UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARCELA CLAUDINO DA SILVA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E DOS RECEPTORES
RAGE NO PERIODONTO DE RATOS DIABÉTICOS

BAURU
2010

MARCELA CLAUDINO DA SILVA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E DOS RECEPTORES
RAGE NO PERIODONTO DE RATOS DIABÉTICOS**

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DE BAURU, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE **DOUTOR** EM CIÊNCIAS, PROGRAMA DE
CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS APLICADAS,

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ESTOMATOLOGIA E BIOLOGIA
ORAL.

ORIENTADOR: PROF. DR. GERSON FRANCISCO DE ASSIS

**BAURU
2010**

Silva, Marcela Claudino da
Si38a Análise da expressão de citocinas e dos receptores
RAGE no periodonto de ratos diabéticos / Marcela
Claudino da Silva -- Bauru, 2010.
xxii, 221 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processos
fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-
USP: projeto de pesquisa aprovado em 12 de março de
2008.

Número do protocolo: 033/2007

Dedicatória

Aos meus pais, Suely e Carlos;

E a minha irmã, Juliana.

Por tudo, absolutamente!

*Dos mais simples conselhos aos mais belos
ensinamentos...*

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida e permitir a realização deste sonho. Além de todo conforto espiritual, obrigada por iluminar meu caminho a cada dia com pessoas especiais e generosas que foram imprescindíveis para que tudo isso acontecesse.

Dentre estas pessoas especiais, agradeço imensamente aos meus pais Suely e Carlos. Pelos braços abertos e pela mão sempre estendida, pelo sorriso consolador e incentivo em todos os momentos da minha vida. Vocês me ensinaram com o exemplo os princípios de caráter e a importância da família. Muito obrigada!

Agradeço a minha irmã Juliana que esteve diariamente ao meu lado desde nossa feliz infância até a conclusão do “nosso” curso de Odontologia. E assim, nos tornamos a cada dia verdadeiras amigas! Sua presença alegre, mesmo distante, é fundamental na minha vida!

Ao meu orientador Dr. Gerson Francisco de Assis, agradeço por todos os ensinamentos e pela compreensão em inúmeros momentos desde o início do mestrado. Sua generosidade ficará sempre guardada em minhas recordações.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, pela ajuda, confiança e por todas as oportunidades que engrandeceram imensamente minha formação. Obrigada por confiar na minha capacidade, principalmente nos momentos em que eu mesma não acreditava que fosse capaz! Especialmente, agradeço pela amizade e pelo respeito que tornou tudo sempre mais fácil...

Ao Dr. César Tadeu Spadella, pelo grande auxílio na metodologia.

Ao meu “primeiro orientador” Dr. Luiz Fernando Pereira! Obrigada por me mostrar o mundo mágico da pesquisa científica e, principalmente, por me acompanhar de perto por todo o período de graduação e pós-graduação. Obrigada também por me mostrar com suas atitudes o que é ser um verdadeiro e brilhante mestre!

Agradeço a Dra. Ana Paula Campanelli, pela amizade, pelas oportunidades e por todos os ensinamentos que contribuíram grandiosamente para a minha formação. Depois de “Tópicos em Imunologia Celular”, tudo se tornou possível!

Ao diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Dr. José Carlos Pereira; à Presidente da Comissão de Pós- Graduação Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado e ao coordenador da área de Biologia Oral Dr. Antonio de Castro Rodrigues.

À Luciana Raquel Vincenzi Fachin, do Instituto Lauro de Souza Lima, pela estimável colaboração e disponibilidade.

À secretária do Curso de Biologia Oral, Vera Lúcia Rosa Ruffino pela sua eficiência, atenção e disponibilidade dedicada ao nosso curso de pós-graduação e aos seus alunos.

Ao querido Carlos Eduardo Repeke, por absolutamente tudo... Certamente, você foi uma das pessoas mais especiais neste período! Nossa união só aumentou a nossa força! Obrigada pelo companheirismo, pela palhaçada diária e por amenizar as dificuldades com a ajuda sempre imediata.

Agradeço também minhas queridas amigas Élcia, Gabriela, Andreza e Lucimara! O carinho e a amizade que nutrimos mutuamente fizeram de cada dia de trabalho, um dia de agradável convívio. Obrigada pelos momentos descontraídos e por todas as palavras de conforto e de incentivo que me ajudaram nos momentos em que mais precisei!

Gabi, nossas longas e divertidas conversas vão fazer muita falta! Obrigada pela amizade e também por me acolher em sua casa por diversas vezes com tanto carinho...

Élcia, obrigada pelos conselhos sensatos, pelo coração aberto, pela amizade sempre afetuosa! Foi muito bom ter você como minha “mãe emprestada” em Bauru!

Andreza, o pouco tempo que convivemos foi suficiente para que construíssemos uma amizade muito especial! Obrigada por tudo!

Lu, obrigada pela amizade e pela parceria desde o início do doutorado!

Aos alunos do Laboratório de Imunologia e Microbiologia, em especial Carla, Thaís, Tati e Hayana. Conviver com vocês foi um presente; tanto nas disciplinas difíceis e intermináveis como nos momentos mais divertidos!

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial Samuel, Bella, Carol Morandini, Erivan, Helington, Ronan Jacques, Flávia, Luciana, Andréia, Wagner, Érika e Simone. Obrigada pelos momentos de descontração e pela ajuda mútua, imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à Janine Araki pela amizade sincera e verdadeira! Por todos os momentos em que estive ao meu lado, sempre me apoiando e me incentivando a seguir em frente. Agradeço também pelos momentos divertidos, pelas brincadeiras... Enfim, pela amizade tão especial que cultivamos!

À Mayara Paim Patel, pela companhia agradável e pela amizade! Admiro muito sua força, coragem e determinação. Tenha certeza de que estarei sempre torcendo muito por você!

À Ana Paula Marques, Angela Guimarães e Edla Barreto, por serem amigas tão especiais!

Aos estagiários, alunos e funcionários do laboratório de Histologia por todo apoio e disponibilidade. Agradeço imensamente a Tania Mary Cestari, Danielle Ceolin e Patrícia Mortágua pela ajuda nos experimentos de imunohistoquímica, especialmente nos momentos em que nada dava certo!

À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido a este estudo e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos. E, por fim, agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Marcella Claudino

Epigrafe

“O que é um cientista afinal? É um homem curioso olhando pelo buraco da fechadura, o buraco da fechadura da natureza, tentando saber o que está acontecendo...”

Jacques Yves Cousteau

Resumo

As doenças periodontais (DPs) são alterações inflamatórias crônicas que acometem os tecidos de sustentação do órgão dental. A presença do diabetes é refletida em maior severidade e prevalência das DPs tanto em humanos quanto em modelos experimentais. Contudo, os mecanismos biológicos envolvidos no aumento da prevalência e da severidade permanecem pouco conhecidos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o número de células marcadas por imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β , IL-6, RANKL, MMP-2, MMP-9 e para os receptores RAGE na doença periodontal experimental decorrente da indução do diabetes em ratos. Inicialmente, os ratos (n=25) foram submetidos à indução do diabetes através de administração endovenosa de aloxana (42mg/kg) e, juntamente com o grupo controle (n=25), acompanhados por 1, 3, 6, 9 e 12 meses. Em seguida, as hemimandíbulas foram coletadas e submetidas aos procedimentos de imunohistoquímica. Os resultados revelam que a presença do diabetes resulta em alterações significativas no número de células imunomarcadas para diferentes mediadores do processo inflamatório. Nos animais diabéticos, foi observado aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$ ANOVA) no número de células imunomarcadas para TNF- α (6 e 12 meses), IL-1 β (12 meses), IL-6 (9 e 12 meses), RANKL (9 meses) e para os receptores RAGE (6, 9 e 12 meses). Não foram observadas diferenças em relação ao número de células imunomarcadas para MMP-2 e MMP-9 entre os grupos controle e experimental, apesar da tendência a aumento no número de células MMP-9⁺ nos ratos após 12 meses da indução do diabetes ($p > 0,05$ ANOVA). Assim, a desregulação na expressão de citocinas inflamatórias e fatores osteoclastogênicos parece ser um dos mecanismos biológicos envolvidos no aumento da prevalência e da severidade das doenças periodontais em decorrência do diabetes.

Descritores: diabetes mellitus, aloxana, periodontite, ratos, imunohistoquímica.

Abstract

Cytokine and RAGE receptor expression analyses in periodontium of diabetic rats

Periodontal diseases (PD) are chronic inflammatory diseases leading the destruction of connective tissue and alveolar bone supporting the teeth. The establishment of diabetes increases PD prevalence and severity in humans and experimental model. However, biological mechanisms regarding to increase of prevalence and severity remains poorly known. The aim of this study was to evaluate the number of immuno-staining cells to TNF- α , IL-1 β , IL-6, MMP-2, MMP-9, RANKL and RAGE receptors in experimental periodontal disease in diabetic rats. Diabetes was induced in Wistar rats (n=25) by endovenous administration of 42 mg/kg of alloxan, and together with control animals (n=25), were analyzed at 1, 3, 6, 9 and 12 months after diabetes induction. The animals were sacrificed and the jaws were removed and submitted to immunohistochemistry procedures. Our data demonstrated that diabetes induction and progression resulted in significant alterations in number of immuno-staining cells to different mediators of inflammatory process. In diabetic rats, we observed an increased number of immuno-staining cells to TNF- α (6 and 12 months), IL-1 β (12 months), IL-6 (9 e 12 months), RANKL (9 months) and RAGE receptors (6, 9 and 12 months) ($p < 0,05$ ANOVA). Regarding to MMP-2⁺ and MMP-9⁺ cells, we did not found differences between control and experimental groups. However, we found a trend of towards in MMP-9⁺ cells in diabetic rats after 12 months of diabetes induction ($p > 0,05$ ANOVA). Then, our data demonstrated that diabetes establishment and progression resulted in an increase of immuno-staining cells to TNF- α , IL-1 β , IL-6, RANKL and RAGE receptors. Taken together, desregulation of inflammatory cytokines and osteoclastogenic factor expression seems to be one of biological mechanisms involved in the increase of periodontal disease prevalence and severity associated with diabetes.

Keywords: diabetes mellitus, alloxan, periodontitis, rats, immunohistochemistry.

Lista de Ilustrações

Lista de Figuras:

Figura 1	Delineamento experimental para indução do diabetes e coleta das amostras.	67
Figura 2	Esquema das etapas de imunomarcção pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase.....	70
Figura 3	Distribuição dos campos para a análise de morfometria nos tecidos periodontais (A) e retículo de integração (B).....	76
Figura 4	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 no grupo controle.....	85
Figura 5	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 no grupo experimental.	85
Figura 6	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 1 mês.....	87
Figura 7	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 3 meses.....	89
Figura 8	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 6 meses.....	91
Figura 9	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 9 meses.....	93
Figura 10	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 12 meses.....	95
Figura 11	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 no grupo controle.....	99
Figura 12	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 no grupo experimental.....	99
Figura 13	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 1 mês.....	101

Figura 14	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 3 meses.....	103
Figura 15	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 6 meses.....	105
Figura 16	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 9 meses.....	107
Figura 17	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 12 meses.....	109
Figura 18	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α no grupo controle.....	113
Figura 19	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α no grupo experimental.....	113
Figura 20	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 1 mês.....	115
Figura 21	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 3 meses.....	117
Figura 22	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 6 meses.....	119
Figura 23	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 9 meses.....	121
Figura 24	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 12 meses.....	123
Figura 25	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β no grupo controle.....	127
Figura 26	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β no grupo experimental.....	127

Figura 27	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 1 mês.	129
Figura 28	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 3 meses.....	131
Figura 29	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 6 meses.....	133
Figura 30	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 9 meses.....	135
Figura 31	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 12 meses.....	137
Figura 32	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 no grupo controle.	141
Figura 33	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 no grupo experimental.	141
Figura 34	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 1 mês.	143
Figura 35	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 3 meses.....	145
Figura 36	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 6 meses.....	147
Figura 37	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 9 meses.....	149
Figura 38	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 12 meses.....	151
Figura 39	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL no grupo controle.	155

Figura 40	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL no grupo experimental.....	155
Figura 41	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 1 mês.....	157
Figura 42	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 3 meses.....	159
Figura 43	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 6 meses.....	161
Figura 44	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 9 meses.....	163
Figura 45	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 12 meses.....	165
Figura 46	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para os receptores RAGE no grupo controle.....	169
Figura 47	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para os receptores RAGE no grupo experimental.....	169
Figura 48	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para os receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 1 mês.	171
Figura 49	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para os receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 3 meses.	173
Figura 50	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para os receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 6 meses.	175
Figura 51	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para os receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 9 meses.	177
Figura 52	Fotomicrografias representativas das imunomarcações para os receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 12 meses.	179

Lista de Gráficos:

Gráfico 1	Cinética da expressão de MMP-2 nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle.....	84
Gráfico 2	Cinética da expressão de MMP-9 nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle.....	97
Gráfico 3	Cinética da expressão de TNF- α nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle.....	111
Gráfico 4	Cinética da expressão de IL-1 β nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle.....	125
Gráfico 5	Cinética da expressão de IL-6 nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle.....	139
Gráfico 6	Cinética da expressão de RANKL nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle.....	153
Gráfico 7	Cinética da expressão de RAGE nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle.....	167

Lista de Tabelas

Tabela 1	Especificidade, recuperação antigênica, diluições e tempo de incubação dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica.....	75
Tabela 2	Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de massa corporal (g) dos ratos no 14º dia de seguimento (1º coleta) e nos momentos de sacrifício (2º coleta).....	82
Tabela 3	Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de ingestão alimentar (g/12h) dos ratos no 14º dia de seguimento (1º coleta) e nos momentos de sacrifício (2º coleta).....	82
Tabela 4	Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de ingestão hídrica (mL/24h) dos ratos no 14º dia de seguimento (1º coleta) e nos períodos de sacrifício (2º coleta).....	82
Tabela 5	Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de diurese (mL/24h) dos ratos no 14º dia de seguimento (1º coleta) e nos momentos de sacrifício (2º coleta).....	83
Tabela 6	Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de glicemia (mg/dl) dos ratos no 14º dia de seguimento (1º coleta) e nos momentos de sacrifício (2º coleta).....	83
Tabela 7	Média e desvio padrão (DP) dos valores de glicosúria (mg/dl) dos ratos no 14º dia de seguimento (1º coleta) e nos momentos de sacrifício (2º coleta).....	83

Lista de Abreviaturas e Siglas

°: graus.

%: por cento.

μm: micrômetro.

a.C.: antes de Cristo.

AGEs: advanced glycation end products, produtos finais de glicosilação avançada.

AIDS: acquired immune deficiency syndrome, síndrome da imunodeficiência adquirida.

cm: centímetro.

DAB: cromógeno diaminobenzidina.

DP: desvio padrão.

DPs: doenças periodontais.

EDTA: etilenodiaminotetra acético sal dissódico.

g: gramas.

IgG: imunoglobulina G.

IKK: I *kappa* Kinase, quinase do inibidor do NF-κB.

IL: interleucina.

IRAK: interleukin-1 receptor-associated kinase, quinase do receptor da interleucina-1.

IRAK-1: interleukin-1 receptor-associated kinase-1, isoforma 1 da quinase do receptor da interleucina-1.

LPS: lipopolissacarídeos.

M: média.

mg/kg: miligramas por kilo.

mg/dl: miligramas por decilitro.

ml: mililitros.

mm: milímetros.

MMP: matrix metalloproteinase, metaloproteinase da matriz.

Myd88: myeloid differentiation factor 88, fator de diferenciação mielóide 88.

NF-κB: nuclear factor *kappa* B, fator de transcrição nuclear *kappa* B.

nm: nanômetro.

OPG: osteoprotegerina.

p: nível de significância, probabilidade.

PBS: phosphate buffered saline, tampão fosfato-salino.

PGE₂: prostaglandina E₂.

pH: potencial hidrogeniônico.

RAGE: receptor of advanced glycation end products, receptor dos produtos finais de glicosilação avançada.

RANK: receptor activator of NFkappa B, receptor de ativação associado ao NF-kappa B.

RANKL: receptor activator of NFkappa B ligand, ligante do receptor de ativação associado ao NF-kappa B.

SP: São Paulo.

TIMP: tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz.

TLRs: Toll like receptors, receptores do tipo Toll.

TNF- α : tumor necrosis factor alpha, fator de necrose tumoral alfa.

TIRAP: TIR domain-containing adaptor protein, receptor de domínio Toll de interleucina.

TRAF-6: tumor necrosis factor receptor associated factor-6, fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral.

