vez que os grupos eram diferentes no baseline, as alterações no número de DCs ao longo do tempo foram apresentadas através do Δ (tabela 5.5). Após a bacteremia induzida por RAR, foi observado um aumento estatisticamente significativo para as subpopulações CD1c⁺ mDCs e CD1c⁺CCR6⁺ mDCs para todos os grupos com GCP, independentemente do status de diabetes. Ambas as subpopulações retornaram para níveis comparáveis aos do *baseline* 1 mês após a RAR, mantendo-se em níveis semelhantes na avaliação de 3 meses. Nenhuma diferença significativa foi observada para CCR7⁺ após a bacteremia induzida por raspagem para nenhum dos grupos em nenhuma das avaliações. Indivíduos do grupo T2DM+GCP apresentaram consistentemente níveis mais baixos de CD141⁺ e CD303⁺ quando comparados aos indivíduos do grupo NG+GCP em todas as avaliações.

Figura 5.5- Análise de citometria de fluxo para as subpopulações de DCs circulantes no sangue ao longo do tempo

Fonte: o autor. Análise de citometria de fluxo para as subpopulações de DCs circulantes no sangue ao longo do tempo: (A) CD1c+; (B) CD141+; (C) CD1c+CCR6+; (D) CD1c+CCR7+; e (E) CD303+. Os valores de p estão apresentados na tabela 5.4. NG, normoglicêmico; PD, pré-diabetes; T2DM, Diabetes Mellitus tipo 2; GCP, Periodontite crônica generalizada.

Tabela 5.4- Comparação das medianas e quartis (25-75%) das subpopulações de DCs circulantes em cada um dos *time points*.

		Controle	NG+GCP	PD+GCP	T2DM+GCP
		Mediana (25%; 75%)	Mediana (25%; 75%)	Mediana (25%; 75%)	Mediana (25%; 75%)
		(n=15)	(n=15)	(n=15)	(n=15)
%CD1c ⁺	BsIn	32.2 (23.1; 36.3) Aa	25.02 (18.5;32.1) Aa	18.03 (15.2; 29.2) Ba	17.9(11.2; 24.1) Ba
	24h	30.8(22.9; 37.3) Aa	35.5 (27.7; 37.9) ABb	30.6 (20.9; 45.5) ABb	24.8 (18.3; 30.4) Bb
	1m	30.2 (25.8; 36.7) Aa	29.2 (17.2; 31.7) ABa	19.4 (16.5; 28.8) ABa	16.4 (12.1; 22.7) Ba
	3m	28.4 (19.1; 34.6) Aa	22.7 (16.4; 34.2) ABa	18.4 (15.8; 24.7) ABa	15.2 (11.4; 20.7) Ba
%CD1c ⁺ CCR6 ⁺	BsIn	10.4 (5.9; 11.9) Aa	9.1 (7.94; 11.6) Aa	9.8 (7.6; 17.8) Aa	8.3 (5.7; 15.9) Aa
	24h	8.14 (5.8; 12.3) Aa	14.3 (10.4; 16.7) Bb	15. 8 (11.8; 19.7) Bb	13.1 (8.9; 21.2) ABb
	1m	7.1 (4.9; 12.1) Aa	10.9 (8.2; 13.7) Aa	8.01 (5.4; 15.4) Aa	9.7 (7.9; 14.02) Aa
	3m	7.8 (3.9; 11.7) Aa	7.7 (5.1; 8.7) Aa	5.5 (3.9; 8.4) Aa	9.1 (7.7; 11.2) Aa
%CD1c ⁺ CCR7 ⁺	BsIn	0.6 (0.2; 1.8) Aa	0.8 (0.3; 1.3) Aa	0.9 (0.3; 2.2) Aa	0.6 (0.3; 1.2) Aa
	24h	0.7 (0.3; 1.1) Aa	0.4 (0.3; 1.1) Aa	0.7 (0.4; 2.2) Aa	0.4 (0.3; 1.07) Aa
	1m	0.6 (0.3; 0.8) Aa	0.6 (0.3; 1.07) Aa	0.7 (0.4; 1.15) Aa	0.6 (0.3; 0.8) Aa
	3m	0.5 (0.3; 1.2) Aa	0.5 (0.2; 0.7) Aa	0.5 (0.4; 0.8) Aa	0.6 (0.4; 0.8) Aa
%CD141 ⁺	BsIn	2.0 (1.4; 2.7) Aa	1.6 (0.7; 2.6) Aa	1.0 (0.6; 2.4) Aa	0.5 (0.3; 0.9) Ba
	24h	2.7 (1.6; 3.1) Aa	1.7 (0.5; 2.6) Aa	0.9 (0.4; 3.1) ABa	0.3 (0.1; 1.0) Ba
	1m	1.7 (1.4; 3.5) Aa	2.2 (1.7; 2.5) Aa	1.4 (0.9; 1.9) Aa	0.6 (0.3;1.0) Ba
	3m	1.9 (1.5; 2.6) Aa	2.0 (1.7; 3.4) Aa	1.8 (0.9; 2.8) ABa	0.7 (0.2; 1.7) Ba
%CD303 ⁺	BsIn	14.06 (12.6; 24.7) Aa	4.34 (2.1; 14.6) Ba	4.29 (1.6; 6.8) Ba	1.61 (0.6; 4.4) Ba
	24h	14.07 (12.3; 23.4) Aa	11.68 (3.7; 23.8) ABa	6.2 (1.4; 14.2) Ba	4.03 (2.0; 10.3) Ba
	1m	15.8 (11.2; 22.6) ABa	8.6 (4.6; 16.3) BCa	5.7 (2.2; 7.06)CDa	2.72 (1.5; 5.7)Da
	3m	12.0 (10.0; 18.0) ABa	8.0 (4.0; 15.0) BCa	6.0 (2.0; 9.0) CDa	3.0 (2.0; 6.0) Da

Fonte: o autor. *NG, normoglicêmico; PD, pré-diabetes; T2DM, Diabetes Mellitus tipo 2; GCP, periodontite crônica generalizada. Letras maiúsculas representam as comparações entre os grupos ($p < 0,05$ *Kruskall Wallis Test*) e letras minúsculas as comparações entre os *time points* dentro de um mesmo grupo. ($p < 0,05$ *Friedman Test*).