TRAM: TRIF-related adaptor molecule, molécula adaptadora relacionada ao TRIF.

TRIF: TIR domain-containing adaptor-inducing interferon, proteína adaptadora contida em domínio TIR indutora de interferon.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	41
2 REVISÃO DE LITERATURA	45
2.1 A doença periodontal	47
2.2 O diabetes mellitus	51
2.3 O diabetes mellitus e a doença periodontal.....	54
3 PROPOSIÇÃO	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 Tratamento dos animais de experimentação.....	65
4.2 Grupos experimentais e indução do diabetes	65
4.3 Avaliações clínica e laboratorial	67
4.4 Eutanásia dos animais, coleta e fixação das hemimandíbulas.....	68
4.5 Procedimentos histotécnicos	69
4.6 Procedimentos imunohistoquímicos	69
4.7 Avaliação imunohistoquímica	75
4.8 Análise estatística dos dados	77

5 RESULTADOS.....	79
5.1 Indução do diabetes	81
5.2 Análise imunohistoquímica	84
5.2.1 Marcações para MMP-2	84
5.2.2 Marcações para MMP-9	97
5.2.3 Marcações para TNF- α	111
5.2.4 Marcações para IL-1 β	125
5.2.5 Marcações para IL-6	139
5.2.6 Marcações para RANKL.....	153
5.2.7 Marcações para RAGE.....	167
 6 Discussão	 181
 7 Conclusões	 195
 Referências	 199
 Anexos	 213

Introdução

1 Introdução

Estudos epidemiológicos têm apontado a doença periodontal como a patologia óssea mais prevalente em humanos, sendo a principal causa da perda de dentes em adultos. Os principais fatores de risco envolvidos na etiologia da doença periodontal são o biofilme bacteriano, idade, uso de tabaco, diabetes mellitus, AIDS e a expressão alterada de produtos do hospedeiro como mediadores inflamatórios. Dentre os fatores de risco envolvidos, o diabetes exerce notável influência sobre o periodonto (BORRELL *et al*, 2005; PAGE *et al*, 1997).

O *diabetes mellitus* é uma desordem metabólica complexa caracterizada por anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES, 2005). Esta condição sistêmica está intimamente associada à doença periodontal, uma vez que pacientes diabéticos apresentam maior severidade e prevalência desta patologia (PUCHER *et al*, 2002). Assim, em 1993, a doença periodontal foi caracterizada como a sexta complicação sistêmica mais frequente do diabetes (LOE, 1993). Nos pacientes diabéticos, o risco acentuado em desenvolver doenças periodontais deve-se às anormalidades metabólicas decorrentes do grau de controle metabólico do diabetes, idade, tempo de duração do diabetes e presença de biofilme bacteriano (SALVI *et al*, 1998).

Os efeitos deletérios do diabetes sobre o periodonto são amplamente descritos na literatura, entretanto os mecanismos envolvidos no estabelecimento e na progressão da doença periodontal associada ao diabetes permanecem pouco elucidados. Sendo assim, propusemos uma análise por imunohistoquímica do número de células marcadas em relação aos mediadores envolvidos na doença periodontal decorrente da indução do diabetes em ratos.

Revisão de Literatura

2 Revisão de Literatura

2.1. A Doença Periodontal

As doenças periodontais (DPs) são doenças infecciosas que acometem os tecidos de proteção e sustentação dos órgãos dentais, representando a principal causa da perda de dentes em adultos. São patologias ósseas iniciadas principalmente por microorganismos gram-negativos associados ao biofilme, desencadeando respostas imunes e inflamatórias (OFFENBACHER *et al*, 2008; KORNMAN, 2008; GIANNOBILE, 2008). Dentre os diferentes epítomos bacterianos, os lipopolissacarídeos (LPS), presentes na parede celular das bactérias gram-negativas, iniciam a resposta culminando em destruição do tecido periodontal (MADIANOS *et al*, 2005; GIANNOBILE, 2008).

Além da presença dos microorganismos patogênicos, a amplificação e a progressão deste processo são altamente dependentes da resposta imune e inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta às bactérias ou seus subprodutos (KINANE *et al*, 2001; TENG, 2003; COCHRAN, 2008; TROMBONE *et al*, 2008; LEE *et al*, 2009). Esta resposta pode resultar em destruição tecidual através de mecanismos envolvidos na produção de mediadores relacionados com a degradação da matriz extracelular. Estes mediadores também atuam sobre o processo de reabsorção óssea alveolar, interferindo na expressão de fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos (GARLET *et al*, 2003; TENG, 2003; GARLET *et al*, 2005; GARLET *et al*, 2006; GARLET *et al*, 2007; COCHRAN, 2008; GARLET *et al*, 2008).

Dentre as proteases envolvidas na degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular, estão as metaloproteases de matriz (MMPs), as quais desempenham suas atividades tanto em processos fisiológicos quanto patológicos (SORSA *et al*, 2004; HANNAS *et al*, 2007; GONÇALVES *et al*, 2008; PASSOJA *et al*, 2008; KUULA *et al*, 2009; LORENCINI *et al*, 2009). As MMPs são uma família de proteases cuja atividade é dependente de zinco e/ou cálcio, e são divididas em 4 subclasses com base na especificidade de seus substratos: collagenases, como a MMP-1 ou collagenase intersticial, ativa na degradação do colágeno fibrilar; gelatinases, também chamadas de collagenases do tipo IV (A ou MMP-2, e B ou

MMP-9), que apresentam alta atividade contra o colágeno desnaturado; estromalisinas, que degradam componentes de natureza não colágena presentes na matriz extracelular; e metaloproteases de membrana (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; SORSA *et al*, 2004; HANNAS *et al*, 2007; GIANNOBILE, 2008).

A ativação das MMPs é regulada por um grupo de proteínas endógenas, chamado de inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), conduzindo o processo de remodelação da matriz extracelular de forma extremamente controlada. Contudo, em diversos estados patológicos, verifica-se a elevação dos níveis de MMPs sem o aumento concomitante na expressão dos TIMPs, acentuando a degradação da matriz extracelular (REYNOLDS *et al*, 1994; VERSTAPPEN *et al*, 2006). Por outro lado, a elevação dos níveis de TIMPs ou diminuição dos níveis de MMPs também está associada a processos patológicos como descrito em casos de fibrose (CATANIA *et al*, 2007; HEMMANN *et al*, 2007; LIN *et al*, 2008).

Diversas MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-8, MMP-13) foram identificadas nos tecidos periodontais (KUBOTA *et al*, 1996; EJEIL *et al*, 2003; CESAR NETO *et al*, 2004; SMITH *et al*, 2004) e no fluido gengival (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-13) (ALPAGOT *et al*, 2001; KINANE *et al*, 2003; PASSOJA *et al*, 2008). São detectadas em baixos níveis em tecidos normais, porém altas concentrações são verificadas em tecidos inflamados (ALPAGOT *et al*, 2001; KINANE *et al*, 2003; SMITH *et al*, 2004). Da mesma forma, diversos TIMPs também são encontrados em tecidos periodontais (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3) (KUBOTA *et al*, 1996; EJEIL *et al*, 2003; GONÇALVES *et al*, 2008; KUBOTA *et al*, 2008) e no fluido gengival (TIMP-1, TIMP-2) (NOMURA *et al*, 1998; ALPAGOT *et al*, 2001; TUTER *et al*, 2005). Sendo assim, MMPs e TIMPs estão envolvidos no “turnover” fisiológico dos tecidos periodontais e na destruição tecidual observada nas doenças periodontais.

Contudo, os estudos relacionando o balanço entre MMPs e TIMPs em tecidos periodontais doentes e saudáveis são contraditórios (INGMAN *et al*, 1996; NOMURA *et al*, 1998; ALPAGOT *et al*, 2001; DAHAN *et al*, 2001, GARLET *et al*, 2006) e a contribuição destas moléculas na patogênese das doenças periodontais permanece parcialmente elucidada.

Além da destruição de tecido conjuntivo, a reabsorção óssea alveolar é um evento de extrema importância nas doenças periodontais. A integridade do tecido ósseo depende da manutenção do equilíbrio entre a reabsorção óssea pelos

osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. O RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B), seu receptor celular RANK (receptor de ativação do fator nuclear κ B), e a osteoprotegerina (OPG), receptor “decoy” de RANKL, foram identificados como os principais componentes moleculares do sistema de remodelação óssea (TAKAYANAGI, 2005; COCHRAN, 2008; LEIBBRANDT *et al*, 2008).

A ligação de RANKL ao RANK, expresso nos precursores de osteoclastos, é o principal evento estimulatório para diferenciação de precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros, bem como sua posterior ativação. A regulação da interação entre RANK e RANKL é realizada pela OPG uma vez que esta proteína se liga ao RANKL, impedindo sua interação com RANK. Sendo assim, não há diferenciação e ativação dos osteoclastos, regulando negativamente a reabsorção óssea alveolar (TAKAYANAGI, 2005; COCHRAN, 2008; LEIBBRANDT *et al*, 2008).

Conforme previamente descrito para o sistema MMPs/TIMPs, alterações no balanço da expressão de RANKL e OPG também estão intimamente ligados com a patogênese de diversas patologias que apresentam aumento na deposição ou na reabsorção óssea (ROMAS *et al*, 2002; SEZER *et al*, 2003; KWAN TAT *et al*, 2004; FOUQUE-AUBERT *et al*, 2008). Com relação às doenças periodontais, estudos recentes têm mostrado que níveis elevados de RANKL são encontrados no fluido gengival e no tecido periodontal em condições de doença. Tais estudos também sugerem que o balanço entre RANKL e OPG determina a atividade da doença em relação à reabsorção óssea (LIU *et al*, 2003; GARLET *et al*, 2004; MOGI *et al*, 2004; VERNAL *et al*, 2005).

Sabe-se que enzimas como as MMPs estão envolvidas na degradação de matriz extracelular bem como o eixo RANK/RANKL/OPG está associado ao controle da reabsorção óssea alveolar. Entretanto, a expressão destes mediadores também é regulada por outras proteínas como as citocinas. De modo geral, as citocinas inflamatórias atuam tanto na iniciação quanto na manutenção da resposta imune frente aos desafios bacterianos. De fato, alterações na expressão de citocinas são refletidas em desregulação da resposta imune, resultando na destruição tecidual (PRESHAW *et al*, 2007). Em relação à patogênese da doença periodontal, provavelmente o conhecimento mais bem estabelecido está relacionado ao papel de

citocinas inflamatórias clássicas como o TNF- α e a IL-1 β (BAKER, 2000; GRAVES *et al*, 2003; GRAVES *et al*, 2008).

A citocina TNF- α , produzida principalmente por macrófagos ativados, age sobre os mecanismos de recrutamento de leucócitos, induzindo o aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e em leucócitos. Além disso, apresenta um envolvimento relevante na osteoclastogênese (KWAN TAT *et al*, 2004) e estimula a produção local de quimiocinas que atuam na manutenção e/ou na amplificação da reação inflamatória local (GRAVES *et al*, 2003; BOYCE *et al*, 2005; GRAVES *et al*, 2008; VAN DYKE *et al*, 2008). Portanto, TNF- α apresenta importante papel na resistência a infecções por diversos patógenos. De fato, altos níveis de TNF- α têm sido identificados em lesões periodontais e no fluido gengival de pacientes com doença periodontal (GRAVES *et al*, 2001). E ainda, a ausência de TNF- α em modelos experimentais de doença periodontal prejudica a ação antimicrobiana elevando significativamente a expressão da carga bacteriana nos tecidos periodontais (GARLET *et al*, 2007).

Atuando de forma sinérgica ao TNF- α , IL-1 β estimula a produção de mediadores secundários como quimiocinas, cicloxigenases, prostaglandinas e metaloproteases (MMPs), envolvidas na reabsorção óssea alveolar e na degradação da matriz extracelular. Estes mediadores secundários potencializam a ação de moléculas de adesão, estimulam a produção de quimiocinas e induzem a expressão de outros mediadores que amplificam e sustentam a resposta inflamatória (GRAVES *et al*, 2003; PRESHAW *et al*, 2007; GRAVES *et al*, 2008; OFFENBACHER *et al*, 2008; VAN DYKE *et al*, 2008).

Assim como TNF- α , altos níveis de IL-1 β foram detectados no fluido gengival de pacientes com doença periodontal (TOKER *et al*, 2008). É possível que os níveis elevados de IL-1 β estimulem a expressão de outros mediadores envolvidos no processo inflamatório como a interleucina-6 (KWAN TAT *et al*, 2004).

A citocina pleiotrópica IL-6 é produzida por diferentes tipos celulares como, por exemplo, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos (HIRANO *et al*, 1990; OKADA *et al*, 1998). A expressão constitutiva é muito discreta, contudo níveis aumentados são observados na presença de doenças periodontais (MARCACCINI *et al*, 2009; SAXLIN *et al*, 2009; VIDAL *et al*, 2009). O aumento na expressão desta citocina interfere na homeostasia do periodonto, promovendo a reabsorção óssea e

estimulando a expressão de moléculas de adesão. Desta forma, IL-6 parece estar envolvida tanto nos mecanismos de reabsorção óssea como na degradação do tecido conjuntivo (MOREIRA *et al*, 2007; PALMQVIST *et al*, 2008; LEE *et al*, 2009).

Considerando os efeitos decorrentes da expressão de citocinas e mediadores do processo inflamatório no tecido periodontal, a modulação da expressão destas proteínas é de grande importância no estabelecimento e na severidade das doenças periodontais. Diversas condições sistêmicas estão associadas com a expressão alterada de mediadores inflamatórios, dentre elas destaca-se o *diabetes mellitus* como um importante fator modificador na homeostasia do periodonto (IACOPINO *et al*, 1995; GROSSI *et al*, 1998; PUCHER *et al*, 2002; VAN DYKE *et al*, 2005).

2.2. O Diabetes mellitus

O diabetes é uma doença metabólica sistêmica crônica decorrente da deficiência total ou parcial na síntese da insulina pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Caracteriza-se pela alteração no metabolismo de proteínas, lipídeos, sais minerais e, principalmente, de glicose (COMMITTEE ON DIABETES RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY, 2000; STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES, 2005). Os primeiros registros da doença constam no Papiro de Ebers, em 1500 a.C. Desde então, a doença vem atingindo proporções alarmantes. Em 1995, o diabetes afetava 135 milhões de pessoas, contudo as estimativas apontam que no ano de 2025 existirão aproximadamente 300 milhões de diabéticos no mundo. O Brasil abriga cerca de cinco milhões e ocupa o sexto lugar no ranking mundial em relação ao número de portadores da disfunção no mundo. As estimativas epidemiológicas para o Brasil também apontam a elevação dos índices atingindo 11,6 milhões de pessoas em 2025 (KING *et al*, 1998). Estas informações são de extrema relevância uma vez que o diabetes apresenta um forte impacto na saúde da população mundial, resultando em altos índices de morbidade e mortalidade nos indivíduos afetados. E ainda, é importante ressaltar o alto custo financeiro referentes a cuidados médicos e a queda de produtividade (ZIMMET *et al*, 2001; GILMER *et al*, 2005).

A classificação atual compreende o diabetes do tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos específicos (DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005; MEALEY *et al*, 2006). O diabetes do tipo 1 é uma doença autoimune que afeta principalmente pacientes jovens, compondo cerca de 15% do total de diabéticos. O início dos sinais e sintomas é abrupto, ocorrendo na infância ou na puberdade. Caracteriza-se pela ausência na produção de insulina, necessitando de frequentes injeções do hormônio (DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005). É o tipo mais agressivo, apresentando complicações mais severas como hiperglicemia intensa e cetoacidose. Resulta em aumento na susceptibilidade a infecções, neuropatia, retinopatia, nefropatia, aterosclerose acelerada associada a infarto no miocárdio e amputações (VERNILLO *et al*, 2001; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005). Sua etiologia está relacionada com a destruição autoimune de aproximadamente 80% das células beta das ilhotas pancreáticas. A destruição destas células resulta em deficiência total ou acentuada na produção de insulina. Esta destruição também pode ser mediada por infecções virais. Neste caso, as células beta são destruídas quando indivíduos com suposta predisposição genética são submetidos a eventos específicos como infecções virais, induzindo a resposta imunopatológica (MEALEY *et al*, 2006; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005).

O diabetes do tipo 2 compreende aproximadamente 85% dos casos. Inicialmente, não há deficiência profunda do hormônio, contudo grande parte dos indivíduos exibe posteriormente redução contínua na expressão de insulina acompanhada por redução da sensibilidade ao hormônio. Desta forma, assim como no diabetes do tipo 1, pacientes acometidos por diabetes do tipo 2 podem necessitar de reposição de insulina (DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005).

O início dos sinais e sintomas é lento e gradual, com complicações menos severas. A etiopatogenia do diabetes do tipo 2 é baseada na secreção insuficiente de insulina, em alterações moleculares do hormônio e na estrutura de seus receptores. A hiperglicemia ocorre devido à redução da sensibilidade à insulina também descrita como resistência tecidual ao hormônio. O desenvolvimento do diabetes do tipo 2 é diretamente relacionado com grandes quantidade de tecido adiposo visceral, uma vez que células adiposas podem reduzir a sensibilidade à

insulina. Portanto, o diabetes do tipo 2 é causado por uma combinação da resistência tecidual a insulina associada a produção insuficiente deste hormônio (GRAVES *et al*, 2007).

Os pacientes raramente desenvolvem cetoacidose, não sendo completamente dependentes de insulina exógena. Porém, a produção de insulina diminui com a progressão da doença tornando 25% deles dependentes da complementação do hormônio (COMMITTEE ON DIABETES RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY, 2000; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005; KUO *et al*, 2008).

Os principais fatores de risco envolvidos no diabetes do tipo 2 são a obesidade, a dieta hipercalórica e os hábitos sedentários (BLOOMGARDEN, 2006). O diagnóstico ocorre em pacientes com aproximadamente 40 anos exibindo redução do metabolismo e aumento de peso. Os fatores relacionados à obesidade são responsáveis pelo aumento dos níveis de insulina, o que diminui a expressão de seus receptores gerando resistência tecidual ao hormônio. Exercícios físicos e dietas hipocalóricas aumentam o número e podem recuperar a sensibilidade destes receptores. Além disso, agentes hipoglicemiantes podem ser utilizados como coadjuvantes no tratamento (KRISKA *et al*, 2003; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005; BLOOMGARDEN, 2006).

A maior incidência de diabetes do tipo 2 no mundo encontra-se na comunidade indiana de Gila River, no Arizona, onde cerca de 50% da população com aproximadamente 35 anos é acometida pela doença (KRISKA *et al*, 2003; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005; BLOOMGARDEN, 2006). A incidência acentuada ocorre devido à baixa diversidade genética, resultado da pequena miscigenação. Além disso, fatores como obesidade e hábitos sedentários devem ser considerados (BENNETT *et al*, 1971; BAIER *et al*, 2004).

Há outros tipos menos frequentes da doença como o diabetes gestacional, uma condição associada ao período de gestação. Em algumas mulheres, a gravidez pode precipitar o aparecimento do diabetes. A incidência do diabetes gestacional é de aproximadamente 2% do total de mulheres grávidas. Desta forma, salienta-se a importância da solicitação de exame de glicemia para mulheres entre a 24ª e 26ª semana de gestação (GUTHMILLER *et al*, 2001; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005).

Além disso, o diabetes pode também se manifestar induzido por drogas ou medicamentos, associado a doenças pancreáticas, doenças de etiologia hormonal e algumas síndromes genéticas (COMMITTEE ON DIABETES RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY, 2000; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005; MEALEY *et al*, 2006).

Apesar de diferentes etiologias, as complicações sistêmicas clássicas são comuns aos diversos tipos de diabetes, sendo elas: retinopatia, nefropatia, neuropatia, doenças cardiovasculares e distúrbios na cicatrização, acompanhadas por fadiga e perda de peso (COMMITTEE ON DIABETES RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY, 2000; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005; STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES, 2005). As principais complicações bucais incluem: hipossalivação, candidíase, abscessos periapicais, hipocalcificação dentária, distúrbios na cicatrização, atraso na erupção dentária, síndrome da ardência bucal, recessão gengival, aumento na incidência e na severidade das cáries dentárias e das doenças periodontais (GALEA *et al*, 1986; FISKE, 2004; SOELL *et al*, 2007; LAMSTER *et al*, 2008; SKAMAGAS *et al*, 2008).

2.3. O diabetes e a doença periodontal

Há muito tempo a associação entre diabetes e doença periodontal desperta o interesse dos pesquisadores (WILLIAMS, 1928). Sendo assim, as pesquisas avançaram revelando que pacientes diabéticos apresentam maior severidade na doença periodontal demonstrada por valores maiores na profundidade de sondagem, na perda de inserção e nos níveis de perda óssea, além da alta prevalência de periodontite avançada (CIANCIOLA *et al*, 1982; COMMITTEE ON DIABETES RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY, 2000; JAHN, 2004; SALVI *et al*, 2005). Com base nestas informações, o diabetes é considerado como fator de risco na prevalência e severidade da doença periodontal, sendo esta caracterizada como a sexta complicação sistêmica mais frequente do diabetes (LOE, 1993; GENCO, 1996; PUCHER *et al*, 2002; MEALEY *et al*, 2006; SOELL *et al*, 2007; KINANE *et al*, 2008; LAMSTER *et al*, 2008; SKAMAGAS *et al*, 2008). De fato, dados epidemiológicos demonstram que as doenças periodontais acometem aproximadamente um terço dos indivíduos diabéticos (KIDAMBI *et al*, 2008). Apesar

da influência do diabetes sobre a homeostasia do periodonto ser bem estabelecida, os mecanismos envolvidos neste processo permanecem pouco conhecidos.

Diversos estudos foram realizados visando elucidar as vias responsáveis pelo aumento na susceptibilidade de indivíduos diabéticos às doenças periodontais (TERVONEN *et al*, 1986; FIRATLI, 1997; GRAVES *et al*, 2003; MEALEY *et al*, 2006). Possivelmente, a hiperglicemia e a hiperlipidemia crônicas decorrentes do diabetes aumentam a susceptibilidade e a agressividade das doenças periodontais por favorecerem a formação de produtos finais de glicosilação avançada ou “advanced glycation end products” (AGEs) (VLASSARA *et al*, 2002).

Estes produtos constituem uma classe de moléculas heterogêneas formadas quando as proteínas expostas à aldose do açúcar são submetidas a um processo de glicosilação não enzimática e oxidação, o que resulta na formação dos AGEs. Desta forma, os AGEs são resultado da adição não enzimática de moléculas de glicose a proteínas. O número de moléculas de glicose adicionadas às proteínas ocorre de forma tempo e dose-dependente, ou seja, o tempo de hiperglicemia e a quantidade de glicose interferem neste processo. Em condições fisiológicas, a formação dos AGEs é lenta e afeta principalmente moléculas de meia-vida longa como o colágeno, atuando no processo de envelhecimento (STERN *et al*, 2002). Entretanto, estas reações ocorrem de forma acelerada no estado hiperglicêmico característico do diabetes. De fato, as concentrações séricas de AGEs são significativamente mais elevadas na presença do diabetes (BROWNLEE *et al*, 1984, VLASSARA *et al*, 2002; PEPPA *et al*, 2003).

A formação dos AGEs ocorre através da glicosilação, também denominada como reação de Maillard. Inicialmente, ocorre a formação de um composto instável decorrente da condensação de um grupamento carbonila de açúcar (como a glicose) com um grupamento amina (como o aminoácido lisina). Após a formação, este composto sofre uma série de rearranjos, o que a torna mais estável. Este composto de maior estabilidade é chamado de produto de Amadori ou produtos iniciais da reação de Maillard. Os produtos de Amadori possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primários, originando os produtos avançados da reação de Maillard ou produtos finais de glicosilação avançada (BROWNLEE *et al*, 1984, VLASSARA *et al*, 2002; PEPPA *et al*, 2003).

Depois de formados, estes compostos são considerados importantes mediadores na patogênese das complicações diabéticas, sendo capazes de

modificar irreversivelmente as propriedades químicas e funcionais de diferentes estruturas biológicas (BROWNLEE *et al*, 1984, VLASSARA *et al*, 2002; PEPPA *et al*, 2003).

Os efeitos mediados pelos AGEs são resultantes da sua interação com receptores específicos denominados RAGE. Estes receptores estão presentes em células endoteliais, células musculares lisas, linfócitos, monócitos e neurônios; tanto em animais quanto em humanos (IACOPINO *et al*, 1995; LALLA *et al*, 1998; HOLLA *et al*, 2001; SANTANA *et al*, 2003). A interação dos compostos AGE com seus receptores específicos RAGE está envolvida na iniciação de sinais intracelulares que resultam em alteração do fenótipo celular. Assim, esta interação favorece a geração de um meio pró-inflamatório através de estímulos para promover e/ou prolongar a inflamação. Além disso, estimula a apoptose e interfere na produção e remodelação da matriz extracelular (IACOPINO *et al*, 1995; LALLA *et al*, 1998; HOLLA *et al*, 2001; SANTANA *et al*, 2003).

Quando acumulados no plasma e em alguns tecidos, como o tecido gengival, os AGEs parecem ser responsáveis pelo desenvolvimento de diversas complicações como: alteração no fenótipo dos macrófagos, aumento da destruição tecidual e na reabsorção óssea alveolar, aumento da produção de proteína C reativa e citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (LALLA *et al*, 1998; SOSKOLNE *et al*, 2001; RENVERT, 2003; SANTANA *et al*, 2003; JAHN, 2004; JANKET *et al*, 2008).

O aumento na expressão destes mediadores inflamatórios é responsável pela ativação de osteoclastos e collagenases, conduzindo a destruição do tecido ósseo e conjuntivo (SOSKOLNE *et al*, 2001). Desta forma, acredita-se que a hiperglicemia persistente decorrente do diabetes seja responsável pela exacerbação da resposta inflamatória iniciada pelos periodontopatógenos (LAMSTER *et al*, 2008). De fato, os pacientes diabéticos exibem resposta inflamatória exacerbada aos LPS, possivelmente devido a liberação acentuada de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (NISHIMURA *et al*, 1998; SALVI *et al*, 1998; RENVERT, 2003). Além disso, foi observado que macrófagos provenientes de pacientes diabéticos são capazes de produzir maiores quantidades de TNF- α e IL-1 β em resposta ao LPS (SALVI *et al*, 1998). E ainda, salienta-se que tanto o diabetes do tipo 1 quanto o diabetes do tipo 2 são associados com níveis elevados de marcadores sistêmicos de inflamação tais como TNF- α e IL-6 (NAGUIB *et al*, 2004; GRAVES *et al*, 2007).

Experimentos realizados bloqueando o receptor RAGE em ratos diabéticos comprovam o envolvimento da interação AGE-RAGE no aumento da severidade da doença periodontal. O bloqueio deste receptor resultou em aceleração na cicatrização, diminuição da perda óssea alveolar e redução da inflamação e da liberação de citocinas inflamatórias. Ou seja, o bloqueio do RAGE resultou em supressão da reabsorção óssea alveolar e redução do quadro inflamatório (LALLA *et al*, 1998; NISHIMURA *et al*, 1998). Da mesma forma, a inibição dos AGEs diminuiu a expressão de TNF- α e IL-6 no tecido gengival de camundongos diabéticos (GRAVES *et al*, 2007).

Acredita-se que o aumento na severidade da doença periodontal em decorrência do diabetes seja resultado da exacerbação da resposta inflamatória aos periodontopatógenos. Ainda neste aspecto, é importante salientar que a microflora subgengival de pacientes diabéticos tem se mostrado semelhante à microflora observada em pacientes não diabéticos (SALVI *et al*, 2005; EBERSOLE *et al*, 2008).

Desta forma, a interação AGE-RAGE e a infecção periodontal parecem estabelecer uma relação dupla de resposta metabólica e destruição tecidual, resultando em doença periodontal mais severa e maior dificuldade no controle glicêmico. Acredita-se que a maior severidade da doença periodontal na presença do diabetes seja decorrente da liberação acentuada de mediadores inflamatórios em resposta à interação AGE-RAGE (GROSSI *et al*, 1998). Contudo, os mecanismos envolvidos neste processo permanecem pouco elucidados.

Visando facilitar o estudo da influência do diabetes sobre a patogênese da doença periodontal, modelos experimentais têm sido utilizados com sucesso devido a vantagens como fácil manuseio, baixo custo, maior resistência a infecções e, principalmente, pela semelhança dos tecidos e respostas periodontais humanas (RAMAMURTHY *et al*, 1974; GOLUB *et al*, 1982; SCHELLINI *et al*, 1995; HE *et al*, 2004). Além disso, a utilização de ratos em modelos experimentais permite a análise da progressão das alterações periodontais proveniente do diabetes em um menor intervalo de tempo uma vez que o rato apresenta um ciclo de vida relativamente curto.

Tendo em vista a influência do diabetes sobre os sistemas MMPs/TIMPs e RANKL/OPG bem como a expressão de mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da doença periodontal, torna-se importante o conhecimento dos mecanismos potencialmente envolvidos na regulação destes fatores no

microambiente periodontal. Certamente, a análise dos fatores relacionados a estes mecanismos contribuirá para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas das doenças periodontais na presença do diabetes.

Resultados prévios (CLAUDINO *et al*, 2007) obtidos pelo nosso grupo demonstraram o estabelecimento e a progressão de alterações histológicas compatíveis com o desenvolvimento de doença periodontal em ratos após a indução do diabetes. Salienta-se que não foi realizado nenhum tipo de indução de doença periodontal tais como inoculação de bactérias ou utilização de ligaduras. Desta forma, foi demonstrado que somente o diabetes grave não compensado é capaz de promover o estabelecimento e a progressão da doença periodontal em ratos. Baseado nestes resultados, a etapa seguinte, realizada neste estudo, buscou analisar as alterações na resposta inflamatória que possivelmente contribuíram para o estabelecimento e o desenvolvimento da doença periodontal associada ao diabetes em ratos.

Proposição

3 Proposição

Este estudo visa analisar os possíveis mecanismos biológicos envolvidos na indução da doença periodontal decorrente da indução do diabetes com aloxana após 1, 3, 6, 9 e 12 meses.

Detalhadamente, os objetivos deste estudo são:

- Analisar o número de células marcadas para TNF- α , IL-1 β , IL-6, MMP-2, MMP-9 e RANKL na doença periodontal experimental decorrente da indução do diabetes em ratos através de reações de imunohistoquímica.
 - Analisar o número de células marcadas para os receptores RAGE na doença periodontal experimental decorrente da indução do diabetes em ratos através de reações de imunohistoquímica.
-

Material e Métodos

4 Material e métodos

4.1 Tratamento dos animais de experimentação

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, Wistar), com aproximadamente 250g e com três meses de idade, provenientes do Biotério Central do Campus da UNESP de Botucatu. Estes animais foram transferidos para o Biotério do Centro de Pesquisas Experimentais do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da mesma instituição onde permaneceram durante todo o período experimental. Os ratos receberam alimentação líquida (água) e sólida (ração em grãos para ratos marca Purina) *ad libitum* permanecendo à temperatura de 23°C e período claro-escuro de 12 horas. A Comissão de Ética em Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) emitiu parecer favorável ao desenvolvimento projeto de pesquisa referente ao mestrado, a qual foi corroborada pela Faculdade de Odontologia de Bauru (USP) em 20 de setembro de 2005. Para realização dos experimentos referentes ao doutorado, a Comissão de Ética em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP) emitiu novo parecer favorável em 12 de março de 2008 (033/2007) conforme disposto nos Anexos.

4.2 Grupos experimentais e indução do diabetes

Grupo controle: 25 ratos que receberam aplicação de solução salina.

Grupo diabético: 25 ratos com diabetes induzido quimicamente pela administração de aloxana.

A administração de aloxana foi realizada em 182 ratos, porém somente 78 animais preencheram os critérios de seleção adotados para o diabetes grave. Dentre os 78 animais, 25 deles foram destinados ao grupo diabético deste estudo. Todos os animais que responderam positivamente à indução do diabetes foram utilizados concomitantemente em outros estudos sob a orientação do Dr. César Tadeu Spadella (ALBERTI *et al*, 2004; MARQUES *et al*, 2005).

Os animais dos grupos controle e diabético foram subdivididos, por sorteio, em cinco subgrupos com 1, 3, 6, 9 e 12 meses de acompanhamento. O delineamento experimental para utilização dos animais e indução do diabetes está ilustrado na Figura 1.

Indução do diabetes:

A administração de uma solução aquosa de aloxana a 2% (2,4,5,6 tetra oxihexahidropirimida - Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) foi realizada em 182 ratos por uma das veias caudais do animal em dose única de 42 mg/kg.

Após jejum alimentar de 12 horas com fornecimento de água *ad libitum*, cada rato foi acondicionado em uma caixa aquecida com lâmpada elétrica por aproximadamente 10 minutos objetivando uma melhor visualização das veias da cauda. Após esse procedimento, o animal foi acomodado em uma caixa individual para inoculação da droga através de uma agulha de calibre 13 X 4,5 mm. Após 30 minutos, os animais voltaram a receber alimentação normalmente.