Tabela 5.5- Mudanças nas subpopulações de DCs avaliadas (valores de Δ), à partir do *baseline* para 24h, 1 mês e 3 meses após RAR.

		Controle Mediana (25%; 75%)	NG+GCP Mediana (25%; 75%)	PD+GCP Mediana (25%; 75%)	T2DM+GCP Mediana (25%; 75%)	p valor*
		(n=15)	(n=15)	(n=15)	(n=15)	
%CD1c ⁺	Δ 24hs - baseline	-0.08 (-3.9; 4.3) A	7.1 (2.9; 11.6) B	8.05 (4.2; 11.4) B	6.3 (0.7; 10.6) B	0.01*
	Δ 1m - bsl	0.04 (-4.9; 2.4)	0.05 (-4.7; 5.3)	0.16 (-2.2; 1.75)	0.61 (-1.4; 3.3)	0.93
	Δ 3m - bsl	-4.0 (-8.0; 1.0)	2.0 (-11; 3.0)	0.0 (-3.0; 4.0)	2.0 (-7.0; 3.0)	0.67
%CD1c ⁺ CCR6 ⁺	Δ 24hs - bsl	-0.87 (-2.1; 0.8) A	3.93 (1.7; 5.7) B	4.77 (1.6; 8.9) B	3.87 (0.7; 5.9) B	< 0.01*
	Δ 1m - bsl	-0.8 (-3.8; 1.7)	0.79 (-1.5; 4.1)	-1.15 (-2.9; 1.7)	1.52 (-0.4; 2.3)	0.21
	Δ 3m - bsl	-1.01 (-3.3; 0.9)	-2.35 (-5.6; 1.0)	-3.04 (-6.5; -0.8)	-1.42 (-4.4; 2.9)	0.37
%CD1c ⁺ CCR7 ⁺	Δ 24hs - bsl	-0.14 (-0.8; 0.2)	-0.14 (-0.5; 0.0)	-0.04 (-0.3; 0.3)	-0.09 (-0.2; 0.2)	0.52
	Δ 1m - bsl	-0.22 (-0.9; 0.1)	-0.13 (-0.3; 0.0)	-0.05 (-0.5; 0.3)	-0.02 (-0.4; 0.1)	0.96
	Δ 3m - bsl	-0.32 (-0.8; 0.3)	-0.18 (-0.9; 0.1)	-0.64 (-1.6; 0.2)	-0.17 (-0.7; 0.4)	0.71
%CD141 ⁺	Δ 24hs - bsl	0.25 (-0.4; 0.9)	0.02 (-0.7; 1.2)	-0.20 (-0.9; 0.3)	-0.17 (-0.4; 0.5)	0.59
	Δ 1m - bsl	0.35 (-0.8; 0.9)	0.65 (-1.2; 1.5)	-0.01 (-0.7; 0.9)	0.12 (-0.4; 0.3)	0.58
	Δ 3m - bsl	0.29 (-0.3; 0.4)	0.28 (-0.8; 1.1)	0.54 (-1.1; 1.1)	0.24 (-0.4; 0.9)	0.88
%CD303 ⁺	Δ 24hs - bsl	0.01 (-2.7; 2.6)	4.24 (1.6; 9.8)	1.9 (-0.1; 5.5)	0.84 (-0.4; 5.5)	0.07
	Δ 1m - bsl	-0.22 (-3.9; 2.9)	1.64 (-1.1; 3.3)	1.44 (-0.4; 4.8)	0.68 (-2.4; 1.6)	0.5
	Δ 3m - bsl	-0.75 (-4.9; 1.1)	1.00 (-4.5; 3.9)	0.91 (-0.4; 4.6)	0.48 (-0.6; 3.0)	0.12

Fonte: o autor. *NG, normoglicêmico; PD, pré-diabetes; T2DM, Diabetes Mellitus tipo 2; GCP, periodontite crônica generalizada. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$ *Kruskall Wallis Test*). Letras maiúsculas representam as comparações entre os grupos ($p < 0,05$ *Kruskall Wallis Test*)

No *baseline*, foi observado um trend significativo com relação aos níveis de *P. gingivalis* no bilofilme nos grupos à medida que os níveis glicêmicos aumentavam: controles < NG+GCP < PD+GCP < T2DM+GCP ($p < 0.001$). Na comparação entre os grupos, indivíduos com GCP tiveram níveis

significativamente maiores de *P. gingivalis* no biofilme do que os controles saudáveis, independentemente do status de diabetes. Com relação ao número estimado de *P. gingivalis* abrigadas pelas DCs, não foi observado um trend significativo ($p=0.826$). Na comparação entre os grupos, NG+GCP tiveram níveis significativamente mais altos de *P. gingivalis* nas DCs do que os controles saudáveis, enquanto não foram observadas diferenças significativas entre os controles saudáveis e os grupos PD+GCP e T2DM+GCP (Figura 5.6).

Figura 5.6- Contagem de *P. gingivalis* no biofilme e nas Pan-DCs circulantes no *baseline*

Fonte: o autor. NG, normoglicêmico; PD, pré-diabetes; T2DM, Diabetes Mellitus tipo 2; GCP, periodontite crônica generalizada; CFU, Unidade formadora de colônia. Diferença estatisticamente significante entre os grupos no *baseline* ($p < 0,05$ *Kruskal Wallis Test*).

A quantificação do número de *P. gingivalis* abrigadas pelas DCs, após a bacteremia induzida por RAR, é apresentada na Figura 5.7. O grupo NG+GCP apresentou níveis significativamente mais altos de *P. gingivalis* nas DCs, quando comparado aos grupos PD+GCP e T2DM+GCP e ao controle ($p < 0.001$); nenhuma outra diferença significativa entre os grupos foi observada.

Figura 5.7- Contagem de *P. gingivalis* nas Pan-DCs circulantes 24h após a bacteremia induzida por RAR

Fonte: o autor. *NG, normoglicêmico; PD, pré-diabetes; T2DM, Diabetes Mellitus tipo 2; GCP, periodontite crônica generalizada; CFU, Unidade formadora de colônia. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos após 24h da RAR ($p < 0,05$ *Kruskal Wallis Test*).

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da hiperglicemia na alteração da homeostase imunológica mediada por DCs circulantes após a indução de uma bacteremia através da RAR em indivíduos com GCP. Inicialmente, os níveis de DCs eram significativamente mais baixos nos indivíduos hiperglicêmicos quando comparados aos normoglicêmicos, sugerindo uma influência da T2DM na resposta basal das DCs ou dos seus progenitores. Após RAR, uma expansão comparável das subpopulações CD1C⁺ e CD1C⁺CCR6⁺ foi observada em todos os indivíduos com GCP em resposta a bacteremia, independentemente do status de glicemia. Um mês após a RAR, os níveis das DCs sanguíneas circulantes retornaram a níveis semelhantes aos iniciais em todos os grupos com GCP. É importante frisar que apesar dessa expansão 24h após a RAR, a hiperglicemia teve um efeito negativo persistente nos níveis de DCs mielóides e plasmocitóides ao longo do estudo, sendo estes consistentemente mais baixos entre os indivíduos diabéticos e pré-diabéticos quando comparados aos normoglicêmicos. Funcionalmente, a hiperglicemia também parece prejudicar a capacidade dessas células em capturar as bactérias, o que é evidenciado no presente estudo através dos níveis reduzidos de *P. gingivalis* abrigadas pelas DCs dos diabéticos e pré-diabéticos. Com relação aos parâmetros clínicos periodontais, a RAR resultou em melhora significativa em todos os grupos com GCP, independentemente do status de glicemia. Resultados semelhantes já foram relatados em estudos que também avaliaram a resposta clínica periodontal de curto prazo em indivíduos hiperglicêmicos comparados a normoglicêmicos (Christgau et al., 1998; Navarro-Sanchez et al., 2007; Cirano et al., 2012).

O presente estudo é o primeiro que se tem conhecimento a utilizar RAR para induzir um desafio bacteriano com o objetivo de abordar como a vigilância imunológica mediada pelas células dendríticas é influenciada pelo T2DM. Observamos uma expansão comparável das células dendríticas mielóides imaturas (CCR6⁺CD1c⁺) em todos os indivíduos com GCP, apesar dos níveis mais baixos desta população nos indivíduos hiperglicêmicos no *baseline*. Além disso, foi observado consistentemente níveis mais baixos de células dendríticas

mielóides CD141⁺ e plasmocitoides CD303⁺ nos indivíduos do grupo T2DM+GCP. Este fato é particularmente intrigante, quando analisamos as funções específicas desempenhadas pelos subtipos de DCs. As DCs plasmocitoides são derivadas de progenitores linfóides, expressam TLR7, TLR9 e secretam interferon do tipo I em resposta aos ácidos nucleicos e aos vírus. As DCs mielóides CD141⁺ possuem alta expressão de TLR3, TLR10, expressão moderada de TLR1, -2, -6 e -8 e ausência de TLR4, -5, -7 e -9 (Hemont et al., 2013). Além disso, produzem níveis elevados de IL-12p70 e IFN- β , e possuem uma capacidade superior de induzir respostas Th1, e realizar apresentação cruzada para os linfócitos T citotóxicos CD8⁺. As DCs CD141⁺ podem também realizar apresentação cruzada de antígenos virais após a captura de células infectadas com o vírus necrótico (Jongbloed et al., 2010; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). O subtipo mais numeroso de células dendríticas mielóides do sangue, CD1c⁺ (BDCA-1), expressam todos os TLRs exceto TLR9 (Hemont et al., 2013). O papel principal das DCs plasmocitoides e CD141⁺ em responder aos antígenos virais talvez possa explicar a falta de resposta de ambos os subtipos de DCs ao desafio bacteriano gerado pela RAR, mas não explica o fato destas células estarem preferencialmente diminuídas nos indivíduos hiperglicêmicos ao longo do estudo.

O achado de que as DCs estão em quantidades diminuídas e funcionalmente comprometidas em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos com GCP é suportado por alguns outros estudos em indivíduos diabéticos com condição periodontal desconhecida (Corrales et al., 2007; Seifarth et al., 2008; Blank et al., 2012). Seifarth et al. (2008) e Blank et al. (2012) também observaram um número reduzido de DCs circulantes em indivíduos com T2DM comparados a controles saudáveis. Corrales et al. (2007) reportaram anormalidades quantitativas e funcionais nas DCs como, por exemplo, uma capacidade diminuída de secretar citocinas pró-inflamatórias. Em contraste, Musilli et al. (2011) constataram níveis significativamente mais altos de mDCs circulantes em diabéticos, quando comparados com controles saudáveis. Neste estudo, apresenta-se um achado exclusivo que foi o aumento significativo no *pool* de mDCs circulantes (CD1c⁺) e mDCs imaturas (CD1c⁺CCR6⁺) em indivíduos diabéticos e pré-diabéticos após bacteremia, mas o tamanho do efeito foi atenuado pela hiperglicemia. Sendo assim, os indivíduos com PD e T2DM nunca atingiram os níveis de DCs presentes nos indivíduos normoglicêmicos.