Foram selecionados para o grupo diabético somente os animais que apresentaram alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com o diabetes grave após duas determinações sucessivas (7 e 14 dias após a indução). As alterações clínicas compreenderam perda de peso, aumento da ingestão hídrica e do débito urinário. As alterações laboratoriais foram representadas por glicemia em jejum acima de 200mg/dl, glicosúria maior ou igual a 3000 mg/dl e glicosúria positiva (+++) no teste de fitas reagentes (Pharmaceutical Corp. YEONDONG-Seoul Korea).

Todos os procedimentos de indução do diabetes, seleção e acompanhamento dos animais bem como exames laboratoriais foram realizados por técnicos especializados do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

Figura 1 – Delineamento experimental para indução do diabetes e coleta das amostras.

4.3 Avaliações clínica e laboratorial

Os dados clínicos de massa corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, bem como os dados laboratoriais referentes às dosagens de glicemia e de glicosúria de todos os animais foram realizados com 14 dias de seguimento no grupo controle e no 14º dia após a indução do diabetes no grupo experimental. Posteriormente, as avaliações foram feitas após o 1º, 3º, 6º, 9º e 12º mês de seguimento, com base na data de sacrifício de cada grupo.

Nos períodos previamente definidos, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais, 24 horas antes da coleta das mandíbulas. Durante o período noturno de 12 horas foram fornecidos volumes conhecidos de ração, sendo retirados nas 12 horas seguintes (jejum de 12 horas). Volumes conhecidos de água foram fornecidos 24 horas antes da coleta. Posteriormente, foi determinada a massa corporal dos animais (em gramas), o volume de água ingerida em 24 horas (ingestão hídrica de 24 horas, em mililitros), a quantidade de alimento consumido em 12 horas

(ingestão alimentar de 12 horas, em gramas) e o volume de diurese de 24 horas (em mililitros).

Para a dosagem da glicemia (mg/dl) foram coletadas amostras de 1,5ml de sangue. Nas dosagens iniciais (14º dia), os animais foram acondicionados em uma caixa aquecida com lâmpada elétrica durante 10 minutos e anestesiados com pentobarbital sódico (Cristália Produtos Químicos Farm. Ltda – Itapira/SP) na dosagem de 30 mg/Kg de peso corporal por via intraperitoneal. Posteriormente, a cauda dos animais foi seccionada visando a retirada do volume de sangue necessário. Após a hemostasia, os animais foram novamente acomodados em caixas individuais recebendo água e ração *ad libitum*. Nos momentos do sacrifício, o sangue foi coletado por punção cardíaca a céu aberto. O soro foi separado por centrifugação a 3000rpm e submetido a quantificação da glicose pelo método enzimático (CELM – Cia Equipadora de Laboratórios Modernos – Barueri/SP) da glicose oxidase. A intensidade da cor formada foi proporcional à concentração de glicose na amostra, podendo ser quantificada através de leituras espectrofotométricas a 510 nm.

Após a determinação do volume de diurese, foram coletados 10ml de urina para determinação da glicosúria por meio de fitas reagentes (Pharmaceutical Corp. YEONDONG-Seoul, Korea).

4.4 Eutanásia dos animais, coleta e fixação das hemimandíbulas

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Cristália Produtos Químicos Ltda – Itapira/SP), administrado por via intraperitoneal, na dose de 30mg/kg. Amostras de sangue para exames foram obtidas por punção cardíaca, por meio da abertura do tórax até a exsanguinação e morte dos animais. Em seguida, as mandíbulas foram removidas por dissecação e corte com tesoura, sendo posteriormente divididas em duas partes (hemimandíbulas direita e esquerda) e imediatamente fixadas em solução de formalina a 10% com tampão fosfato durante 7 dias em temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente “overnight”.

4.5 Procedimentos histotécnicos

Após a fixação, foi realizada a desmineralização em solução de EDTA pH 7,2 à temperatura de 2 a 8°C por sessenta dias, com trocas semanais da solução e monitoramento através de análise radiográfica. As peças foram posteriormente submetidas à desidratação gradual em álcool, seguida de xilol e processamento em parafina. Cortes semisseriados de 6µm de espessura foram obtidos em um micrótomo Leitz-Jung, com intervalo de 20µm e corados por hematoxilina e eosina para a análise prévia (CLAUDINO *et al*, 2007). Todo o processamento histológico foi realizado no laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

4.6 Procedimentos imunohistoquímicos

Visando a realização das marcações de imunohistoquímica, foram obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura, sendo estes colocados sobre lâminas de vidro silanizadas (cola a base de poli-D-lisina) (Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) e submetidas à imunomarcação pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Foram utilizadas dois cortes semisseriados por animal para cada uma das marcações de imunohistoquímica realizadas.

A imunohistoquímica é uma técnica que emprega anticorpos para detectar, quantificar e localizar proteínas específicas. Inicialmente, o sítio antigênico é exposto ao anticorpo primário e, posteriormente ao anticorpo secundário. O anticorpo secundário apresenta alta afinidade ao anticorpo primário, permitindo a ligação entre eles. Neste estudo, foram utilizados anticorpos secundários biotinilados, ou seja, anticorpos marcados com biotina. A presença da biotina confere alta afinidade na ligação com enzimas, atuando como ponte entre o complexo enzimático estreptavidina-peroxidase e o anticorpo secundário. O complexo enzimático estreptavidina-peroxidase-biotina tem como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final que confere cores aos antígenos teciduais marcados. Neste estudo, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina – DAB que confere aos antígenos uma coloração acastanhada.

Figura 2 – Esquema das etapas de imunomarcação pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase. 1) ligação do anticorpo primário com a proteína alvo (antígeno). 2) Ligação do anticorpo secundário biotinilado ao anticorpo primário. 3) Ligação do complexo estreptavidina-peroxidase com a biotina presente no anticorpo secundário. 4) Conversão de um cromógeno diaminobenzidina – DAB pelo complexo estreptavidina-peroxidase conferindo aos antígenos uma coloração acastanhada.

O protocolo básico para as imunomarcações foi:

Desparafinização, diafanização e re-hidratação:

Os cortes inicialmente colocados na estufa a 56°C para o início da desparafinização e adesão na lâmina. Procedeu-se a incubação em xilol (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt - Germany) com 2 banhos de 10 minutos para realização da desparafinização e diafanização. A re-hidratação foi realizada em banhos com concentrações decrescentes de etanol (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt - Germany) sendo etanol 100% por 10 minutos, etanol 95% por 10 minutos e etanol 70% por 5 minutos. Posteriormente, os cortes foram submetidos a um banho de 10 minutos em água destilada seguido por um banho de 5 minutos em PBS.

Inativação da peroxidase endógena:

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da incubação dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos).

Digestão enzimática para recuperação dos epítomos:

Para a recuperação dos epítomos, foram utilizados diferentes métodos de digestão enzimática, sendo eles:

- Incubação dos cortes com solução de pepsina 0,5% (Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. Este método foi utilizado para as marcações de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e RAGE.
- Incubação dos cortes com proteinase K (Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) na concentração de 0,4mg/ml em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. Este método foi utilizado para as marcações de RANKL.
- Incubação dos cortes com solução tamponada de citrato de sódio (10mM, pH 6.0) em calor úmido a 95°C por 20 minutos. Este método foi utilizado para as marcações de MMP-2 e MMP-9.

Após recuperação antigênica, os cortes foram resfriados em temperatura ambiente e lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos). Em seguida, foi realizada a secagem da lâmina com papel filtro ao redor dos cortes histológicos para demarcação com demarcador Dako pen® (cod. S2002 - Dakocytomation Carpinteria, CA, USA).

Bloqueio das proteínas do soro:

Visando reduzir as ligações inespecíficas com o anticorpo, os cortes foram incubados em solução de leite em pó desnatado Molico® (Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba, São Paulo - Brasil) a 7% em PBS por 40 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos).

Exposição aos anticorpos:

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS pH 7,4 contendo BSA a 1% e gotejados sobre as lâminas, permanecendo em câmara úmida por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS (3 banhos de 5 minutos) e expostos ao anticorpo secundário biotinilado em câmara úmida durante 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS (3 banhos de 5 minutos).

Para controle negativo, um dos cortes foi incubado somente com o anticorpo secundário sem exposição prévia com o anticorpo primário. Juntamente ao material a ser analisado, foi adicionado um corte de determinada estrutura com descrição prévia de expressão da proteína em questão, caracterizando o controle positivo. Fotomicrografias referentes ao controle positivo e negativos das reações de imunohistoquímica estão ilustrados nos Anexo 1 e 2.

Controle positivo:

RANKL, TNF- α , IL-1 β : estudos prévios demonstraram a expressão destes mediadores na presença de doença periodontal (GARLET et al, 2005; GARLET et al, 2006; SILVA et al, 2007). Sendo assim, foram utilizados cortes de tecido periodontal de ratos após indução de doença periodontal com ligadura (7 e 14 dias).

MMP-9, MMP-2 e RAGE: de acordo com o fabricante, foram utilizados cortes de tecido pulmonar de ratos expostos ao tabaco.

Anticorpos utilizados:

- Anticorpo primário anti-MMP-9 (sc-6840 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:200 e anticorpo secundário rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
 - Anticorpo primário anti-MMP-2 (sc-58386 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:100 e anticorpo secundário rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
 - Anticorpo primário anti-RANKL (sc-7628- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:50 e anticorpo secundário rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
 - Anticorpo primário anti-RAGE (ab3611 – Abcam Inc., Cambridge, USA) na diluição de 1:50 e anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-B (sc-2040 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
 - Anticorpo primário anti- TNF- α (sc-1348 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:50 e anticorpo secundário rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
 - Anticorpo primário anti-IL-1 β (sc-7884 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:50 e anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-B (sc-2040 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
 - Anticorpo primário anti-IL-6 (sc-1265 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:50 e anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-B (sc-2040 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
-

Deteção do complexo anticorpo primário-anticorpo secundário:

Os cortes foram incubados na solução de streptavidina-peroxidase (Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) por 20 minutos, sendo posteriormente lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos).

Exposição ao substrato cromogênico DAB (Diaminobenzidina):

Após a exposição à solução de streptavidina-peroxidase, as lâminas foram lavadas com PBS (3 banhos de 5 minutos) e expostas à solução do DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidina, Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) por 2 a 5 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS (1 banho de 5 minutos) e em água destilada (2 banhos de 10 minutos).

Contra-coloração e montagem:

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e contra-coradas por Hematoxilina de Harris a 5% por 1 minuto. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada (2 banhos de 5 minutos), desidratados em concentrações crescentes de etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi realizada utilizando resina sintética Entellan® (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt - Germany).

Os protocolos utilizados em cada imunomarcação estão descritos resumidamente na Tabela 1.

Tabela 1 – Especificidade, recuperação antigênica, diluições e tempo de incubação dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica.

Especificidade	Recuperação antigênica	Diluição	Tempo de incubação	Anticorpo secundário	Diluição	Tempo de incubação
MMP-2 (sc-58386) Santa Cruz Biotechnology	Solução tamponada de citrato de sódio (10mM, pH 6.0) em calor úmido a 95°C por 20 minutos	1:100	2 horas	rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774) Santa Cruz Biotechnology	1:500	1 hora
MMP-9 (sc-6840) Santa Cruz Biotechnology	Solução de citrato de sódio 10mM e pH 6.0 em calor úmido a 95°C por 20 minutos	1:200	2 horas	rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774) Santa Cruz Biotechnology	1:500	1 hora
TNF- α (sc-1348) Santa Cruz Biotechnology	Solução de pepsina 0,5% por 20 minutos em temperatura ambiente	1:50	2 horas	rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774) Santa Cruz Biotechnology	1:500	1 hora
IL-1 β (sc-7884) Santa Cruz Biotechnology	Solução de pepsina 0,5% por 20 minutos em temperatura ambiente	1:50	2 horas	goat anti-rabbit IgG-B (sc-2040) Santa Cruz Biotechnology	1:500	1 hora
IL-6 (sc-1265) Santa Cruz Biotechnology	Solução de pepsina 0,5% por 20 minutos em temperatura ambiente	1:50	2 horas	goat anti-rabbit IgG-B (sc-2040) Santa Cruz Biotechnology	1:500	1 hora
RANKL (sc-7628) Santa Cruz Biotechnology	Proteinase K 0,4mg/ml por 20 minutos em temperatura ambiente	1:50	2 horas	rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774) Santa Cruz Biotechnology	1:500	1 hora
RAGE (ab3611) Abcam Inc.	Solução de pepsina 0,5% por 20 minutos em temperatura ambiente	1:50	2 horas	goat anti-rabbit IgG-B (sc-2040) Santa Cruz Biotechnology	1:500	1 hora

4.7 Avaliação imunohistoquímica

A análise em microscopia de luz convencional consistiu primeiramente de uma descrição detalhada do padrão de marcação tecidual das células para cada anticorpo, seguido pela quantificação das células com imunomarcação positiva utilizando o retículo II de integração Zeiss. As imagens foram capturadas através do sistema de análise de imagens, utilizando o software Kontron KS300 (Carl Zeiss). Foram avaliados aproximadamente 20 campos no tecido periodontal cada animal (2

cortes por animal) (Figura 03). A quantificação de células positivas foi expressa como número de células marcadas por unidade de área de tecido para cada imunomarcação. A unidade de área do retículo foi calculada a partir de uma lâmina de calibração Zeiss com unidade lineares que equivalem a 10 μ m. Este valor foi transformado em mm² na magnitude de 1000 vezes, após o cálculo da área do retículo. As lâminas foram avaliadas duas vezes pelo mesmo examinador, em tempos diferentes no microscópio óptico com aumento de 1000 vezes. Foram consideradas positivas as células que apresentaram coloração acastanhada.

Figura 3. Distribuição dos campos para a análise de morfometria nos tecidos periodontais (A) e retículo de integração (B). A metodologia adotada utilizou a contagem de células imunomarcadas em aproximadamente 20 campos compreendidos nos tecidos periodontais de ratos. A contagem foi realizada através do retículo de integração II Zeiss. Os campos representativos das regiões do periodonto (região próxima a crista óssea alveolar, média e apical) estão indicadas nas setas.

4.8 Análise estatística dos dados

A análise entre os grupos controle e diabético foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes foram realizados pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, EUA).

Resultados

5 Resultados

5.1 Indução do diabetes

Dos 182 ratos que receberam a administração de aloxana, 78 preencheram os critérios de seleção adotados para o diabetes grave. Destes 78 animais, 28 (35,9%) morreram durante o seguimento em decorrência de anormalidades metabólicas, pneumonia e/ou caquexia, respectivamente com: 1 mês (14,3%), 3 meses (17,9%), 6 meses (17,9%), 9 meses (28,5%) e 12 meses (21,4%). Os demais animais, 50 (64,1%) permaneceram vivos até o momento do sacrifício, sendo utilizados concomitantemente em outros estudos (ALBERTI *et al*, 2004; MARQUES *et al*, 2005) realizados na Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) sob orientação do Dr. César Tadeu Spadella.

Todos os animais incluídos nos grupos diabéticos apresentaram alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com o diabetes grave. As alterações clínicas observadas nestes animais compreendem perda de peso, aumento da ingestão hídrica, alimentar e do débito urinário. As alterações laboratoriais foram representadas por glicemia em jejum acima de 200mg/dl, glicosúria maior ou igual a 3000 mg/dl. Os parâmetros clínicos de massa corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica e diurese estão apresentados nas TABELAS 2, 3, 4 e 5. Os dados laboratoriais como valores de glicemia e glicosúria estão apresentados nas TABELAS 6 e 7. Considerando os parâmetros clínicos e laboratoriais apresentados, evidencia-se o estabelecimento do diabetes grave nos ratos após a administração de aloxana.

Tabela 2 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de massa corporal (g) dos ratos no 14º dia de seguimento (1º coleta) e nos períodos de sacrifício (2º coleta).

	1 mês		3 meses		6 meses		9 meses		12 meses	
	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta
Não diabéticos										
M	329	420	324	470	344	542	390	620	336	572
DP	57,2	62	40,3	51,9	13,4	19,2	17,3	50	18,1	21,6
Diabéticos										
M	274	232	246	172	290	248	270	268	304	304
DP	16,7	27	25	16,4	40	48,1	30	57,6	21,9	29,6

Tabela 3 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de ingestão alimentar (g/12h) dos ratos no 14º dia de seguimento (1º coleta) e nos momentos de sacrifício(2º coleta).