Similar aos resultados apresentados para o grupo normoglicêmico, Carrion et al. (2012) mostraram um número elevado de mDCs após bacteremia induzida em indivíduos com um nível de CP menos severa do que os que foram incluídos no presente estudo. Coletivamente, estes achados sugerem que a T2DM prejudica a resposta das DCs não apenas para os desafios bacterianos crônicos, mas também para os agudos, incluindo os de origem oral.

As DCs variam em fenótipo e função dependendo do seu status de maturação. DCs imaturas migram para os tecidos periféricos em um processo controlado por pares de quimiocinas e seus receptores como, por exemplo, CCR6-CCL20 (Randolph et al., 2008). Quando as DCs capturam o antígeno, o CCR6 é *downregulated* e o CCR7 é *upregulated*, o que facilita a migração e amadurecimento dos linfócitos T nos órgãos linfoides secundários (Zlotnic; Yoshie, 2000). Carrion et al. (2012) mostraram que o número elevado de mDCs em indivíduos com CP, após RAR, parece estar associado a presença da bactéria *P. gingivalis* no biofilme e nas mDCs circulantes; a *P. gingivalis* proveniente do biofilme oral que ganhou acesso a circulação sanguínea entraria nas DCs através de sua fímbria curta Mfa1 (Zeituni et al., 2009), onde sobreviveria evitando a autofagia (El-Awady et al., 2015b; Tyagi et al., 2017). As DCs resultantes desse processo são imaturas e imunossupressoras para células T CD4⁺ e CD8⁺ através de um mecanismo dependente de indolamina 2, 3 dioxigenase (IDO) (Tyagi et al., 2017). Estudos *in vitro* inibiram a persistência intracelular da *P. gingivalis* nas DCs através do bloqueio do DC-SIGN, o receptor de superfície para Mfa-1, ou por estimulação de autofagia nas DCs mielóides (Zeituni et al., 2009; El-Awady et al., 2015b). O presente estudo confirmou que as DCs circulantes em pacientes com GCP são imaturas, independentemente do status de glicemia desses indivíduos. Em todos os grupos estudados, foi observado uma ausência de *upreguation* de CCR7⁺ após o desafio microbiano.

O fato destas células aparentemente apresentarem um perfil migratório único, caracterizado pela expressão diminuída de CCR7 (Miles et al., 2014b) e aumentada de CCR6, sugere que essas células dendríticas induzidas em indivíduos com CP são funcionalmente imaturas, o que poderia prevenir o desenvolvimento de uma resposta imune protetora. Além disso, foi observado nos grupos diabéticos e pré-diabéticos níveis significativamente mais baixos de *P. gingivalis* nas Pan-DCs, quando comparados ao grupo normoglicêmico com

GCP, tanto no *baseline* quanto após RAR. Esse achado é mais um fator que sugere que a hiperglicemia prejudica a função das DCs na resposta ao desafio bacteriano, diminuindo a sua eficiência em englobar os patógenos, passar por um processo de maturação e cumprir a sua função de apresentar o antígeno para os linfócitos T (Savina; Amigorena, 2007).

As evidências atuais suportam a ideia de que a hiperglicemia persistente leva a uma resposta imune-inflamatória exagerada (local) aos patógenos periodontais, resultando em uma destruição mais severa dos tecidos periodontais (Preshaw et al., 2012). A interação entre os produtos finais de glicação avançada (AGE) e seus receptores (RAGE) induz um estresse oxidativo, que pode levar a um *upregulation* dos monócitos e subsequente secreção de citocinas pró-inflamatórias (Salvi et al., 1997, Graves et al., 2006). É bem estabelecido na literatura que as interações AGE-RAGE têm um impacto negativo na função de várias células inflamatórias, incluindo um comprometimento da adesão, quimiotaxia e fagocitose (Naguib et al., 2004). O presente estudo fornece um outro aspecto: a hiperglicemia também parece afetar as células consideradas como as sentinelas do sistema imune.

A hiperglicemia crônica é associada com alterações nas respostas imune e homeostática (Stegenga et al., 2008b), mas o real impacto da hiperglicemia na função das DCs é pouco entendido. Um estudo *in vitro*, executado por Gilardi Montani et al. (2016), mostrou que DCs cultivadas em um meio com altos níveis de glicose tiveram uma redução na expressão de marcadores de ativação e maturação, indicando uma possível disfunção na maturação destas células em resposta a clássica via de estímulo de ativação representada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Além disso, a presença de altos níveis de glicose ou de soro hiperglicêmico gerou a hiperativação de duas vias ou *pathways*, a *Wnt/β-catenin* e a *p38 MAPK*, que também levaram ao prejuízo no processo de diferenciação e maturação dessas células, além da produção de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Deve-se ressaltar que o isolamento de DCs diretamente do sangue é desafiador, devido à baixa frequência dessas células no sangue periférico (0,2%) e nos tecidos. Este fato, levou ao desenvolvimento de múltiplas técnicas (Tomlinson et al., 2013). A este respeito, pequenos volumes de sangue limitam o isolamento de DCs e, conseqüentemente, a análise por citometria de fluxo,

frequentemente requerendo uma etapa adicional da metodologia como, por exemplo, gerar DCs a partir de monócitos (Nair et al., 2012). Neste estudo, as células mononucleares periféricas foram isoladas a partir de 25 ml de sangue e as DCs foram então isoladas por seleção negativa, que envolve remoção de células indesejáveis e a preservação da população alvo. Em contraste, a seleção positiva utiliza um anticorpo ligado a *beads* para isolar a população alvo, e as partículas magnéticas presentes, após isolamento, podem afetar a acurácia dos experimentos sequenciais. Além disso, a ligação das células ao anticorpo pode estimular alteração de fenótipo. A seleção negativa possibilita que as células alvo sejam isoladas intocadas, o que é essencial para uma maior acurácia durante a fenotipagem (Šafařík; Šafaříková, 1999).

Os pontos fortes do presente estudo incluem o desenho de estudo prospectivo, os rigorosos critérios de inclusão, as coletas e processamento adequados das amostras. Nosso desenho de estudo incluiu RAR de boca toda e coletas prospectivas de amostras biológicas, o que nos permitiu gerar um desafio bacteriano significativo para as DCs e consequentemente avaliação das mudanças geradas pela bacteremia nas subpopulações de DCs. Nosso critério de inclusão, baseado no exame clínico de boca toda, claramente distinguiu os controles de indivíduos com periodontite crônica. Contrariamente a estudos anteriores, quantidade suficiente de sangue foi coletada para isolar diretamente as DCs do sangue periférico. Isso preveniu que tivéssemos que lançar mão de outras técnicas laboratoriais para obter a quantidade adequada de células para análise por citometria de fluxo. Uma limitação deste estudo diz respeito ao tamanho da amostra, que não foi suficiente para alcançar significância estatística em algumas das comparações. No entanto, a complexidade envolvida na obtenção de uma amostra maior com estas características deve ser considerada.

Recomendamos que mais estudos mecanísticos e clínicos sejam realizados para esclarecer o efeito da hiperglicemia na resposta das DCs as bacteremias de baixo grau e/ou agudas de curto prazo de origem periodontal, e as possíveis consequências para a saúde sistêmica.

7 CONCLUSÃO

A hiperglicemia parece afetar negativamente o *pool* e a função das DCs mielóides e plasmocitoides sanguíneas. Apesar da magnitude da expansão das mDCs em resposta ao desafio bacteriano agudo ser semelhante em todos os grupos com periodontite crônica, os indivíduos hiperglicêmicos permanecem imunocomprometidos em comparação com indivíduos normoglicêmicos, os níveis de DCs não atingem aqueles presentes em indivíduos normoglicêmicos.

REFERÊNCIAS¹

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975 Dec;25(4):229-35.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2016 Jan;39(1):S13–S22. doi: <https://doi.org/10.2337/dc16-S005>.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2013a;36 Suppl 1:S67-74. doi: <https://doi.org/10.2337/dc16-S067>.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. 2013b. [citado 24 mar. 2014]. Disponível em: http://care.diabetesjournals.org/content/30/suppl_1/S4.short#.

Armitage GC. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Piodontology. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol*. 2003 Aug;74(8):1237- 47.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998Mar;392(6673):245–52 Review.

Barbosa M, Prada-López I, Álvarez M, Amaral B, de los Angeles CD, Tomás I. Post-tooth extraction bacteraemia: a randomized clinical trial on the efficacy of chlorhexidine prophylaxis. *PLoS One*. 2015; 8;10(5):e0124249. doi: 10.1371/journal.pone.0124249. eCollection 2015.

Blank SE, Johnson E C, Weeks DK, Wysham CH. Circulating dendritic cell number and intracellular TNF-alpha production in women with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2012. Dec; 49 Suppl1: S25-32. Doi: 10-1007/100592-010-0190-8.

Carrion J, Scisci E, Miles B, Sabino GJ, Zeituni AE, Gu Y, et al. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis Influences DC differentiation, atherogenic potential. *J Immunol*. 2012 Sep; 189(6):3178-87. doi: 10.4049/jimmunol.120:053.

Cervantes-Barragan L, Lewis KL, Filmer S, Thiel V, Reith W, et al. Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Feb;109(8):3012–17. doi:10.1073/pnas.1117359109.

Cirano FR, Pera,C, Ueda P, Cassarin RC, Ribeiro FV, Pimentel SP, et al. Clinical and metabolic evaluation of one stage, full-mouth, ultrasonic debridement as a therapeutic approach for uncontrolled type 2 diabetic patients with periodontitis. *Quintessence Int*. 2012 Sep;43(8):671–81

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Christgau M, Palitzsch KD, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):112–24.

Chung CY, Ysebaert D, Berneman ZN, Cools, N. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance. *Clin Dev Immunol*. 2013;972865. doi: 10.1155/2013/972865.

Corrales J, Almeida M, Burgo R, Hernandez P, Miralles J, Orfao A. Decreased production of inflammatory cytokines by circulating monocytes and dendritic cells in type 2 diabetic men with atherosclerotic complications. *Diabetes Complications*. 2007 Jan-Feb;21(1):41–9.

Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*. 2014;162(2 Pt A):22–38. doi: 10.1016/j.imlet.2014.08.017.

Dzionic A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000 Dec;165(11):6037–46. doi: 10.4049/jimmunol.165.11.6037.

El-Awady AR, Arce RM, Cutler CW. Dendritic cells: microbial clearance via autophagy and potential immunobiological consequences for periodontal disease. *Periodontology 2000* 2015a Oct;69(1):160–80. doi: 10.1111/prd.2095.