	1 mês		3 meses		6 meses		9 meses		12 meses	
	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta
Não diabéticos										
M	19	23	21	31	25	19	31	16	24	24
DP	5,4	7,5	2,2	8,2	3,5	2,2	8,5	2,8	5,4	6,5
Diabéticos										
M	29	31	33	33	25	35	36	33	31	37
DP	8,9	7,4	5,7	7,5	8,6	6,1	4,1	2,7	6,5	4,4

Tabela 4 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de ingestão hídrica (mL/24h) dos ratos no 14º dia de seguimento (1º coleta) e nos períodos de sacrifício (2º coleta).

	1 mês		3 meses		6 meses		9 meses		12 meses	
	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta	1º coleta	2º coleta
Não diabéticos										
M	36	50	44	35	43	43	46	70	42	36
DP	8,2	10	5,4	3,5	13	12	5,7	10	10,9	8,9
Diabéticos										
M	184	202	220	250	159	240	252	222	137	230
DP	40,3	50,6	44,7	0	47,5	22,3	10,9	42,2	49,6	28,2

Tabela 5 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de diurese (mL/24h) dos ratos no 14^o dia de seguimento (1^o coleta) e nos momentos de sacrifício (2^o coleta).

	1 mês		3 meses		6 meses		9 meses		12 meses	
	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta
Não diabéticos										
M	3,4	3,4	8,4	9,8	4,8	7,6	13,6	9,3	5,2	6,8
DP	1,6	2,1	8,4	4,4	5,9	5,5	4,2	1,1	4,2	2,4
Diabéticos										
M	112,2	121,2	135,8	155,4	90	182,8	168,8	154	79	162,8
DP	21,6	36,7	34,1	21,2	42,1	30,7	39,9	49,6	63,8	11,7

Tabela 6 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos valores de glicemia (mg/dl) dos ratos no 14^o dia de seguimento (1^o coleta) e nos momentos de sacrifício (2^o coleta).

	1 mês		3 meses		6 meses		9 meses		12 meses	
	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta
Não diabéticos										
M	110,3	107,4	83,6	103,3	131,2	87,8	80,4	111,7	109,2	91,1
DP	16,9	28,3	7,36	11,7	16,8	8,9	6,6	7,3	25,1	19,2
Diabéticos										
M	337,3	389,9	415	383,8	345,1	391,5	451,6	431,1	296,9	372,5
DP	54,18	30,76	65,12	59,61	76,85	53,1	37,01	55,19	100,71	43,66

Tabela 7 – Média e desvio padrão (DP) dos valores de glicosúria (mg/dl) dos ratos no 14^o dia de seguimento (1^o coleta) e nos momentos de sacrifício (2^o coleta).

	1 mês		3 meses		6 meses		9 meses		12 meses	
	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta	1 ^o coleta	2 ^o coleta
Não diabéticos										
M	23,4	25,9	10,5	10,2	6	8,6	29,5	6	8,9	13,5
DP	9,3	19,9	5,1	5,1	3,4	4,7	8,1	3,7	18,7	3,4
Diabéticos										
M	8324,6	6932,4	8707	6065,4	11301	6434,2	7714,8	5017	9860,8	7543,6
DP	2775,8	1114,3	1820,5	854,6	3113,9	696,9	1801,6	1367,7	3184,8	427,1

5.2 Análise imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada em cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos diabéticos e não diabéticos acompanhados por 1, 3, 6, 9 e 12 meses. Em seguida, foram realizados procedimentos de imunohistoquímica pelo método da estreptavidina-peroxidase visando avaliar o número de células imunomarcadas para MMP-2, MMP-9, TNF- α , IL-1 β , IL-6, RANKL e RAGE.

5.2.1 Marcações para MMP-2

O grupo controle apresentou um número reduzido de células imunomarcadas nos períodos iniciais com tendência a aumento após 9 e 12 meses. O grupo experimental apresentou padrão discretamente aumentado em relação ao grupo controle nos períodos iniciais seguido de uma tendência de redução no período de 12 meses. A análise comparativa entre os grupos controle e experimental não demonstrou diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos períodos analisados (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Cinética da expressão de MMP-2 nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle. Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células MMP-2⁺ através de reações de imunohistoquímica. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. O grupo controle não apresentou variações entre os diferentes períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos diferentes períodos avaliados dentro do grupo experimental.

O padrão de marcação dos grupos controle e experimental está ilustrado nas Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

Figura 4 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 no grupo controle. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo controle foram submetidos à imunomarcação para MMP-2. A) grupo controle com 1 mês de seguimento, B) grupo controle com 3 meses de seguimento, C) grupo controle com 6 meses de seguimento, D) grupo controle com 9 meses de seguimento e E) grupo controle com 12 meses de seguimento.

Figura 5 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 no grupo experimental. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo controle foram submetidos à imunomarcação para MMP-2. A) grupo controle com 1 mês de seguimento, B) grupo controle com 3 meses de seguimento, C) grupo controle com 6 meses de seguimento, D) grupo controle com 9 meses de seguimento e E) grupo controle com 12 meses de seguimento.

Figura 6 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 1 mês. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para MMP-2. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 7 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 3 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação de MMP-2. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 8 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 6 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação de MMP-2 (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 9 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 9 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para MMP-2. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 10 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-2 nos grupos controle e diabético no período de 12 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para MMP-2. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

5.2.2 Marcações para MMP-9

Analisando comparativamente os grupos controle e experimental, observa-se uma tendência ao aumento no número de células marcadas nos grupos diabéticos principalmente no período de 12 meses (Gráfico 2). Os grupos experimentais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos diferentes tempos analisados (1, 3, 6, 9 e 12 meses após a indução do diabetes). O grupo controle também apresentou homogeneidade em todos os períodos avaliados.

Gráfico 2 – Cinética da expressão de MMP-9 nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle. Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células MMP-9⁺ através de reações de imunohistoquímica. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. O grupo controle não apresentou variações entre os diferentes períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos diferentes períodos avaliados dentro do grupo experimental.

O padrão de marcação dos grupos controle e experimental está ilustrado nas Figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17.

Figura 11 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 no grupo controle. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo controle submetidos à imunomarkação de MMP-9. A) grupo controle com 1 mês de seguimento, B) grupo controle com 3 meses de seguimento, C) grupo controle com 6 meses de seguimento, D) grupo controle com 9 meses de seguimento e E) grupo controle com 12 meses de seguimento.

Figura 12 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 no grupo experimental. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo experimental submetidos a imunomarkação de MMP-9. A) grupo diabético com 1 mês de seguimento, B) grupo diabético com 3 meses de seguimento, C) grupo diabético com 6 meses de seguimento, D) grupo diabético com 9 meses de seguimento e E) grupo diabético com 12 meses de seguimento.

Figura 13 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 1 mês. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para MMP-9. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 14 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 3 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para MMP-9. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 15 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 6 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para MMP-9 (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 16 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 9 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para MMP-9. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 17 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para MMP-9 nos grupos controle e diabético no período de 12 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para MMP-9. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

5.2.3 Marcações para TNF- α

Analisando comparativamente os grupos controle e experimental, observou-se maior número de células marcadas nos grupos diabéticos após 6 ($p<0,05$) e 12 meses ($p<0,001$) da indução do diabetes (Gráfico 3). O grupo controle apresentou poucas células marcadas em todos os períodos analisados, sendo que não foram observadas diferenças entre eles. O grupo diabético apresentou leve tendência ao aumento no período de 3 meses. Esta diferença tornou-se mais pronunciada nos períodos seguintes, sendo estatisticamente significativa nos períodos de 6 e 12 meses ($p<0,05$) quando comparadas com o grupo controle.

Gráfico 3 – Cinética da expressão de TNF- α nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle. Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células TNF- α^+ através de reações de imunohistoquímica. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e diabético ($p<0,05$). O grupo controle não apresentou variações entre os diferentes períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) nos diferentes períodos avaliados dentro do grupo experimental.

O padrão de marcação e as diferenças entre os grupos controle e diabético estão ilustradas nas Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24.

Figura 18 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α no grupo controle. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo controle submetidos à imunomarcação de TNF- α . A) grupo controle com 1 mês de seguimento, B) grupo controle com 3 meses de seguimento, C) grupo controle com 6 meses de seguimento, D) grupo controle com 9 meses de seguimento e E) grupo controle com 12 meses de seguimento.

Figura 19 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α no grupo experimental. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos dos grupos diabéticos submetidos à imunomarcação de TNF- α . A) grupo experimental após 1 mês da indução do diabetes, B) grupo experimental após 3 meses da indução do diabetes, C) grupo experimental após 6 meses da indução do diabetes, D) grupo experimental após 9 meses da indução do diabetes e E) grupo experimental após 12 meses da indução do diabetes.

Figura 20 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 1 mês. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para TNF- α . (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Estruturas demarcadas: dentina (#) e osso alveolar(*).

Figura 21 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 3 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcção para TNF- α . (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 22 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 6 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para TNF- α (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 23 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 9 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para TNF- α . (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 24 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α nos grupos controle e diabético no período de 12 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para TNF- α . (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

5.2.4 Marcações para IL-1 β

A presença do diabetes no grupo experimental resultou em maior número de células marcadas para IL-1 β no período de 12 meses quando comparados aos animais não diabéticos ($p>0,05$; Gráfico 4). No grupo controle, poucas células foram detectadas, mantendo este padrão por todo o período experimental. O grupo de animais diabéticos apresentou padrão semelhante ao grupo controle no período de 1 mês, revelando um discreto aumento nos períodos de 3, 6 e 9 meses. Contudo, após 12 meses da indução do diabetes, foi detectado um aumento significativo no número de células imunomarcadas para IL-1 β ($p<0,001$).

Gráfico 4 – Cinética da expressão de IL-1 β nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle. Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células IL-1 β^+ através de reações de imunohistoquímica. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e diabético ($p<0,05$). O grupo controle não apresentou variações entre os diferentes períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) nos diferentes períodos avaliados dentro do grupo experimental.

O padrão de marcação e as diferenças entre os grupos controle e experimental estão ilustradas nas Figuras 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31.

Figura 25 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β no grupo controle. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo controle submetidos à imunomarcação de IL-1 β . A) grupo controle com 1 mês de seguimento, B) grupo controle com 3 meses de seguimento, C) grupo controle com 6 meses de seguimento, D) grupo controle com 9 meses de seguimento e E) grupo controle com 12 meses de seguimento.

Figura 26– Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β no grupo experimental. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo experimental submetidos à imunomarcação de IL-1 β . A) grupo diabético com 1 mês de seguimento, B) grupo diabético com 3 meses de seguimento, C) grupo diabético com 6 meses de seguimento, D) grupo diabético com 9 meses de seguimento e E) grupo diabético com 12 meses de seguimento.

Figura 27 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 1 mês. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para IL-1 β . (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 28 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 3 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para IL-1 β . (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 29 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 6 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para IL-1 β . (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 30 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 9 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para IL-1 β . (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 31 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-1 β nos grupos controle e diabético no período de 12 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para IL-1 β . (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

5.2.5 Marcações para IL-6

O grupo controle apresentou um número pequeno de células marcadas para IL-6, mantendo este padrão em todos os períodos analisados. Comparativamente ao grupo controle, o grupo experimental apresentou aumento acentuado no número de células marcadas após 9 ($p<0,001$) e 12 meses ($p<0,01$) da indução do diabetes. Além disso, foram observadas diferenças estatisticamente significativas dentro do grupo experimental nos diferentes períodos analisados (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Cinética da expressão de IL-6 nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle. Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células IL-6⁺ através de reações de imunohistoquímica. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e diabético ($p<0,05$). O grupo controle não apresentou variações entre os diferentes períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) nos diferentes períodos avaliados dentro do grupo experimental.

O padrão de marcações e as diferenças entre os grupos controle e experimental estão ilustradas nas Figuras 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38.

Figura 32 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 no grupo controle. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo controle submetidos à imunomarcção para IL-6. A) grupo controle com 1 mês de seguimento, B) grupo controle com 3 meses de seguimento, C) grupo controle com 6 meses de seguimento, D) grupo controle com 9 meses de seguimento e E) grupo controle com 12 meses de seguimento.

Figura 33 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 no grupo experimental. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo experimental submetidos à imunomarcção para IL-6. A) grupo diabético com 1 mês de seguimento, B) grupo diabético com 3 meses de seguimento, C) grupo diabético com 6 meses de seguimento, D) grupo diabético com 9 meses de seguimento e E) grupo diabético com 12 meses de seguimento.

Figura 34 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 1 mês. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação de IL-6. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Estruturas demarcadas: dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 35 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 3 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para IL-6. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 36 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 6 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcção para IL-6 (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Estruturas demarcadas: dentina (#) e osso alveolar (*) .

Figura 37 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 9 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para IL-6. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 38 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-6 nos grupos controle e diabético no período de 12 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para IL-6. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

5.2.6 Marcações para RANKL

A marcação para RANKL no grupo controle mostrou-se bastante discreta em todos os períodos avaliados, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ($p>0,05$). Contudo, a presença do diabetes no grupo experimental resultou em aumento no número de células marcadas no período de 9 meses ($p<0,001$) quando comparados ao período correspondente no grupo controle (Figura 9). Nos períodos iniciais (1 e 3 meses), o grupo diabético manteve o mesmo padrão observado no grupo controle. Contudo, nos períodos seguintes (6, 9 e 12 meses), houve uma tendência ao aumento no número de células marcadas, sendo estatisticamente significativo no período de 9 meses em relação ao grupo controle ($p>0,05$; Gráfico 6).

Gráfico 6 – Cinética da expressão de RANKL nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle. Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células RANKL⁺ através de reações de imunohistoquímica. Os resultados apresentados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e diabético ($p<0,05$). O grupo controle não apresentou variações entre os diferentes períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) nos diferentes períodos avaliados dentro do grupo experimental.

O padrão de marcação e as diferenças entre os grupos controle e experimental estão ilustradas nas Figuras 39, 40, 41, 42, 43, 44 e 45.

Figura 39 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL no grupo controle. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo controle submetidos à imunomarcação para RANKL. A) grupo controle com 1 mês de seguimento, B) grupo controle com 3 meses de seguimento, C) grupo controle com 6 meses de seguimento, D) grupo controle com 9 meses de seguimento e E) grupo controle com 12 meses de seguimento.

Figura 40 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL no grupo experimental. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo diabéticos submetidos à imunomarcação para RANKL. A) grupo experimental após 1 mês da indução do diabetes, B) grupo experimental após 3 meses da indução do diabetes, C) grupo experimental após 6 meses da indução do diabetes, D) grupo experimental após 9 meses da indução do diabetes e E) grupo experimental após 12 meses da indução do diabetes.

Figura 41 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 1 mês. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para RANKL. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 42 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 3 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para RANKL. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 43 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 6 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para RANKL (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 44 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 9 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para RANKL. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 45 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL nos grupos controle e diabético no período de 12 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para RANKL. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

5.2.7 Marcações para RAGE

O perfil de marcação para RAGE no grupo controle foi discreto em todos os períodos analisados, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p>0,05$). Entretanto, o grupo experimental apresentou maior número de células marcadas após 6 ($p<0,001$), 9 ($p<0,01$) e 12 meses ($p<0,01$) da indução do diabetes quando comparados ao grupo controle nos períodos correspondentes. Além disso, foram observadas diferenças estatisticamente significativas dentro do grupo experimental nos diferentes períodos analisados (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Cinética da expressão de RAGE nas células do tecido periodontal nos grupos diabético e controle. Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células RAGE⁺ através de reações de imunohistoquímica. Os resultados apresentados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e diabético ($p<0,05$). O grupo controle não apresentou variações entre os diferentes períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) nos diferentes períodos avaliados dentro do grupo experimental.

O padrão de marcações e as diferenças entre os grupos controle e diabético estão ilustradas nas Figuras 46, 47, 48, 49, 50, 51 e 52.

Figura 46 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações referentes aos receptores RAGE no grupo controle. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo controle submetidos à imunomarcação para RAGE. A) grupo controle com 1 mês de seguimento, B) grupo controle com 3 meses de seguimento, C) grupo controle com 6 meses de seguimento, D) grupo controle com 9 meses de seguimento e E) grupo controle com 12 meses de seguimento

Figura 47 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações referentes aos receptores RAGE no grupo experimental. Cortes histológicos do tecido periodontal de ratos do grupo diabéticos submetidos à imunomarcação para RAGE. A) grupo experimental após 1 mês da indução do diabetes, B) grupo experimental após 3 meses da indução do diabetes, C) grupo experimental após 6 meses da indução do diabetes, D) grupo experimental após 9 meses da indução do diabetes e E) grupo experimental após 12 meses da indução do diabetes.