El-Awady AR, Miles B, Scisci E, Kurago ZB, Palani CD, Arce RM, et al. *Porphyromonas gingivalis* evasion of autophagy and intracellular killing by human myeloid dendritic cells involves DC-SIGN-TLR2 crosstalk. *PLoS Pathogen* 2015b;10(2):e1004647.

Gilardini Montani MS, Granato M, Cuomo L, Valia S, Di Renzo L, D'Orazi G, et al. High glucose and hyperglycemic sera from type 2 diabetic patients impair DC differentiation by inducing ROS and activating Wnt/ β -catenin and p38 MAPK. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Apr;1862 (4):805–13. doi:10.1016/j.bbadis.2016.01.001.

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

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan;15(1): 30–44. doi: 10.1038/nri3785. Review.

Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci*. 2011 Sep;53(3):263–71.

Hemont C, Neel A, Heslan M, Braudeau C, Josien R. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol*. 2013 Apr;93(4):599–609. doi: 10.1189/jlb.0912452.

Horliana AC, Chambrone L, Foz AM, Artese HP, Rabelo Mde S, Pannuti CM, et al. Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review. *PLoS One*. 2014 28;9(5):e98271. doi: 10.1371/journal.pone.0098271. eCollection 2014. Review.

Nobelförsamlingen. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. The gatekeepers of the immune system. Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2011/popular-medicineprize2011.pdf.

Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2009 Jan; 227(1):234–47. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x.

Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, et al. Human cd141+ (bdca-3)+ dendritic cells (dcs) represent a unique myeloid dc subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med*. 2010 Jun; 207(6):1247-60. doi: 10.1084/jem.20092140.

Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999 Dec;341(25):1906-12.

Kinane DF, Zhang P, Benakanakere M, Singleton J, Biesbrock A, Nonnenmacher C, et al. Experimental gingivitis, bacteremia and systemic biomarkers: a randomized clinical trial. *J Periodontal Res*. 2015 Dec;50(6):864-9. doi: 10.1111/jre.12280. Epub 2015 May 9.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002 Dec;100(13):4512–4520.

Miles B, Abdel-Ghaffar KA, Gamal AY, Baban B, Cutler CW. Blood dendritic cells: “canary in the coal mine” to predict chronic inflammatory disease? *Front Microbiol*. 2014a Jan;5:6. doi: 10.3389/fmicb.2014.00006.eCollection2014.

Miles B, Scisci E, Carrion J, Sabino GJ, Genco CA, Cutler CW. Noncanonical dendritic cell differentiation and survival driven by a bacteremic pathogen. *Leuk Biol*. 2013 Aug;94(2):281–9. doi: 10.1189/jlb.0213108.

Miles B, Zakhary I, El-Awady A, Scisci E, Carrion J, O'Neill JC, et al. Secondary lymphoid organ homing phenotype of human myeloid dendritic cells disrupted by an intracellular oral pathogen. *Infect Immun* 2014b Jan;82(1): 101–11. doi:10.1128/1A1.01157-13.

Musilli C, Paccosi S, Pala L, Gerlini G, Ledda F, Mugelli A, et al. Characterization of circulating and monocyte-derived dendritic cells in obese and diabetic patients. *Mol Immunol*. 2011 Oct;49(1-2):234-8. doi: 10.1016/j.molimm.2011.08.019.

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

Nair S, Archer GE, Tedder TF. Isolation and generation of human dendritic cells. *Curr Protoc Immunol*. 2012 Nov;7: Unit 7.32. doi: 10.1002/0471142735.im0732s99.

Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007 Oct;34(10):835–843.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005 Nov; 366(9499):1809–20.

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012 Jan;55(1):21–31. doi: 10.1007/100125-011-2342-y.

Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sánchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:293-316.

Šafařík I, Šafaříkova M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J Chromatogr Biomed Sci Appl*. 1999 Feb;722(1-2):33-53.

Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR, et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus populations. *Periodontol*. 1997 Feb;68(2):127–35.

Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev*. 2007 Oct;219:143–56. Review.

Seifarth C, Hinkmann D, Hahn E-G, Lohmann T, Harsch I. Reduced frequency of peripheral dendritic cells in type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008 Mar;116(3):162–6. doi: 10.1055/1-2007-990278.

Stegenga ME, van der Crabben SN, Blumer RM, Levi M, Meijers JC, Serlie MJ, et al. Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. *Blood* 2008a;112:82-9. doi: 10.1182/blood-2007-11-121723.

Stegenga ME, van der Crabben SN, Dessing MC, Pater JM, van den Pangaart PS, de Vos AF, et al. Effect of acute hyperglycaemia and/or hyperinsulinaemia on proinflammatory gene expression, cytokine production and neutrophil function in humans. *Diabet Med*. 2008b Feb;25(2):157-64. doi:10.1111/j.1464-5491.2007.02348.x.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973 May;137(5):1142–62.

Taylor GW. Bidirectional Interrelationships between diabetes and periodontal disease: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol*. 2001 Dec;6(1):99-112.

Tomlinson MJ, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham J. Cell separation: terminology and practical considerations. *J Tissue Eng.* 2013; doi: 2041731412472690.

Tyagi RK, Miles B, Parmar R, Garg NK, Dalai SK, Baban B, et. al. Human IDO-competent, long-lived immunoregulatory dendritic cells induced by intracellular pathogen, and their fate in humanized mice. *Sci Rep.* 2017 Feb;7:41083. doi: 10.1038/srep41083.

Zeituni AE, Jotwani R, Carrion J, Cutler CW. Targeting of DC-SIGN on human dendritic cells by minor fimbriated *Porphyromonas gingivalis* strains elicits a distinct effector T cell response. *J Immunol.* 2009 Nov;183(9):5694-704. doi: 10.1049/jimmunol.0901030.

World Health Organization. Global report on diabetes, Geneva; 2016. [citado em 20 jan 2017]. Disponível em: apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010 Oct;116(16): e74–e80. doi: 10.1182/blood-1020-02-258558.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000 Feb;12(2):121-7. Review.

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALTERAÇÃO DA HOMEOSTASE IMUNOLÓGICA EM DIABÉTICOS TIPO 2 COM PERIODONTITE CRÔNICA

Pesquisador: Giuseppe Alexandre Romito

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 26793214.9.0000.0075

Instituição Proponente: FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENT E TEC ODONTOLOGIA

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 658.998

Data da Relatoria: 23/05/2014

Apresentação do Projeto:

O Diabetes mellitus (DM) e a doença periodontal (DP) afetam milhões de pessoas em todo o mundo. A presença da diabetes parece predispor à doenças infecciosas e afetar negativamente os resultados do tratamento. Tem sido investigado se a DM provoca uma resposta imune alterada que poderia explicar o maior risco às infecções. Os dados mostram que parece haver uma tendência da hiperglicemia em prejudicar a função bactericida dos neutrófilos, enquanto que a insulina parece restaurar ou mesmo aumentar a resposta inflamatória em outros ensaios.

AGESs são uma classe de proteínas não enzimáticas formadas a partir de elevação crônica da glicose em diabéticos. Acredita-se que as ações dos AGEs levam à indução da quimiotaxia de monócitos e a produção de citocinas (principalmente IL-1b e TNF- α) e ao stress oxidativo. Já foi proposto que a formação e o excessivo acúmulo de AGEs contribuem para as complicações da diabetes.

As AGEs aumentam a expressão de uma variedade de moléculas de adesão, tais como molécula de adesão celular vascular-1 nas células endoteliais, e diminuem a síntese de colágeno em fibroblastos. Um polimorfismo do gene do receptor para AGEs (RAGE) pode ter uma influência sobre as complicações diabéticas.

A doença periodontal crônica é uma doença inflamatória desencadeada por patógenos

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 05.508-900	
UF: SP	Município: SAO PAULO	
Telefone: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 658.998

periodontais que colonizam o tecido periodontal causando a destruição do osso alveolar. Os neutrófilos, células B, células CD4 + T, macrófagos e células dendríticas (DCs) são as células inflamatórias que respondem à infecção no local. As células dendríticas (DCs), poderiam ser consideradas "guardiãs do sistema imunológico", por seu papel em rapidamente discriminar patógenos microbianos de comensais e induzir uma resposta apropriada das células T.

Tem-se demonstrado que pacientes com periodontite tem episódios frequentes de bacteremia após procedimentos odontológicos. Estudos clínicos demonstraram que a manipulação dos tecidos periodontais em indivíduos com periodontite induz não só a bacteremia, mas também uma resposta inflamatória sistêmica aguda.

A relação entre DM e PC já ficou estabelecida e os diabéticos apresentam maior prevalência, incidência e gravidade da PC.

Há necessidade de se estudar o impacto que as infecções de baixo grau e sua resposta imunológica tem sobre a saúde periodontal e sistêmica.

Esse estudo visa avaliar a resposta imunológica de curto prazo dos pacientes portadores de diabetes do tipo 2 com periodontite crônica generalizada (PCG) ao tratamento periodontal não cirúrgico. Oitenta (80) sujeitos de pesquisa serão selecionados para participar, divididos em quatro grupos: 20 pacientes diabéticos tipo 2 com PCG, 20 pacientes com PCG pré-diabéticos, 20 pacientes normoglicêmicos com PCG e 20 controles saudáveis.

Numa consulta inicial será realizada a triagem desses pacientes, na próxima consulta será realizado o tratamento, sendo que com 24 horas, 30 dias e três meses após o tratamento os mesmos serão reavaliados. O tratamento periodontal não cirúrgico será conduzido seguindo uma abordagem de boca toda, antibióticos ou agentes químicos não serão utilizados.

Serão realizadas: análises celulares, com coleta de sangue para contagem PBMCs de células dendríticas mielóides (BDCA-1+CD19-), células dendríticas plasmocitóides (cd123+cd303+) NK (CD56+CD16+), Th17, Treg (CD25+, CD39, CD73, CD127, cd152).

Análises moleculares, (Soro/ Fluido gingival crevicular/ saliva) para pesquisar Anti-mfa-1 IgG (ELISA), Níveis de IDO-1, TGFβ, TNF, IL-18, IL-6, IL-2, IL-10, IL-17, IL-23, IFN, CXCL12 (SDF1) através do Multiplexing Luminex immuoassay [MAGPIX®], realizado em triplicata.

Expressão em mDCs através do qrt-PCR array (One step-fast cycle Taqman®, life technologies™: angiopoietin-2, follistatin, GM-CSF, G-CSF, HGF, IL8, IL-6, leptin, PDGF-BB, PECAM-1, VEGF, TGFβ, IDO-1, IL-10, IL-18, caspase-1, IL-17, IL-23, IL-23R IL-33, IL-

12 p70, TRAIL, FOXO1, Bcl-2, CXCL12 (SDF-1), CCL19, CCL21 analisado em triplicata.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Continuação do Parecer: 658.998

Secundariamente serão avaliados: a profundidade clínica de sondagem, nível clínico de inserção, sangramento à sondagem, índice de placa e índice gengival.

Objetivo da Pesquisa:

A hipótese dos pesquisadores é que a diabetes tipo2 exacerba o rompimento da homeostase imunológica mediada pelas células dendríticas (DC), associada com a doença periodontal.