Figura 48 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações referentes aos receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 1 mês. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para RAGE. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*) .

Figura 49 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações referentes aos receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 3 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarkação para RAGE. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 50 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações referentes aos receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 6 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarkação para RAGE. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média do periodonto e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média do periodonto e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 51 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações referentes aos receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 9 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcação para RAGE. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Figura 52 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações referentes aos receptores RAGE nos grupos controle e diabético no período de 12 meses. Cortes histológicos provenientes das hemimandíbulas de ratos controle e diabéticos foram submetidos à imunomarcção para RAGE. (A, B e C) regiões do periodonto de ratos não diabéticos, sendo (A) região da crista óssea alveolar, (B) porção média e (C) porção apical do periodonto. (D, E e F) regiões do periodonto de ratos diabéticos, sendo (D) região da crista óssea alveolar, (E) porção média e (F) porção apical do periodonto. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina (#) e o osso alveolar (*).

Discussão

6 Discussão

Considerando que os dados epidemiológicos apontam uma elevação alarmante na incidência de diabetes na população mundial (KING *et al*, 1998), muitos estudos vêm sendo realizados buscando estabelecer propostas preventivas e terapêuticas para esta patologia e suas complicações. A hiperglicemia crônica decorrente do diabetes afeta diversos sistemas biológicos, resultando em alterações sistêmicas graves como retinopatia, nefropatia, neuropatia, doenças cardiovasculares e distúrbios na cicatrização, acompanhadas por fadiga e perda de peso (COMMITTEE ON DIABETES RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY, 2000; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2005; STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES, 2005). Dentre as complicações sistêmicas clássicas, a doença periodontal foi reconhecida como a sexta complicação do diabetes em 1993 (LOE, 1993). Apesar de alguns autores relatarem a inexistência desta relação (BENVENISTE *et al*, 1967; HOVE *et al*, 1970; BARNETT *et al*, 1984), grande parte dos estudos afirma que a doença periodontal é fortemente associada ao diabetes (CIANCIOLA *et al*, 1982; EMRICH *et al*, 1991; SAFKAN-SEPPALA *et al*, 1992; PUCHER *et al*, 2002).

Foi demonstrado que, na presença do diabetes, a doença periodontal é mais freqüente e mais severa (NELSON *et al*, 1990; NOVAES JUNIOR *et al*, 1997; DE POMMEREAU *et al*, 1992; COMMITTEE ON DIABETES RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY, 2000; TAYLOR, 2001). Contudo, os mecanismos envolvidos no aumento da incidência e da severidade das doenças periodontais associadas ao diabetes permanecem pouco conhecidos. Além disso, a expressão de citocinas pró-inflamatórias, fatores osteoclastogênicos e metaloproteases nos tecidos periodontais não é bem caracterizada na presença do diabetes. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a participação dos mediadores inflamatórios relacionados a resposta imune e inflamatória na doença periodontal associada ao diabetes.

O modelo experimental utilizado neste estudo apresenta uma interessante peculiaridade. Grande parte dos modelos experimentais que buscam avaliar os efeitos da hiperglicemia crônica sobre a doença periodontal utiliza a indução do diabetes concomitantemente à indução da doença periodontal. Porém, o modelo utilizado em nossos experimentos é baseado somente na indução do diabetes sem

qualquer interferência externa no periodonto como ligaduras ou inoculação de bactérias. Os resultados iniciais obtidos com este modelo demonstraram que somente a indução do diabetes é suficiente para o estabelecimento e progressão da doença periodontal em ratos (CLAUDINO *et al*, 2007). Foi observado que a indução do diabetes resultou em reabsorção óssea alveolar e destruição de tecidos moles, caracterizando as alterações histológicas compatíveis com a doença periodontal. Com base nestes resultados, a etapa seguinte proposta pelo nosso grupo foi analisar os possíveis mecanismos envolvidos na resposta imune e inflamatória que desencadeou o aumento da prevalência e severidade da doença periodontal previamente observado nos ratos diabéticos. Sendo assim, este estudo avaliou através de imunohistoquímica o número de células marcadas para TNF- α , IL-1 β , IL-6, RANKL, MMP-2, MMP-9 e para os receptores RAGE nos tecidos periodontais após 1, 3, 6, 9 e 12 meses da indução do diabetes em ratos.

Estudos prévios abordaram a influência do diabetes na expressão de MMPs, contudo os resultados são contraditórios e pouco conclusivos. Analisando a expressão de MMPs em pacientes diabéticos, foram detectados níveis séricos elevados de MMP-2 e MMP-9 (XUE *et al*, 2005; SHIAU *et al*, 2006). Outros autores relataram aumento nos níveis séricos de MMP-9 e TIMP-1, contudo não foram observadas variações na expressão de MMP-2 (MAXWELL *et al*, 2001). E ainda, em biópsias de úlceras presentes nos pés de pacientes diabéticos, a expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9 mostrou-se aumentada (LOBMANN *et al*, 2002). Entretanto, foi observada redução na expressão de MMP-2 no tecido renal de pacientes diabéticos (DEL PRETE *et al*, 1997).

A destruição da matriz extracelular observada nas doenças periodontais é conduzida pelo aumento na expressão de MMPs detectados tanto no fluido gengival quanto nos tecidos periodontais. Dentre as MMPs, a MMP-2 e a MMP-9 tem sido fortemente associadas com a destruição dos tecidos periodontais (MAKELA *et al*, 1994; SMITH *et al*, 2004; GARLET *et al*, 2006).

Além do aumento na expressão de MMPs em decorrência da doença periodontal, a presença do diabetes parece exacerbar ainda mais este efeito. Níveis mais elevados de MMP-8 e MMP-9 foram detectados no tecido gengival de pacientes diabéticos com doença periodontal, seguido pelos pacientes não diabéticos com doença periodontal, sendo que níveis basais foram detectados em pacientes saudáveis (KUMAR *et al*, 2006). Contudo, outros autores não observaram

diferenças significativas na expressão de MMP-1 e MMP-8 nos tecidos periodontais de pacientes diabéticos e não diabéticos (COLE *et al*, 2008). No fluido gengival, não foram observadas diferenças na expressão de MMP-1, MMP-8 e MMP-13 entre pacientes diabéticos e não diabéticos mesmo na presença de doença periodontal (SAFKAN-SEPPALA *et al*, 2006).

Os dados obtidos em nossos experimentos não demonstraram diferenças no padrão de marcação para as reações envolvendo a expressão de MMP-2 nos grupos controle e diabético. Sendo assim, nossos resultados apontam que a hiperglicemia crônica decorrente do diabetes parece não interferir na expressão de MMP-2 em nenhum dos grupos ou períodos analisados. Contudo, apesar da ausência de diferença estatisticamente significativa para as marcações de MMP-2, foi observado tendência a aumento na expressão de MMP-9 nos tecidos periodontais de ratos diabéticos após 9 e 12 meses da indução do diabetes.

Nossos resultados corroboram com estudos prévios realizados modelos experimentais (RYAN *et al*, 1999; SILVA *et al*, 2008). Em ratos diabéticos com doença periodontal induzida por ligadura, não foram detectadas alterações nos níveis de MMP-2. Entretanto, houve aumento na expressão de MMP-9 nos tecidos periodontais de ratos diabéticos (SILVA *et al*, 2008). Mesmo na ausência de doença periodontal, a expressão de MMP-8 e MMP-9 mostrou-se aumentada no tecido gengival de ratos diabéticos. Contudo, não foram observadas diferenças nos níveis de MMP-2 e MMP-3 entre os grupos controle e diabético (RYAN *et al*, 1999).

Estudos *in vitro* comprovaram que o diabetes interfere na expressão de MMPs. Coculturas de fibroblastos gengivais com macrófagos em meio hiperglicêmico resultaram em aumento na expressão de MMP-1. A quantidade de glicose presente no meio de cultura interfere nos níveis de expressão de MMP-1, estabelecendo uma resposta dose-dependente. A expressão de MMP-2, MMP-13, TIMP-1 e TIMP-2 também foram avaliadas, porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Assim, a hiperglicemia crônica decorrente do diabetes parece aumentar a expressão de MMPs e TIMPs, contudo este aumento ocorre de forma específica e controlada (SUNDARARAJ *et al*, 2009).

Além da influência sobre a expressão de MMPs, o diabetes parece interferir na expressão de diferentes citocinas. Nossos resultados revelaram que a presença de diabetes não compensado em ratos resultou em aumento na expressão de TNF-

α , principalmente nos períodos mais tardios do protocolo experimental (6 e 12 meses).

De fato, o diabetes parece ser responsável pelo aumento nos níveis séricos de TNF- α . Na presença de doença periodontal, foram detectados níveis séricos mais elevados desta citocina em pacientes diabéticos não compensados, seguido pelos pacientes diabéticos compensados, sendo que os pacientes não diabéticos apresentaram os menores níveis em relação aos grupos diabéticos (DAG *et al*, 2009). Resultados similares demonstraram aumento na expressão de TNF- α nos tecidos periodontais em pacientes diabéticos sem controle glicêmico efetivo com periodontite crônica. Contudo, não houve diferenças entre os níveis detectados em pacientes diabéticos compensados e pacientes não diabéticos com periodontite crônica (VENZA *et al*, 2010). Uma tendência ao aumento na expressão de TNF- α foi detectada em pacientes diabéticos com doença periodontal em relação aos pacientes saudáveis e aos pacientes não diabéticos com doença periodontal. Os autores sugerem que a ausência de diferenças estatisticamente significativas pode ter sido decorrente do pequeno número de pacientes avaliados (COLE *et al*, 2008). Resultados contraditórios descrevem que a presença concomitante do diabetes e da doença periodontal não interferiu na expressão de TNF- α nos tecidos periodontais. Pacientes não diabéticos sem doença periodontal apresentaram níveis similares aos pacientes diabéticos com doença periodontal. Os autores salientam que os experimentos de PCR utilizados na metodologia mensuram somente os níveis de RNA mensageiro, podendo interferir na interpretação dos dados. Além disso, o controle glicêmico observado no grupo diabético pode ter influenciado nos resultados (DUARTE *et al*, 2007).

Corroborando com nossos resultados, o aumento na expressão de TNF- α também foi observado em camundongos diabéticos após a inoculação oral de *Porphyromonas gingivalis*. A expressão de TNF- α estimulada pelo patógeno foi mais acentuada nos animais diabéticos quando comparados aos camundongos não diabéticos (NAGUIB *et al*, 2004). Experimentos utilizando culturas de macrófagos provenientes de pacientes diabéticos e não diabéticos comprovaram as alterações na resposta inflamatória. Macrófagos provenientes de pacientes diabéticos apresentam maior capacidade de expressão de TNF- α , quando comparados aos macrófagos oriundos de pacientes não diabéticos. Além disso, os macrófagos

provenientes de pacientes diabéticos com doença periodontal mais severa produzem quantidades mais elevadas deste mediador em relação aos pacientes diabéticos com doença periodontal leve e moderada (SALVI *et al*, 1998). Outros estudos relataram que o estímulo de LPS aumenta a expressão de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 *in vitro*. Contudo, na presença do diabetes, a expressão foi discretamente aumentada sem apresentar diferenças estatisticamente significativas (ARAYA *et al*, 2003).

Juntamente ao aumento na expressão de TNF- α , nossos resultados apontam aumento na expressão de IL-1 β nos animais diabéticos após 12 meses da indução do diabetes. Outros autores também relataram aumento na expressão de IL-1 β no fluido gengival em pacientes diabéticos com doença periodontal (SALVI *et al*, 1998). De fato, a hiperglicemia crônica característica do controle glicêmico ineficaz do diabetes foi associada a níveis mais elevados de IL-1 β no fluido gengival (ENGEBRETSON *et al*, 2004). Nos tecidos periodontais, a presença do diabetes também resultou em uma tendência a aumento na expressão de IL-1 β . Os níveis mais elevados de IL-1 β foram detectados nos pacientes diabéticos com doença periodontal, seguidos pelos pacientes somente com doença periodontal e pelos pacientes saudáveis (COLE *et al*, 2008).

Contudo, resultados contraditórios descrevem que pacientes diabéticos com doença periodontal apresentam redução nos níveis de IL-1 β no fluido gengival quando comparados aos pacientes não diabéticos (KARDESLER *et al*, 2008) enquanto outros autores não observaram diferenças na expressão desta citocina nos tecidos periodontais de pacientes diabéticos e não diabéticos na presença de doença periodontal (DUARTE *et al*, 2007).

É possível que o aumento na expressão de TNF- α e IL-1 β tenha atuado no aumento da expressão de IL-6 detectado após 9 e 12 meses nos animais diabéticos. Estudos mostram que níveis elevados na expressão de TNF- α e IL-1 β parecem regular a expressão de IL-6 (McCARTY *et al*, 1999; PALMQVIST *et al*, 2008). Após a confirmação da expressão constitutiva de IL-6 em culturas de fibroblastos gengivais, a estimulação destas culturas com TNF- α ou IL-1 β resulta em aumento na expressão de IL-6 (PALMQVIST *et al*, 2008). Da mesma forma, o meio de cultura hiperglicêmico acentua a liberação de IL-6, IL-1 β e TNF- α em macrófagos estimulados por LPS. Nestes experimentos, a expressão de IL-6 apresentou um

aumento de 27 vezes, seguido pelo TNF- α (6 vezes) e pela IL-1 β , com aumento na ordem de 4 vezes (NAREIKA *et al*, 2007). De fato, nossos resultados demonstram que o número de células imunomarcadas para IL-6 foi substancialmente maior quando comparado às marcações de IL-1 β e TNF- α .

Conforme observado em nossos resultados, o aumento na expressão de IL-6 na presença do diabetes foi descrito por outros autores (DUARTE *et al*, 2007; VENZA *et al*, 2010). Foi observado que o estabelecimento e a progressão da doença periodontal em pacientes não diabéticos acentua a expressão de IL-6. Entretanto, pacientes diabéticos com doença periodontal apresentam níveis ainda mais elevados quando comparados aos grupos não diabéticos (DUARTE *et al*, 2007; VENZA *et al*, 2010). Da mesma forma, outros estudos demonstraram uma tendência a aumento na expressão de IL-6 nos tecidos periodontais em pacientes diabéticos com doença periodontal (DUARTE *et al*, 2007; COLE *et al*, 2008). Esta tendência também foi observada no fluido gengival de pacientes diabéticos não compensados, quando comparados aos pacientes não diabéticos ou diabéticos com controle glicêmico efetivo (KURTIS *et al*, 1999).

IL-6 é uma citocina também considerada como potente estimulador da osteoclastogênese, estando fortemente envolvida na reabsorção óssea (McCARTY *et al*, 1999; PALMQVIST *et al*, 2008). Possivelmente, o aumento na expressão de IL-6 influenciou no aumento da expressão de RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B). Nossos resultados demonstraram este aumento após 9 meses da indução do diabetes com tendência a aumento nos períodos de 6 e 12 meses.

Corroborando com nossos resultados, camundongos diabéticos infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresentaram doença periodontal mais severa em relação aos camundongos não diabéticos. Concomitantemente, houve aumento na expressão de RANKL sugerindo que o eixo RANK/RANKL/OPG está envolvido nas bases moleculares relacionadas ao aumento na severidade da doença periodontal na presença do diabetes (MAHAMED *et al*, 2005). Além disso, a indução de diabetes em camundongos resultou em redução na densidade óssea acompanhada por aumento na expressão de RANKL, IL-1 β e IL-6 (MOTYL *et al*, 2009). Contudo, resultados contraditórios descrevem que a presença do diabetes em pacientes com doença periodontal não aumentou a expressão de RANKL. Os menores níveis de expressão foram observados em pacientes não diabéticos e sem

doença periodontal, seguido pelos pacientes diabéticos com doença periodontal (DUARTE *et al*, 2007).

Analisando os resultados em conjunto, é possível observar que a presença do diabetes interferiu de forma relevante na expressão de diversos mediadores relacionados ao estabelecimento das doenças periodontais. Apesar dos mecanismos envolvidos permanecerem pouco elucidados, há um consenso geral em relação ao papel dos produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) (LALLA *et al*, 1998; SCHMIDT *et al*, 2000; SCHMIDT *et al*, 2001).