O objetivo primário desta pesquisa é avaliar a resposta imunológica de curto prazo dos pacientes portadores de diabetes tipo2 com periodontite crônica generalizada (PCG) ao tratamento periodontal não cirúrgico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são os inerentes aos procedimentos, odontológico e para coleta do material para as avaliações clínico/laboratoriais que serão realizadas.

Como benefício, com os resultados obtidos haverá uma melhor compreensão sobre a homeostase imunológica mediada pelas células dendríticas associada a doença periodontal nos portadores de DM2.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta pesquisa deverá trazer muitas informações, do ponto de vista laboratorial, levando a um melhor conhecimento sobre o processo inflamatório e imunológico que acontece na doença periodontal e que influencia o adequado controle glicêmico nos pacientes diabéticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados; autorização do Supervisor da Clínica Odontológica, Folha de Rosto, TCLE adequado e a autorização para o uso do laboratório da Estomatologia, não havendo impedimento ético.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todos os questionamentos foram respondidos, não havendo inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7614 E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 658.998

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 23 de Maio de 2014

Assinado por:

Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Alteração da homeostase imunológica em diabéticos tipo 2 com periodontite crônica

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: _____ 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 influencia 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, 2222, 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 sob anestesia, se preciso. Iremos também recolher amostras de sangue em todas as visitas que o Sr. (a) comparecer, para podermos analisar sua glicemia e outros valores que podem influenciar sua diabetes, e também iremos aferir sua pressão arterial. Uma pequena cirurgia para coleta de tecido gengival também será realizada. Em torno de 1 mês após o primeiro tratamento, iremos fazer um novo exame gengival, e demais coletas. 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 FOUSP: Avenida Professor Lineu Prestes, 2227. Tel (3091 7959)

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: Mariana Rabelo (99881 21 41) e Giuseppe Romito (99205- 19 39). 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 C- Ficha clínica anamnese

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE PERIODONTIA

Data: / /	nº paciente
Pesquisador:	

PROJETO DE PESQUISA

**ALTERAÇÃO DA HOMEOSTASE IMUNOLÓGICA EM DIABÉTICOS TIPO 2 COM
PERIODONTITE CRÔNICA**

ANAMNESE

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ RG : _____
 Data de nascimento ____/____/____ Idade: _____
 Naturalidade _____ Nacionalidade _____
 Nível de escolaridade: _____ Profissão: _____
 Renda familiar em salário(s) mínimo(s): () 1-2 () 3-4 () 5 ou mais

Endereço: _____ nº _____
 CEP: _____ Bairro: _____ Cidade: _____
 Telefone: _____ Tel. de Recado: _____
 Celular: _____

Etnia: () Branco () Negro () Outros: _____

Estado Civil: () Casado () Solteiro () Outros: _____

Gênero: () Masculino () Feminino

HISTÓRIA MÉDICA

Possui algum outro problema de saúde ? Sim () Não ()

- () HAS _____
 () Cardiopatia _____
 () Alergias _____
 () Distúrbios Gastrointestinais _____
 () Coagulopatias _____
 () Doenças Respiratórias _____
 () Doenças Geniturinárias _____
 () Doenças Infectocontagiosas _____
 () Distúrbios Neurológicos _____
 () Internações _____

() Outros _____

HÁBITOS NOCIVOS

	SIM	NAO	Quantidade Dia /Mês	Parou há quanto tempo	Observação
Tabagismo					
Etilismo					
Outros					

CONTROLE DO DIABETES

Hereditariedade para diabetes? () Sim () Não () Não sabe

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

Obesidade? () Sim () Não

É sedentário? () Sim () Não Tipo de atividade física/ frequência _____

Está em uso de medicação? () Sim () Não () Não Sabe

Qual(is) _____

Tempo de diabetes: _____

Outras complicações:

- () Retinopatia () Angiopatia () Doença Renal Crônica () Neuropatia periférica
() Doença ~~macrovascular~~ (coronária e vascular cerebral) () Pé diabético

Eu _____

RG _____, declaro para todos os fins legais, que as informações sobre o meu estado de saúde são verdadeiras e que nada omiti no questionário realizado. Concordo também em participar do projeto de pesquisa "**ALTERAÇÃO DA HOMEOSTASE IMUNOLÓGICA EM DIABÉTICOS TIPO 2 COM PERIODONTITE CRÔNICA**", sabendo que farei apenas o tratamento periodontal e, se necessário, serei encaminhado para outros tratamentos odontológicos, como por exemplo, tratamentos de prótese e/ou canal.

Assinatura _____

Assinatura da testemunha _____

(em casos de analfabetos, ~~semi-analfabeto~~ ou portadores de deficiência)

Data ____/____/____

ANEXO D- Ficha clínica avaliação periodontal

PROJETO DE PESQUISA

Alteração da homeostase imunológica em diabéticos tipo 2 com periodontite crônica

Nome: _____ Número: _____

Data: _____ Consulta: _____ Pesquisador: _____

Peso: _____

VESTIBULAR														
	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
PL (1)														
IG (1)														
PBS (1)														
NCI (1)														
SANG (1)														
SUP (1)														
PALATINA														
PL (1)														
IG (1)														
PBS (1)														
NCI (1)														
SANG (1)														
SUP (1)														
VESTIBULAR														
	37	36	35	34	33	32	31	41	42	43	44	45	46	47
PL (1)														
IG (1)														
PBS (1)														
NCI (1)														
SANG (1)														
SUP (1)														
LINGUAL														
PL (1)														
IG (1)														
PBS (1)														
NCI (1)														
SANG (1)														
SUP (1)														