A hiperglicemia crônica favorece a formação dos produtos finais de glicosilação avançada (AGEs), sendo que o ponto chave da relação entre diabetes e doença periodontal parece ser a interação destes compostos com seu receptor RAGE (SCHMIDT *et al*, 1996; LALLA *et al*, 2000). De fato, a interação AGE-RAGE é considerada como fator de propagação das diferentes complicações sistêmicas do diabetes (SCHMIDT *et al*, 2000; STERN *et al*, 2002; YAN *et al*, 2009), dentre elas a doença periodontal (LOE, 1993; LALLA *et al*, 1998). Esta interação pode ser descrita como um modelo de dois estágios onde o primeiro passo está baseado na ligação dos AGEs nos receptores RAGE. Esta interação ativa o segundo passo da via, caracterizado pela alteração do fenótipo das células, o que culmina na geração de um meio pró-inflamatório (LALLA *et al*, 1998; SCHMIDT *et al*, 2000; SCHMIDT *et al*, 2001). Nossos resultados também sugerem o envolvimento destes receptores, uma vez que foi observado um aumento no número de células imunomarcadas para o receptor RAGE em ratos diabéticos após 6, 9 e 12 meses da indução do diabetes.

Estudos prévios demonstraram um aumento na expressão dos receptores RAGE nos tecidos gengivais de pacientes diabéticos quando comparados aos pacientes não diabéticos com doença periodontal (SCHMIDT *et al*, 1996; KATZ *et al*, 2005). Da mesma forma, camundongos diabéticos apresentaram aumento na deposição de AGEs e na expressão de RAGE nos tecidos gengivais (LALLA *et al*, 1998).

O bloqueio da interação AGE-RAGE com receptores RAGE solúveis em camundongos diabéticos diminuiu a reabsorção óssea alveolar e a expressão de citocinas e metaloproteases, sendo um efeito dose-dependente (LALLA *et al*, 2000). Da mesma forma, a ausência deste receptor em camundongos geneticamente modificados resultou em redução na formação e função de osteoclastos, aumento na densidade óssea e redução na expressão de IL-6 (DING *et al*, 2006).

Além disso, a infusão de AGEs em camundongos não diabéticos foi responsável pelo aumento na expressão de IL-6 (SCHMIDT *et al*, 1994). *In vitro*, a incubação de AGE com monócitos humanos acentua a expressão de TNF- α , sendo que o uso de receptores RAGE solúveis bloqueia a expressão desta citocina (SCHMIDT *et al*, 1993). Assim como os monócitos, a incubação de fibroblastos com AGE diminui a expressão de colágeno, sendo tempo e dose-dependente (OWEN *et al*, 1998).

Desta forma, o estado hiperglicêmico característico do diabetes é associado com a desregulação da ativação do sistema imune inato, caracterizado por altos níveis de citocinas inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (NASSAR *et al*, 2007). Além disso, esta interação prejudica a síntese de colágeno e exacerba a atividade colagenolítica através do aumento da expressão de MMPs (RYAN *et al*, 1999). O aumento na expressão de mediadores inflamatórios e fatores osteoclastogênicos combinado às alterações no metabolismo do colágeno exercem relevante influência no estabelecimento e progressão das doenças periodontais associadas ao diabetes.

De fato, nossos resultados demonstraram esta notável desregulação no sistema imune inato em consequência da indução do diabetes. Uma vez que não houve indução de doença periodontal com agentes externos como inoculação de bactérias ou ligaduras, a doença periodontal observada foi decorrente somente da indução do diabetes. E ainda, salienta-se que todos os animais foram mantidos em condições idênticas, sendo que a indução do diabetes foi a única diferença entre os grupos. Considerando que o diabetes parece não alterar o perfil qualitativo e quantitativo da flora bacteriana normal dos tecidos periodontais (SALVI *et al*, 2005; EBERSOLE *et al*, 2008), é possível sugerir que o aumento na prevalência e na severidade das doenças periodontais seja decorrente das alterações na resposta imune e inflamatória. Estes dados estão de acordo com Golub *et al* (2006) que descreve que o diabetes atua na coindução e não apenas na exacerbação da doença periodontal. Os patógenos periodontais organizados no biofilme bacteriano constituem o primeiro passo desta via, elicitando inicialmente respostas menos acentuadas. O segundo passo envolve a exacerbação de resposta inflamatória sistêmica através do aumento na expressão de citocinas e metaloproteases. Sendo assim, a exacerbação do processo inflamatório mediado pelo diabetes é considerado como agente causal das alterações presentes no tecido periodontal.

Na doença periodontal, a resposta inicial contra os periodontopatógenos é executada pela imunidade inata estimulada por diversos epítomos bacterianos, dentre eles os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular das bactérias gram-negativas. O LPS é reconhecido principalmente por receptores do tipo Toll (TLRs), sendo que os receptores TLR2 e TLR4 parecem atuar de forma mais efetiva (HOU *et al*, 2000; KOCGOZLU *et al*, 2009). A sinalização através destes receptores parece ser o primeiro passo para a ativação de células inflamatórias como os monócitos. Contudo, as etapas seguintes das vias de sinalização intracelular permanecem parcialmente compreendidas, sendo que diferentes moléculas de sinalização estão envolvidas.

Myd88 é a molécula adaptadora comumente usada na sinalização via receptores TLRs. A sinalização intracelular é iniciada através de Myd88 que recruta IRAK, induzindo o processo de fosforilação. Em seguida, IRAK-1 se associa a TRAF-6 para ativar o complexo IKK, resultando na ativação de NF- κ B (MEDZHITOV *et al*, 1998, ANDREAKOS *et al*, 2004; DASU *et al*, 2008). E ainda, há vias alternativas envolvidas que utilizam outras proteínas ativadoras como TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor-inducing IFN*) e TRAM (*TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-related adaptor molecule*), resultando também na ativação do NF- κ B (YAMAMOTO *et al*, 2002; YAMAMOTO *et al*, 2006). Inicialmente, o NF- κ B está presente no citoplasma, porém, quando ativado, este fator de transcrição é translocado para o núcleo onde se liga ao sítio promotor de determinados genes (JOBIN *et al*, 2000). Assim, o NF- κ B regula a expressão de diferentes genes envolvidos na resposta imune e inflamatória, incluindo IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12 (JOBIN *et al*, 2000).

Possivelmente, esta via foi ativada tanto no grupo controle quanto no grupo experimental em virtude da presença das bactérias da flora normal, porém não houve estabelecimento nem progressão de doença periodontal no grupo controle. Considerando que não houve qualquer tipo de controle de biofilme bacteriano, a flora bacteriana normal era passível de ser reconhecida e desencadear os mecanismos de resposta do hospedeiro. Entretanto, mesmo após o possível reconhecimento, a baixa intensidade da resposta aos patógenos no grupo controle não permitiu o estabelecimento da doença, mantendo a homeostasia do microambiente periodontal.

Contudo, nos animais diabéticos, diversos componentes desta via se mostram alterados. Experimentos realizados com cultura de macrófagos revelaram aumento na expressão de receptores TLR2 e TLR4 em pacientes diabéticos do tipo 1 quando comparados aos pacientes não diabéticos (DEVARAJ *et al*, 2008). Além disso, houve elevação nos níveis de NF- κ B, Myd88 e TRIF, os quais se mostraram positivamente correlacionados com os níveis de expressão dos receptores TLR2 e TLR4. O aumento na expressão destes receptores também mostrou correlação positiva com altos níveis de hemoglobina glicosilada, relacionando a falta de controle glicêmico com a desregulação da resposta imune (DEVARAJ *et al*, 2008). Da mesma forma, foi observado que o aumento na expressão destes receptores bem como o aumento na expressão de NF- κ B e IL-1 β estão associados com as complicações microvasculares do diabetes (DEVARAJ *et al*, 2008).

De fato, o meio hiperglicêmico aumenta a expressão de receptores TLR2 e TLR4 de forma tempo e dose-dependente, resultando em uma sinalização dependente de Myd88 e na posterior em ativação do NF- κ B (DASU *et al*, 2008). Sendo assim, os altos níveis glicêmicos são responsáveis pelo aumento na expressão de Myd88, na fosforilação de IRAK-1 e na ativação de NF- κ B, concomitantemente ao aumento na expressão de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α (DASU *et al*, 2008). Desta forma, é possível sugerir que a presença mais acentuada destes receptores é um dos pontos relevantes para o aumento na expressão de mediadores inflamatórios observados em nossos resultados.

Além do aumento na expressão de receptores TLRs, a interação AGE-RAGE também favorece o estabelecimento de um meio pró-inflamatório através da ativação de vias de sinalização intracelular como NF- κ B, resultando em aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (BIERHAUS *et al*, 2001; SCHMIDT *et al*, 2001, VLASSARA *et al*, 2002; DING *et al*, 2006). Foi observado que a infusão de AGEs em camundongos não diabéticos resultou em ativação do fator nuclear de ativação κ B (COLLINS, 1993). Assim, juntamente com o aumento da expressão de receptores TLRs, a interação AGE-RAGE também parece contribuir para acentuar a expressão de ativação de NF- κ B.

Analizados em conjunto, os efeitos deletérios provenientes da hiperglicemia crônica são, pelo menos em parte, decorrentes de alterações na modulação da resposta imune. Esta desregulação nas respostas do hospedeiro resulta na

exacerbação do processo inflamatório, sendo um fator de extrema relevância para o desenvolvimento das complicações sistêmicas do diabetes, como a doença periodontal. É possível que esta desregulação seja decorrente da interação AGE-RAGE e do aumento na expressão de receptores TLRs que parece aumentar a expressão e/ou ativação de moléculas de sinalização intracelular, resultando em maior expressão de mediadores inflamatórios.

De fato, a relação entre diabetes e doença periodontal apresenta diferentes interfaces devido ao seu caráter complexo e multifatorial. A análise dos resultados obtidos nos permite sugerir que o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias está envolvido na modulação das lesões teciduais decorrentes do diabetes. Estes mediadores são extremamente importantes uma vez que interferem na magnitude da resposta inflamatória e da reabsorção óssea, bem como pelo atraso no reparo tecidual. Esses eventos biológicos podem explicar parcialmente o aumento na severidade da doença periodontal e na redução da capacidade de reparo tecidual observados na presença do diabetes.

No entanto, outros estudos são necessários para a efetiva caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na associação entre diabetes e doença periodontal. A elucidação destes mecanismos contribuirá para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas voltadas para o controle da prevalência e da severidade das doenças periodontais associadas ao diabetes.

Conclusões

7 Conclusões

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

1. A indução e a progressão do diabetes resultaram em aumento no número de células imunomarcadas para TNF- α , IL-1 β , IL-6 e RANKL nos tecidos periodontais de ratos.
2. Não foram observadas diferenças nas marcações de imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9 entre os grupos controle e diabético.
3. A indução e a progressão do diabetes resultaram em aumento no número de células imunomarcadas para o receptor RAGE nos tecidos periodontais de ratos.

Portanto, o estabelecimento e a progressão do diabetes em ratos favoreceram uma desregulação na expressão dos mediadores inflamatórios, interferindo na homeostasia do periodonto.

"All endings are also beginnings."

Mitch Albom

Referências

Referencias

- Diabetes and periodontal diseases. Committee on Research, Science and Therapy. American Academy of Periodontology. J Periodontol. 2000; 71(4): 664-78.
- Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2005; 28 Suppl 1: S37-42.
- Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care. 2005; 28 Suppl 1: S4-S36.
- Alberti S, Assis GF, Ceolin DS, Cestari TM, Spadella CT. Estudo morfométrico das glândulas parótidas de ratos com diabetes induzido pela aloxana. Braz Oral Res. 2004; 18: 243.
- Alpagot TS, Silverman S, Lundergan W, Bell C, Chambers D W. Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. J Periodontal Res. 2001; 36(3): 169-74.
- Andreaskos E, Sacre SM, Smith C, Lundberg A, Kiriakidis S, Stonehouse T, Monaco C, et al. Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP." Blood. 2004; 103(6): 2229-37.
- Araya AV, Pavez V, Perez C, Gonzalez F, Columbo A, Aguirre A, et al. Ex vivo lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 and PGE2 secretion in whole blood from Type 1 diabetes mellitus patients with or without aggressive periodontitis. Eur Cytokine Netw. 2003; 14(3): 128-33.
- Baier LJ, Hanson RL. Genetic studies of the etiology of type 2 diabetes in Pima Indians: hunting for pieces to a complicated puzzle. Diabetes. 2004; 53(5): 1181-6.
- Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. Microbes Infect. 2000 2: 1181-1192.
- Barnett ML, Baker RL, Yancey JM, MacMillan DR, Kotoyan M. Absence of periodontitis in a population of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients. J Periodontol. 1984 55(7): 402-5.
- Bennett PH, Burch TA, Miller M. Diabetes mellitus in American (Pima) Indians. Lancet. 1971 2(7716): 125-8.
- Benveniste RD, Bixler D, Conneally PM. Periodontal disease in diabetics. J Periodontol. 1967 38(4): 271-9.
- Bierhaus AS, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. Diabetes. 2001 50(12): 2792-808.
- Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodontal Res. 1993 28(6 Pt 2): 500-10.
- Bloomgarden ZT. Developments in diabetes and insulin resistance. Diabetes Care. 2006; 29(1): 161-7.
- Borrell LN, Papapanou PM. Analytical epidemiology of periodontitis. J Clin Periodontol. 2005; 32 Suppl 6: 132-58.
- Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. Keio J Med. 2005; 54(3): 127-31.
- Brownlee MH, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. Ann Intern Med. 1984; 101(4): 527-37.
-

Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292(3): F905-11.

Cesar Neto JB, de Souza AP, Barbieri D, Moreno H, Sallum EA, Nociti Jr FH. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J Periodontol*. 2004; 75(7): 995-1000.

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

Claudino M, Ceolin DS, Alberti S, Cestari TM, Spadella CT, Rubira-Bullen IR, et al. Alloxan-induced diabetes triggers the development of periodontal disease in rats. *PLoS ONE*. 2007; 2(12): e1320.

Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008; 79(8 Suppl): 1569-76.

Cole CM, Sundararaj KP, Leite RS, Nareika A, Slate EH, Sanders JJ, et al. A trend of increase in periodontal interleukin-6 expression across patients with neither diabetes nor periodontal disease, patients with periodontal disease alone, and patients with both diseases. *J Periodontal Res*. 2008; 43(6): 717-22.

Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest*. 1993; 68(5): 499-508.

Dag A, Firat ET, Arikan S, Kadiroglu AK, Kaplan A. The effect of periodontal therapy on serum TNF-alpha and HbA1c levels in type 2 diabetic patients. *Aust Dent J*. 2009; 54(1): 17-22.

Dahan MB, Nawrocki B, Elkaim R, Soell M, Bolcato-Bellemin AL, Birembaut P, et al. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(2): 128-36.

Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes*. 2008; 57(11): 3090-8.

de Pommereau VC, Dargent-Pare C, Robert JJ, Brion M. Periodontal status in insulin-dependent diabetic adolescents. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(9 Pt 1): 628-32.

Del Prete DF, Anglani F, Forino M, Ceol M, Fioretto P, Nosadini R, et al. Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase-2 gene in human NIDDM. *Diabetologia*. 1997; 40(12): 1449-54.

Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(2): 578-83.

Devaraj S, Jialal I, Yun JM, Bremer A. Demonstration of increased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in monocytes of type 1 diabetes mellitus patients with microvascular complications. *Metabolism*. 2010 *in press*.

Ding KH, Wang ZZ, Hamrick MW, Deng ZB, Zhou L, Kang B, et al. Disordered osteoclast formation in RAGE-deficient mouse establishes an essential role for RAGE in diabetes related bone loss. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340(4): 1091-7.

Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti Jr FH. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontal Res*. 2007; 42(4): 377-81.

Duarte PM, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr FH. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2007; 13(6): 594-9.

- Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2008; 79(4): 637-46.
- Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol.* 2003; 74(2): 188-95.
- Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991; 62(2): 123-31.
- Engelbrektson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2004; 75(9): 1203-8.
- Firatli E. The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. *J Periodontol.* 1997; 68(2): 136-40.
- Fiske J. Diabetes mellitus and oral care. *Dent Update.* 2004; 31(4): 190-6, 198.
- Fouque-Aubert A, Chapurlat R. Influence of RANKL inhibition on immune system in the treatment of bone diseases. *Joint Bone Spine.* 2008; 75(1): 5-10.
- Galea H, Aganovic I, Aganovic C. The dental caries and periodontal disease experience of patients with early onset insulin dependent diabetes. *Int Dent J.* 1986; 36(4): 219-24.
- Garlet GP. Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Doutorado, 2005.
- Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS, et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect.* 2005; 7(4): 738-47.
- Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147(1): 128-38.
- Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(1): 12-20.
- Garlet GP, Martins Jr W, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontol Res.* 2003; 38(2): 210-7.
- Garlet GP, Martins Jr W, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(8): 671-9.
- Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha FQ, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemotactic factors in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine.* 2008; 42(3): 330-5.
- Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115(5): 355-62.
-

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996; 67(10 Suppl): 1041-9.

Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol.* 2008; 79(8 Suppl): 1592-600.

Gilmer TP, O'Connor PJ, Rush WA, Crain AL, Whitebird RR, Hanson AM, et al. Predictors of health care costs in adults with diabetes. *Diabetes Care.* 2005; 28(1): 59-64.

Golub LM, Nicoll GA, Iacono VJ, Ramamurthy NS. In vivo crevicular leukocyte response to a chemotactic challenge: inhibition by experimental diabetes. *Infect Immun.* 1982; 37(3): 1013-20.

Golub LM, Payne JB, Reinhardt RA, Nieman G. Can systemic diseases co-induce (not just exacerbate) periodontitis? A hypothetical "two-hit" model. *J Dent Res.* 2006; 85(2): 102-5.

Goncalves LD, Oliveira G, Hurtado PA, Feitosa A, Takiya CM, Granjeiro JM, et al. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflamed gingival biopsies. *J Periodontol Res.* 2008; 43(5): 570-7.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003; 74(3): 391-401.

Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(2): 89-105.

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

Graves DT, Oskoui M, Volejnikova S, Naguib G, Cai S, Desta T, et al. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J Dent Res.* 2001; 80(10): 1875-9.

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

Guthmiller JM, Hassebroek-Johnson JR, Weenig DR, Johnson GK, Kirchner HL, Kohout FJ, et al. Periodontal disease in pregnancy complicated by type 1 diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2001; 72(11): 1485-90.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65(1): 1-13.

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

Hemann SJ, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol.* 2007; 46(5): 955-75.

Hirano TS, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* 1990; 11(12): 443-9.

Holla LI, Kankova K, Fassmann A, Buckova D, Halabala T, Znojil V. Distribution of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol.* 2001; 72(12): 1742-6.

Hou L, Sasaki H, Stashenko P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. *Infect Immun.* 2000; 68(8): 4681-7.

Hove KA, Stallard RE. Diabetes and periodontal patient. *J Periodontol.* 1970; 41(12): 713-18.

- Iacopino AM. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis.* 1995; 1(4): 214-229.
- Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1996; 23(12): 1127-32.
- Jahn C. Diabetes and periodontal health. *Dent Assist.* 2004; 73(4): 24-7; quiz 28-9.
- Janket SJ, Jones JA, Meurman JH, Baird AE, Van Dyke TE. Oral infection, hyperglycemia, and endothelial dysfunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(2): 173-9.
- Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278(3): C451-62.
- Kardesler LN, Buduneli N, Biyikoglu B, Cetinkalp S, Kutukculer N. Gingival crevicular fluid PGE2, IL-1beta, t-PA, PAI-2 levels in type 2 diabetes and relationship with periodontal disease. *Clin Biochem.* 2008; 41(10-11): 863-8.
- Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(1): 40-4.
- Kidambi S, Patel SB. Diabetes mellitus: considerations for dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139 Suppl: 8S-18S.
- Kinane D, Bouchard P. Periodontal diseases and health: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(8 Suppl): 333-7.
- Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, et al. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res.* 2003; 38(4): 400-4.
- Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand.* 2001;59(3): 154-60.
- King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998; 21(9): 1414-31.
- Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to P. gingivalis lipopolysaccharide. *J Dent Res.* 2009; 88(8): 741-5.
- Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol.* 2008; 79(8 Suppl): 1560-8.
- Kriska AM, Saremi A, Hanson RL, Bennett PH, Kobes S, Williams DE, et al. Physical activity, obesity, and the incidence of type 2 diabetes in a high-risk population. *Am J Epidemiol.* 2003; 158(7): 669-75.
- Kubota T, Itagaki M, Hoshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T, et al. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol.* 2008; 79(1): 166-73.
- Kubota T, Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol.* 1996; 41(3): 253-62.
-

Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehga IPK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2006; 77(11): 1803-8.

Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*. 2008; 122(4): 417-33.

Kurtis BH, Develioglu H, Taner IL, Balos K, Tekin IO. IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. *J Oral Sci*. 1999; 41(4): 163-7.

Kuula H, Salo T, Pirila E, Tuomainen AM, Jauhiainen M, Uitto VJ, et al. Local and systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. *Infect Immun*. 2009; 77(2): 850-9.

Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004; 15(1): 49-60.

Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol 2000*. 2000; 23: 50-62.

Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt AM. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontal Res*. 1998; 33(7): 387-99.

Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000; 105(8): 1117-24.

Lalla E, Lamster IB, Schmidt AM. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. *Ann Periodontol*. 1998; 3(1): 13-9.

Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2008; 139 Suppl: 19S-24S.

Lee SF, Andrian E, Rowland E, Marquez IC. Immune response and alveolar bone resorption in a mouse model of *Treponema denticola* infection. *Infect Immun*. 2009; 77(2): 694-8.

Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1143: 123-50.

Lin CS, Pan CH. Regulatory mechanisms of atrial fibrotic remodeling in atrial fibrillation. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(10): 1489-508.

Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med*. 2003; 11(1): 17-21.

Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*. 2002; 45(7): 1011-6.

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

Lorencini M, Silva JA, de la Hoz CL, Carvalho HF, Stach-Machado DR. Changes in MMPs and inflammatory cells in experimental gingivitis. *Histol Histopathol*. 2009; 24(2): 157-66.

- Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 Suppl 6: 57-71.
- Mahamed DA, Marleau A, Alnaeeli M, Singh B, Zhang X, Penninger JM, et al. G(-) anaerobes-reactive CD4+ T-cells trigger RANKL-mediated enhanced alveolar bone loss in diabetic NOD mice. *Diabetes*. 2005; 54(5): 1477-86.
- Makela M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res*. 1994; 73(8): 1397-406.
- Marcaccini AM, Meschiari CA, Sorgi CA, Saraiva MC, de Souza AM, Faccioli LH, et al. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. *J Periodontol*. 2009; 80(4): 594-602.
- Marques SFG. Nefropatia diabética experimental: associação do estresse oxidativo com as lesões renais crônicas observadas em ratos diabéticos aloxânicos. Estudo clínico, laboratorial, anatomopatológico e dos marcadores bioquímicos envolvidos nos mecanismos de injúria celular mediada pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). Botucatu, UNESP: 161. Doutorado, 2005.
- Maxwell PR, Timms PM, Chandran S, Gordon D. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2001; 18(10): 777-80.
- McCarty MF. Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. *Med Hypotheses*. 1999; 52(5): 465-77.
- Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006; 77(8): 1289-303.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 1998; 2(2): 253-8.
- Miller MC, Manning HB, Jain A, Troeberg L, Dudhia J, Essex D, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(3): 686-97.
- Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004; 83(2): 166-9.
- Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi AS, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*. 2007; 148(1): 119-26.
- Motyl K, McCabe LR. Streptozotocin, Type I Diabetes Severity and Bone. *Biol Proced Online*, 2007.
- Naguib G, Al-Mashat H, Desta T, Graves DT. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. *J Invest Dermatol*. 2004; 123(1): 87-92.
- Nareika A, Maldonado A, He L, Game BA, Slate EH, Sanders JJ, et al. High glucose-boosted inflammatory responses to lipopolysaccharide are suppressed by statin. *J Periodontal Res*. 2007; 42(1): 31-8.
- Nassar H, Kantarci A, van Dyke TE. Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 233-44.
- Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, Pettitt DJ, Saad MF, Genco RJ, et al. Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care*. 1990; 13(8): 836-40.
- Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y, et al. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol*. 1998; 3(1): 20-9.

Nomura T, Ishii A, Oishi Y, Kohma H, Hara K. Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. *Oral Dis.* 1998; 4(4): 231-40.

Novaes Junior AB, Pereira AL, de Moraes N, Novaes AB, et al. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. *J Periodontol.* 1991; 62(2): 116-22.

Novaes Junior AB, Silva MA, Batista Junior EL, dos Anjos BA, Novaes AB, Pereira AL. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. A 10-year follow-up study. *J Periodontol.* 1997; 68(4): 328-34.

Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol.* 2008; 79(8 Suppl): 1577-84.

Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(3): 248-66.

Owen W, Hou FF, Stuart RO, Kay J, Boyce J, Chertow GM, et al. Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products modulates collagen synthesis by human fibroblasts. *Kidney Int.* 1998; 53(5): 1365-73.

Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J.* 1997; 47(2): 61-87.

Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hanstrom L, Lerner UH. IL-1beta and TNF-alpha regulate IL-6-type cytokines in gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2008; 87(6): 558-63.

Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, et al. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2006; 281(5): 2414-29.

Passoja A, Ylipalosaari M, Tervonen T, Raunio T, Knuuttila M. Matrix metalloproteinase-8 concentration in shallow crevices associated with the extent of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(12): 1027-31.

Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and What Works. *Clinical Diabetes.* 2003; 21(4): 186-187.

Preshaw PM, Foster N, Taylor JJ. Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. *Periodontol 2000.* 2007; 45: 138-57.

Pucher JJ, Otomo-Corgel J. Periodontal disease and systemic health--diabetes. *J Calif Dent Assoc.* 2002; 30(4): 312-6.

Ramamurthy NS, Zebrowski EJ, Golub LM. Insulin reversal of alloxan-diabetes induced changes in gingival collagen metabolism of the rat. *J Periodontal Res.* 1974; 9(3): 199-206.

Renvert S. Destructive periodontal disease in relation to diabetes mellitus, cardiovascular diseases, osteoporosis and respiratory diseases. *Oral Health Prev Dent.* 2003; 1 Suppl 1: 341-57; discussion 358-9.

Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res.* 1994; 8(2): 312-9.

Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone.* 2002; 30(2): 340-6.

- Ryan ME, Ramamurthy NS, Sorsa T, Golub LM. MMP-mediated events in diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 878: 311-34.
- Safkan-Seppala B, Ainamo J. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1992; 19(1): 24-9.
- Safkan-Seppala B, Sorsa T, Tervahartiala T, Beklen A, Kontinen YT, et al. Collagenases in gingival crevicular fluid in type 1 diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2006; 77(2): 189-94.
- Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol.* 1998; 3(1): 40-50.
- Salvi GE, Kandylaki M, Troendle A, Persson GR, Lang NP. Experimental gingivitis in type 1 diabetics: a controlled clinical and microbiological study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(3): 310-6.
- Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003; 52(6): 1502-10.
- Saxlin T, Suominen-Taipale L, Leiviska J, Jula A, Knuuttila M, Ylostalo P. Role of serum cytokines tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the association between body weight and periodontal infection. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(2): 100-5.
- Schellini AS, Padovani CR, Spadella CT, Martins JL, Moraes Silva MA. O rato como modelo experimental do diabetes-estudo clínico e laboratorial. *Rev Cienc Biomed.* 1995; 16: 25-36.
- Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, et al. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(19): 8807-11.
- Schmidt A, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontal Res.* 1996; 31(7): 508-15.
- Schmidt A, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest.* 1993; 91(5): 2155-68.
- Schmidt A, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1498(2-3): 99-111.
- Schmidt A, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001; 108(7): 949-55.
- Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kuhne CA, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood.* 2003; 101(6): 2094-8.
- Shiau MY, Tsai ST, Tsai KJ, Haung ML, Hsu YT, Chang YH. Increased circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med.* 2006; 73(7): 1024-8.
- Silva JA, Lorencini M, Peroni LA, De La Hoz CL, Carvalho HF, Stach-Machado DR. The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and -9) in induced periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2008; 43(1): 48-54.
- Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007; 86(4): 306-19.
- Skamagas M, Breen TL, LeRoith D. Update on diabetes mellitus: prevention, treatment, and association with oral diseases. *Oral Dis.* 2008; 14(2): 105-14.
-

Smith PC, Munoz VC, Collados L, Oyarzun AD. In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2004; 39(2): 87-92.

Soell M, Hassan M, Miliauskaite A, Haikel Y, Selimovic D. The oral cavity of elderly patients in diabetes. *Diabetes Metab.* 2007; 33 Suppl 1: S10-8.

Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004; 10(6): 311-8.

Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol.* 2001; 6(1): 91-8.

Stern D, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Ver.* 2002; 54(12): 1615-25.

Sundararaj KP, Samuvel DJ, Li Y, Sanders JJ, Lopes-Virella MF, Huang Y. Interleukin-6 released from fibroblasts is essential for up-regulation of matrix metalloproteinase-1 expression by U937 macrophages in coculture: cross-talking between fibroblasts and U937 macrophages exposed to high glucose. *J Biol Chem.* 2009; 284(20): 13714-24.

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res.* 2005; 40(4): 287-93.

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

Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(4): 237-52.

Tervonen T, Knuuttila M. Relation of diabetes control to periodontal pocketing and alveolar bone level. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986; 61(4): 346-9.

Toker H, Poyraz O, Eren K. Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(6): 507-13.

Trombone APF, Ferreira Jr SB, Raimundo FM, de Moura KC, Avila-Campos MJ, Silva JS, Campanelli AP. Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *J Periodontal Res.* 2008; 14(4):232-239.

Tuter G, Kurtis B, Serdar M, Yucel A, Ayhan E, Karaduman B, et al. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(9): 1011-5.

Van Dyke TE, Kornman KS. Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *J Periodontol.* 2008; 79(8 Suppl): 1503-7.

Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* 2005; 7(1): 3-7.

Venza I, Visalli M, Cucinotta M, De Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2010; 81(1): 99-108.

Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(4): 383-9.

- Vernillo AT. Diabetes mellitus: Relevance to dental treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(3): 263-70.
- Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res.* 2006; 85(12): 1074-84.
- Vidal FC, Figueredo CM, Cordovil I, Fischer RG. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *J Periodontol.* 2009; 80(5): 786-91.
- Vlassara H, Palace RW. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002; 251(2): 87-101.
- Williams JB. Diabetic periodontoclasia. *J Am Dent Assoc.* 1928; 15(4): 523-29.
- Xue M, Thompson PJ, Clifton-Bligh R, Fulcher G, Gallery ED, Jackson C. Leukocyte matrix metalloproteinase-9 is elevated and contributes to lymphocyte activation in type I diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37(11): 2406-16.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2002; 169(12): 6668-72.
- Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2006; 41(6): 554-9.
- Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med.* 2009; 87(3): 235-47.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001; 414(6865): 782-7.
-

Anexos

Anexo 1- Fotomicrografias representativas dos controles positivo e negativo para as imunomarcações para MMP-2, MMP-9 e RAGE. O controle positivo e negativo das reações foi realizado em cortes histológicos provenientes de tecido pulmonar de ratos expostos ao tabaco, considerando a descrição prévia das proteínas em questão pelo fabricante. Para o controle negativo, os cortes foram incubados somente com anticorpo secundário, sem exposição prévia ao anticorpo primário. (A, B e C) referem-se ao controle negativo de MMP-2, MMP-9 e RAGE, respectivamente. Para o controle positivo, não houve modificação no protocolo experimental. (D, E e F) referem-se ao controle positivo de MMP-2, MMP-9 e RAGE, respectivamente.

Fotomicrografias representativas dos controles positivo e negativo para as imunomarcações para TNF- α , IL-1 β , IL-6 e RANKL. O controle positivo e negativo das reações foi realizado em cortes histológicos provenientes de tecido periodontal de ratos após 7 e 14 dias da indução de doença periodontal, considerando a descrição prévia das proteínas em questão. Para o controle negativo, os cortes foram incubados somente com anticorpo secundário, sem exposição prévia ao anticorpo primário. (A, B, C e D) referem-se ao controle negativo de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e RANKL, respectivamente. Para o controle positivo, não houve modificação no protocolo experimental. (E, F, G e H) referem-se ao controle positivo de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e RANKL, respectivamente.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 033/2007

Bauru, 12 de março de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Análise da interação AGE-RAGE e da expressão de citocinas do periodonto de ratos diabéticos”**, de autoria de Marcela Claudino da Silva, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito por unanimidade, em reunião desta Comissão realizada no dia **12 de março de 2008**, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 033/2007

Bauru, 23 de março de 2010.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de alteração no título do projeto de pesquisa "Análise da interação AGE-RAGE e da expressão de citocinas do periodonto de ratos diabéticos" de autoria de Marcela Claudino da Silva, para **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E DOS RECEPTORES RAGE NO PERIODONTO DE RATOS DIABÉTICOS**, informamos a aprovação *ad referendum* desta Comissão, considerando não terem sido feitas modificações na metodologia do trabalho.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Docente do Departamento de Ciências Biológicas